



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

2

**ТОМ 17
2018**

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.
С 2016 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А.В. Караулов, академик РАН, д-р мед. наук, проф.;

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

И.А. Балдуева, д-р мед. наук (Санкт-Петербург, Россия); **О.А. Бочарова**, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия); **Н.Д. Бунятян**, д-р фарм. наук, проф. (Москва, Россия); **А.К. Голенков**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **М.И. Давыдов**, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва, Россия); **Л.В. Демидов**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **М.В. Дмитриева**, канд. фарм. наук, *ответственный секретарь* (Москва, Россия); **И.В. Евсегнеева**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **П.К. Иванов**, д-р мед. наук (Москва, Россия); **З.Г. Кадагидзе**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **В.П. Краснов**, д-р хим. наук, проф. (Екатеринбург, Россия); **И.Ю. Кубасова**, канд. мед. наук (Москва, Россия); **И.Г. Меерович**, канд. биол. наук (Омаха, Небраска, США); **А.В. Мисюрин**, канд. биол. наук (Москва, Россия); **И.Р. Набиев**, д-р хим. наук, проф. (Реймс, Франция); **В.В. Новиков**, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород, Россия); **Н.А. Оборотова**, д-р фарм. наук, проф. (Москва, Россия); **А.Ю. Петров**, д-р фарм. наук, проф. (Екатеринбург, Россия); **Н.Я. Рапопорт**, д-р хим. наук, проф. (Солт-Лейк-Сити, Юта, США); **В.В. Решетникова**, канд. техн. наук (Москва, Россия); **Н.С. Сергеева**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **Е.В. Степанова**, д-р мед. наук (Москва, Россия); **Н.Н. Тупицын**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **Е.Г. Турнянская**, канд. мед. наук (Москва, Россия); **Ю.В. Шишкин**, д-р мед. наук, проф. (Москва, Россия); **И.Ж. Шубина**, д-р биол. наук (Москва, Россия); **И.В. Уласов**, д-р биол. наук (Сиэтл, США); **Р.И. Якубовская**, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия)

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7 (499) 324-10-65,
+7 (499) 612-81-92;
факс +7 (499) 324-22-74

E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Адрес редакции:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор Е.П. Врублевская
Корректор М.А. Андросова
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.
Регистрационный номер: № 77-11695
от 21.01.2002 г., ПИ № ФС77-53039 от
04.03.2013 г.
При полной или частичной перепечатке
материалов ссылка на журнал
«Российский биотерапевтический
журнал» обязательна.

ISSN 1726-9784
Российский биотерапевтический
журнал. 2018. Том 17. № 2. 1–96
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» — 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Тверской печатный двор»
Тираж 1000 экз.
<http://www.ronc.ru/node/1877>
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>

2 ТОМ 17
'18

Санкт-Петербург
Park Inn by Radisson Прибалтийская
5 - 8 ИЮЛЯ 2018

IV ПЕТЕРБУРГСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ ФОРУМ



БЕЛЫЕ НОЧИ

**4000 УЧАСТНИКОВ ИЗ РОССИИ И ЗАРУБЕЖЬЯ | 90 ИНОСТРАННЫХ ЭКСПЕРТОВ
БОЛЕЕ 700 ДОКЛАДОВ | 55 ТЕМАТИЧЕСКИХ НАПРАВЛЕНИЙ | ПРЕКУРСЫ ПО УЗИ-ДИАГНОСТИКЕ
МАСТЕР-КЛАССЫ И СПЕЦИАЛЬНЫЕ СЕССИИ | ОНЛАЙН-ТРАНСЛЯЦИИ ИЗ ОПЕРАЦИОННЫХ**

- Прямые включения из операционных в рамках проекта «Живая хирургия»
- Онкомамология - д.м.н. Криворотько Петр Владимирович
- Абдоминальная онкология - д.м.н. Карачун Алексей Михайлович
- Онкогинекология - д.м.н. Берлев Игорь Викторович
- Торакальная онкология - д.м.н. Левченко Евгений Владимирович
- Опухоли головы и шеи - к.м.н. Раджабова Замира Ахмедовна

- Курс мультимодальной визуализации молочной железы



Course
of **Breast**
Imaging

**МЕРОПРИЯТИЕ ПЛАНИРУЕТСЯ К АККРЕДИТАЦИИ
В СИСТЕМЕ НЕПРЕРЫВНОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБРАЗОВАНИЯ**



WWW.FORUM-ONCO.RU

Тел.: +7 (812) 439-95-55, доб. 4215, факс: (812) 596-89-47, E-mail: info@forum-onco.ru

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). In 2016, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

FOUNDERS

Federal State Budgetary Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

EDITOR-IN-CHIEF

Z.S. Shprakh, PhD, Deputy Director for Research Work of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Director of the Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

A.V. Karaulov, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS (Moscow, Russia);

M.A. Baryshnikova, PhD (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

I.A. Baldueva, PhD, DSc (Saint Petersburg, Russia); **O.A. Bocharova**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **N.D. Bunyatyan**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **A.K. Golenkov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.I. Davydov**, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS (Moscow, Russia); **L.V. Demidov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.V. Dmitrieva**, PhD, *Executive Editor* (Moscow, Russia); **I.V. Evseegneeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **P.K. Ivanov**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **Z.G. Kadagidze**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **V.P. Krasnov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia); **I.Yu. Kubasova**, PhD (Moscow, Russia); **I.G. Meerovich**, PhD (Omaha, Nebraska, USA); **A.V. Misyurin**, PhD (Moscow, Russia); **V.V. Novikov**, PhD, DSc, Professor (Nizhniy Novgorod, Russia); **I.R. Nabiev**, PhD, DSc, Professor (Reims, France); **N.A. Oborotova**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **A.Yu. Petrov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia); **N.Ya. Rapoport**, PhD, DSc, Professor (Salt Lake City, Utah, USA); **V.V. Reshetnikova**, PhD (Moscow, Russia); **N.S. Sergeeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.V. Stepanova**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **N.N. Tupitsin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.G. Turnyanskaya**, PhD (Moscow, Russia); **Yu.V. Shishkin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **I.Zh. Shubina**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **I.V. Ulasov**, PhD (Seattle, USA); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002 BY PROFESSOR A.YU. BARYSHNIKOV

2 VOL. 17
'18

FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center" of the Ministry of Health of Russia, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors.
Tel.: +7 (499) 324-10-65,
+7 (499) 612-81-92.
Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse,
Build. 15, Moscow 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru
Editor E.P. Vrublevskaya
Proofreader M.A. Androsova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695
dated 21.01.2002; ПИ № ФЦ77-53039
dated 04.03.2013

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal".

ISSN 1726-9784

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2018. Volume 17. No 2. 1–96

© PH "ABV-Press", 2018
Rospechat' catalogue index: 81679

Printed at the Tverskoy Pechatny Dvor
1,000 copies

<http://www.ronc.ru/node/1877>
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>М.А. Барышникова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков</i> Неоантигены в иммунотерапии опухолей	6
<i>Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, С.В. Минаев</i> Математическое моделирование этапа замораживания в технологии лиофилизированных лекарственных форм	15
<i>Д.Р. Насхлеташвили, В.А. Горбунова, М.Б. Бычков, А.Х. Бекашев, В.Б. Карахан, В.А. Алешин, Е.А. Москвина</i> Ингибиторы тирозинкиназы EGFR в лечении метастазов немелкоклеточного рака легкого EGFRm в головном мозге	22

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>М.С. Воронцова, Т.А. Кармакова, Е.А. Плотникова, Н.Б. Морозова, М.А. Абакумов, Р.И. Якубовская, Б.Я. Алексеев</i> Модели подкожного и ортотопического ксенографтов рака мочевого пузыря человека у мышей <i>nude</i> для исследования воздействий, нацеленных на рецептор эпидермального фактора роста	31
<i>С.Г. Захаров, А.К. Голенков, А.В. Мисюрин, Е.В. Катаева, А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, Т.А. Митина, Е.В. Трифонова, Л.Л. Высоцкая, Ю.Б. Черных, Е.Ф. Клинушкина, К.А. Белоусов, Ю.П. Финашутина, В.А. Мисюрин</i> Экспрессия основных генов внешнего пути апоптоза у больных с впервые выявленных хроническим лимфолейкозом в сравнении с клиническими данными	41
<i>Е.Н. Захарова, Т.Н. Заботина, О.В. Короткова, М.Е. Копырулина, И.В. Паниченко, В.Т. Циклаури, И.А. Задеренко, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов</i> Моноклональные антитела серии ИКО в трехцветном анализе субпопуляций Т-лимфоцитов периферической крови онкологических больных	47
<i>З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева</i> Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме	57
<i>О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, В.М. Бухман, З.С. Шпрах</i> Предклиническое токсикологическое изучение аналога гипоталамического гормона цифетрилина	63
<i>И.С. Голубева, О.В. Горюнова, Н.П. Яворская</i> Сравнительное изучение <i>in vivo</i> потенциальных противоопухолевых свойств в ряду аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола (развернутое сообщение)	71
<i>Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, В.Г. Кучеряну, И.В. Казеев, Е.С. Иноземцева, Ю.М. Соловьев, З.С. Шпрах</i> Регуляция иммуноадгезивных взаимодействий мультифитоадаптогеном в профилактике спонтанных гепатокарцином	78
<i>И.В. Манина, В.Ю. Сергеев, Н.В. Голубцова, А.Ю. Сергеев</i> Модификация реакции бласттрансформации лимфоцитов для применения в аллергологической практике	88

МАТЕРИАЛЫ XV ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ

<i>А.П. Бер, А.Э. Мачулкин, М.В. Ковальчук, Н.С. Воробьева, Е.К. Белоглазкина, С.В. Ковалев, В.Э. Котелянский, А.Г. Мажуга</i> Синтез и биологические испытания конъюгатов паклитаксела на основе ингибитора простатического специфического мембранного антигена для терапии рака предстательной железы	93
---	----

ЮБИЛЕИ

К 65-летию Александра Викторовича Караулова	94
--	----

REVIEWS

<i>M.A. Baryshnikova, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov</i> Neoantigens in tumor immunotherapy	6
<i>E.V. Blynskaya, S.V. Tishkov, K.V. Alekseyev, S.V. Minaev</i> Mathematical modeling of the stage of freezing in technology of lyophilized drugs	15
<i>D.R. Naskletashvili, V.A. Gorbunova, M.B. Bychkov, A.Kh. Bekyashev, V.B. Karakhan, V.A. Aleshin, E.A. Moskvina</i> EGFR Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of metastases of non-small cell lung cancer in the brain	22

ORIGINAL REPORTS

<i>M.S. Vorontsova, T.A. Karmakova, E.A. Plotnikova, N.B. Morozova, M.A. Abakumov, R.I. Yakubovskaya, B. Ya. Alexeev</i> Subcutaneous and orthotopic xenograft models of human bladder carcinoma in nude mice for epidermal growth factor receptor-targeted treatment	31
<i>S.G. Zakharov, A.K. Golenkov, A.V. Misyurin, E.V. Kataeva, A.A. Rudakova, M.A. Baryshnikova, T.A. Mitina, E.V. Trifonova, L.L. Vysotskaya, Yu.B. Chernykh, E.F. Klinushkina, K.A. Belousov, Yu.P. Finashutina, V.A. Misyurin</i> Expression of the apoptosis-related genes in patients with newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia in clinical data context	41
<i>E.N. Zakharova, T.N. Zabolina, O.V. Korotkova, M.E. Kopyrulina, I.V. Panichenko, V.T. Tsiklauri, I.A. Zaderenko, D.Yu. Blokhin, P.K. Ivanov</i> Monoclonal antibodies of IKO series in the three-color analysis of sub-populations of peripheral blood T-lymphocytes of oncological patients	47
<i>Z.S. Shprakh, E.V. Ignateva, I.V. Yartseva</i> Development and validation of aranosa assay in the dosage form	57
<i>O.I. Konyaeva, N.Yu. Kulbachevskaya, N.P. Ermakova, V.A. Chaley, I.B. Merkulova, T.V. Abramova, V.M. Buchman, Z.S. Shprakh</i> Pre-clinical toxicological study of analogue of hypothalamic hormone tsifetrlin	63
<i>I.S. Golubeva, O.V. Goryunova, N.P. Yavorskaya</i> Comparative <i>in vivo</i> studying of potential antineoplastic properties among of amino-acid derivative glycosides of the indolocarbazole (detailed report)	71
<i>E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, R.V. Karpova, V.G. Kucheryanu, I.V. Kazeev, E.S. Inozemceva, Y.N. Soloviev, Z.S. Shprakh</i> Immunoadhesive regulation using multiphytoadaptogene for spontaneous hepatocarcinomas prevention	78
<i>I.V. Manina, V.Yu. Sergeev, N.V. Golubtsova, A.Yu. Sergeev</i> Lymphocytes blast-transformation reaction: modification for allergological practice	88

PROCEEDINGS OF THE 15TH RUSSIAN RESEARCH CONFERENCE

<i>A.P. Ber, A.E. Machulkin, M.V. Kovalchuk, N.S. Vorobyova, E.K. Beloglazkina, S.V. Kovalev, V.E. Kotelyanskiy, A.G. Mazhuga</i> Synthesis and biological evaluation of paclitaxel conjugates with prostate-specific membrane antigen inhibitor for the treatment of prostate cancer	93
---	----

ANNIVERSARIES

For the 65th anniversary of Alexander V. Karaulov	94
---	----

НЕОАНТИГЕНЫ В ИММУНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

М.А. Барышникова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_ba@mail.ru

Раковые клетки в процессе развития опухоли накапливают много мутаций соматических генов. В результате таких генетических мутаций в опухолевых клетках образуются антигены, специфичные только для клеток опухоли и отсутствующие в нормальных тканях. Они получили название «неоантигены». Такие неоантигены могут быть высоко иммуногенными и рассматриваются в качестве молекул-мишеней, воздействие на которые может привести к отторжению опухоли. Хотя о существовании неоантигенов известно уже долгое время, их изучение и использование в терапии опухолей стало возможным только с повышением доступности массового кластерного секвенирования для детекции всех мутаций в опухолях и биоинформационных алгоритмов, предсказывающих, какие мутированные пептиды будут высокоаффинно связываться с аутологичными молекулами человеческих лейкоцитарных антигенов с последующей активацией иммунного ответа.

Ключевые слова: неоантигены, пептиды, противоопухолевые вакцины, блокаторы иммунных чек-пойнтов

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14

NEOANTIGENS IN TUMOR IMMUNOTHERAPY

M.A. Baryshnikova, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Malignant tumors are known to have complex mutational profiles and harbor concurrent alterations in many somatic genes. The inherent genetic heterogeneity is a critical determinant of cancer cells. The term of neoantigens was introduced to emphasize that these antigens are specific for cancer cells and are absent in normal tissue. Neoantigens are highly immunogenic and at present are considered to be the target molecules in cancer therapy. Although the neoantigens have been known for a long time, their study and use became possible with the increase in the availability of mass cluster sequencing to detect all mutations in tumors and bioinformatic algorithms predicting what mutated peptides will be highly affine to human leukocyte antigen autologous molecules with subsequent activation of the immune response.

Key words: neoantigens, peptides, anticancer vaccines, immune check point inhibitors

Введение

Иммунотерапия опухолей начала новый виток своего развития после успешного применения в клинике препаратов, направленных на контрольные точки иммунной системы. Многочисленные исследования демонстрируют, что в опухолях накапливается множество соматических мутаций, результатом которых является экспрессия антигенов, специфичных для опухоли и отсутствующих в нормальных тканях, которые получили в литературе название «неоантигены». В некоторых случаях неоантигены могут вызывать иммунный ответ против опухоли из-за отсутствия толерантности к ним, в результате чего они могут распознаваться клетками иммунной системы как чужеродные белки [1].

В 1990-е годы было обнаружено, что у ряда онкологических больных с опухолями, отличающимися высокой генетической нестабильностью, при лече-

нии с помощью адоптивной иммунотерапии развивался сильный Т-клеточный иммунный ответ против неоантигенов [2–4]. Эти мутации были в большинстве случаев уникальны для каждого конкретного пациента и, к сожалению, не могли быть универсальными мишенями для вакцинотерапии рака, поэтому исследования неоантигенов не выходили за рамки фундаментальных и долгое время не попадали из лабораторий в клинику.

Неоантигены и ответ на терапию блокаторами иммунных чек-пойнтов

Успехи в терапии опухолей, достигнутые при использовании блокаторов контрольных точек иммунной системы, возродили интерес к неоантигенам. Иммунологические контрольные точки, или иммунные чек-пойнты, — это система ингибиторных механизмов, которые участвуют в регуляции иммунного ответа.

В норме они защищают организм от аутоиммунных реакций, ограничивают повреждения органов и тканей, вызванные иммунными клетками. Эти механизмы ингибирования появляются и в опухолевой ткани, защищая клетки опухоли от распознавания иммунной системой.

Было замечено, что меланома и рак легкого хорошо отвечают на анти-PD-1-терапию, и некоторыми исследователями было сделано предположение, что мутантные пептиды частично вовлечены в развитие Т-клеточного ответа на лечение [5]. Было обнаружено, что опухоли, поддающиеся лечению блокаторами иммунных чек-пойнтов, обладают генетической нестабильностью и имеют большое число мутаций [6, 7].

В исследовании G.P. Pfeifer было показано, что УФ-индуцированная меланома и рак легких курильщиков несут множество генных мутаций [8]. В работе В. Heemskerk и соавт. было сделано предположение, что большое количество мутаций в таких опухолях, как меланома кожи, индуцированный курением рак легкого, колоректальный рак, связано с подверженностью клеток мутагенным или воспалительным стимулам: УФ-излучению, сигаретному дыму, еде, содержащей мутагенные и способствующие воспалению компоненты [9].

N. McGranahan и соавт. показали взаимосвязь между наличием неоантигенов и общей выживаемостью при первичных аденокарциномах легких [10]. На ранних стадиях немелкоклеточного рака легкого идентифицировали инфильтрирующие опухоль CD8⁺ лимфоциты, которые экспрессировали высокие уровни PD-1. У больных прогрессирующим немелкоклеточным раком легкого и меланомой чувствительность к блокаторам PD-1 и CTLA-4 была повышена в случае неоантиген-положительных опухолей, у пациентов с устойчивым клиническим ответом определяли Т-клетки, распознающие неоантигены. Также в результате этой работы обнаружено значительное повышение выживаемости у больных колоректальным раком с высоко нестабильным геномом при лечении блокаторами PD-1.

В исследовании D.T. Le и соавт. оценивали клиническую эффективность пембролизумаба (анти-PD-1) у пациентов с прогрессирующей метастатической карциномой с наличием или отсутствием дефектов репарации однонуклеотидных замен [11]. Было показано, что высокая нагрузка соматическими мутациями связана с увеличением времени выживаемости без прогрессирования после лечения пембролизумабом. У пациентов с большим количеством мутаций объективный ответ на лечение и время выживаемости без прогрессирования составили 40 и 70 % соответственно, в отличие от 0 и 11 % у пациентов с низким числом мутаций. Таким образом, это исследование

показало, что статус репарации однонуклеотидных замен является прогностически значимым для предсказания клинической эффективности блокады иммунных чек-пойнтов пембролизумабом [11].

В опухолях разных типов, отвечающих на терапию блокаторами контрольных точек иммунной системы, обнаружены CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфичные к неоантигенам [1]. Эти данные подтверждают, что распознавание неоантигенов — важный фактор, обеспечивающий эффективность иммунотерапии в клинике.

Неоантигены как мишени для терапии опухолей

Недавние достижения в секвенировании следующего поколения и компьютерном анализе привели к быстрой и доступной идентификации индивидуальных неоантигенов у пациентов.

В 2007 г. M. Nielsen и соавт. был предложен алгоритм для количественного прогнозирования связывания мутантных пептидов, определенных при полноэкзомном секвенировании, с любыми локусами HLA-A и -B (HLA — human leukocyte antigens, человеческие лейкоцитарные антигены) [12]. В результате было выполнено значительное число работ, посвященных возможности создания противоопухолевых вакцин на основе неоантигенов.

Новые методы для легкого и доступного определения иммуногенных неоантигенов вызвали повышенный интерес научного сообщества, так как значительно расширили спектр потенциальных мишеней для персонализированной иммунотерапии [5]. В ноябре 2013 г. на воркшопе Общества иммунотерапии рака (Society for Immunotherapy of Cancer, SITC), посвященном персонализированной терапии опухолей, были подняты следующие вопросы: являются ли клинические ответы на терапию цитокинами, адоптивным Т-клеточным переносом или блокаторами иммунных чек-пойнтов опосредованными специфической реактивностью на неоантигены? Какие неоантигены наиболее хорошо распознаются клетками иммунной системы и могут ли неоантигены быть эффективно использованы в качестве вакцин? [5].

Систематические исследования мутаномы опухоли начались около 5 лет назад. В 2012 г. J. Castle и соавт. предположили, что использование секвенирования для систематического анализа иммуногенных мутаций может проложить путь для персонализированной терапии онкологических пациентов [13]. В своей работе J. Castle и соавт. секвенировали геном клеток мышины меланомы B16F10 и обнаружили, что он несет 962 точечные соматические мутации, причем 563 из них были в экспрессирующихся генах. Потенциальные драйверные мутации встречались в классических опухолевых супрессорных генах и генах, вовлеченных в проонкогенные сигнальные пути,

которые контролируют клеточную пролиферацию, адгезию, миграцию и апоптоз. Среди найденных мутаций были Aim1 и Tgfr, известные и для человеческой меланомы. Иммуногенность и специфичность 50 валидированных неоантигенов определяли иммунизацией мышей длинными пептидами, способствовавшими представлению на МНС I и II классов мутированных эпитопов. Треть этих пептидов оказалась иммуногенной, в 60 % выявили иммунные ответы, направленные избирательно против мутированных последовательностей в сравнении с последовательностями дикого типа. На мышинных моделях с перевитыми опухолями иммунизация пептидами вызывала подавление роста опухоли *in vivo* в профилактических и терапевтических режимах, демонстрируя, таким образом, что мутированные эпитопы, содержащие 1 аминокислотную замену, могут быть использованы в качестве эффективных вакцин [13].

Исследование мутаномы также использовали Н. Matsushita и соавт. [14]. В процессе изучения механизмов иммуноредактирования опухолей они охарактеризовали мутации в высокоиммуногенных метилхолантрен-индуцированных саркомах иммунодефицитных Rag^{-/-} мышей, которые фенотипически похожи на зарождающиеся клетки первичной опухоли. Иммуноредактирование рака — процесс селекции иммунной системой низкоиммуногенных опухолевых клеток — включает 3 фазы: удаление, балансирование и ускользание. Несмотря на то что известны многие компоненты иммунной системы, участвующие в этом процессе, его основные механизмы пока остаются плохо изученными. Центральным принципом иммуноредактирования рака заключается в том, что процесс распознавания Т-клетками опухолевых антигенов управляет иммунологической деструкцией опухоли или, наоборот, ее ростом. Имеющиеся знания об опухолевых антигенах получены в основном в результате анализа опухолей, которые развились в иммунокомпетентных организмах и поэтому уже являются «отредактированными». Мало известно об антигенах, экспрессированных в зарождающихся опухолях: достаточно ли их, чтобы индуцировать защитные противоопухолевые иммунные ответы, или их экспрессия регулируется иммунной системой? Ответ на этот вопрос искали в своей работе Н. Matsushita и соавт. Используя экзомное секвенирование и компьютерный анализ связывания мутантных пептидов с молекулами главного комплекса гистосовместимости, авторы идентифицировали точечную мутацию в гене *спектрин-β2*, которая приводит к тому, что сильно возрастает связывание пептида с МНС I класса. Авторы доказали, что этот пептид является доминантным опухолевым антигеном, который вызывает полную спонтанную CD8⁺ Т-клеточно-опосредованную регрессию метилхолантрен-

индуцированной саркомы у иммунокомпетентных мышей. Таким образом, высокая иммуногенность «неотредактированных» опухолей может быть обусловлена экспрессией высоко антигенных мутантных пептидов. Н. Matsushita и соавт. предположили, что одним из механизмов иммуноредактирования опухоли является Т-клеточно-зависимый процесс иммуноселекции опухолевых клеток, у которых отсутствуют неоантигены, вызывающие иммунный ответ [14].

В 2013 г. P.F. Robbins и соавт. также использовали полноэкзомное секвенирование для идентификации мутантных неоантигенов [15]. При проведении II фазы клинических испытаний адоптивной иммунотерапии аутологичными инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (TILs) обнаружили, что существенная регрессия метастатического поражения наблюдалась более чем у 70 % больных меланомой, получавших данное лечение. У 40 % пациентов после лечения наблюдалась полная регрессия, длящаяся как минимум 5 лет. Для того чтобы оценить связь между способностью TILs вызывать стойкую регрессию и распознавать неоантигены, авторы разработали скрининговый подход, включающий использование данных полноэкзомного секвенирования для идентификации мутантных белков в опухоли пациента. Затем авторы синтезировали и оценили кандидатные мутантные Т-клеточные эпитопы, которые были идентифицированы при помощи алгоритма связывания с главным комплексом гистосовместимости как распознающиеся Т-лимфоцитами. Используя такой подход, авторы идентифицировали мутантные антигены, экспрессированные на аутологичных опухолевых клетках, которые распознавались 3 линиями TILs, полученными от 3 пациентов с меланомой, и были ассоциированы с объективной регрессией опухоли, вызванной адоптивной иммунотерапией. Этот простой подход к идентификации мутантных антигенов, распознаваемых Т-клетками, позволил избежать необходимости создания библиотек кДНК из опухолей и их кропотливого скрининга [15].

Еще одна группа исследователей, F. Duan и соавт., доложила о возможности использования компьютерного анализа для точной идентификации иммуногенных неоантигенов с помощью нейронной сети NetMHC и анализа конформационной стабильности взаимодействия пептид — МНС I класса [16]. С помощью данного подхода авторам удалось идентифицировать мутантные неопептиды для создания новых якорных остатков, способных к связыванию с молекулой главного комплекса гистосовместимости. Неопептиды, идентифицированные авторами, вызывали CD8-зависимый иммунный ответ.

В ряде работ было подтверждено, что образующиеся в результате соматических мутаций пептиды, представленные молекулами главного комплекса

гистосовместимости I или II класса, могут вызывать активацию цитотоксических Т-лимфоцитов, что в итоге может приводить к контролю над заболеванием и регрессии опухоли, а в некоторых случаях и к излечению заболевания [1].

Полногеномный анализ опухолевых тканей показал гораздо больше мутаций, чем ожидалось, которые накапливаются в разных типах опухолей. Продукты мутировавших генов сами по себе служат потенциальными терапевтическими мишенями, особенно если такие генные продукты содержат драйверные мутации, которые влияют на канцерогенез так, как это происходит с HER2, p53 и Ras. Многие из них являются объектами таргетной терапии моноклональными антителами, ингибиторами ферментов и рецепторов, но в результате исследований, проведенных в последние годы, появились доказательства, что и «пассажирские» мутации, которые на первый взгляд кажутся не влияющими на канцерогенез, могут обладать иммуногенностью и служить мишенями для иммунотерапии. В данном случае основным мотивом терапии является стимуляция иммунной системы к узнаванию новых антигенов и развитию иммунологической реакции против опухоли. Таким образом, высокая мутационная нагрузка опухоли, с одной стороны, ускоряет процесс эволюции опухоли, с другой стороны — обеспечивает наличие новых антигенов, позволяющих атаковать опухоль активным Т-клеткам.

М. М. Gubin и соавт. использовали геномный и биоинформационный подходы, чтобы идентифицировать опухолеспецифичные мутантные белки как основной класс антигенов, с которыми реагируют Т-клетки, в результате анти-PD-1 или CTLA-4-терапии мышей с саркомой, и показали, что терапевтические вакцины из синтетических длинных пептидов, связывающихся с этими мутантными эпитопами, индуцируют отторжение опухоли, сравнимое с терапией блокаторами контрольных точек [7]. Авторы подтвердили, что Т-клетки, специфичные к мутантным антигенам, присутствуют в быстро растущих опухолях, они активируются в результате блокады иммунных чек-пойнтов (PD-1 и CTLA-4) и показывают перекрывающиеся, но в основном специфичные для лечения транскрипционные профили, делающие их способными к опосредованному удалению опухоли. Эти результаты еще раз подтверждают, что наличие опухолеспецифических мутантных антигенов — не только важное основание для терапии блокаторами иммунных контрольных точек. Они также могут быть использованы для создания персонализированных опухолеспецифических вакцин и для фундаментальных исследований различных препаратов — блокаторов иммунных чек-пойнтов.

Еще одно подтверждение того, что представленные главным комплексом гистосовместимости I класса

мутантные пептиды могут быть иммуногенными, поскольку распознаются адаптивной иммунной системой как «чужие» неоантигены, приведено в работе М. Yadav и соавт. [17]. Исследователи разработали подход, который комбинирует анализ полноэкзомного и транскриптомного секвенирования с масс-спектрометрией для идентификации неоэпитопов на 2 широко используемых мышинных моделях. Идентифицировали более 1300 аминокислотных изменений, из которых для 13 % с помощью компьютерного анализа было предсказано связывание с МНС I класса, подтвержденное масс-спектрометрией. В результате структурного моделирования связывания с МНС I класса мутации, доступные Т-клеточным рецепторам, были выбраны как иммуногенные. Вакцинация мышей отдельно каждым иммуногенным пептидом вызвала Т-клеточный терапевтический ответ. Эта группа исследователей также показала, что с помощью компьютерного анализа можно генерировать декстримеры пептид — МНС I, которые могут быть использованы для мониторинга кинетики и распределения противоопухолевого Т-клеточного ответа до и после вакцинации. Работа показывает, что доступный алгоритм компьютерного анализа может обеспечить подход к фармакодинамическому мониторингу Т-клеточного ответа на персонализированные противоопухолевые вакцины у больных раком.

S. Kreiter и соавт. предложили персонализированный подход к иммунотерапии, нацеленный на полный спектр всех индивидуальных для опухоли пациента мутаций [18]. На 3 независимых мышинных опухолевых моделях они продемонстрировали, что значительная фракция неоантигенов, являющихся результатом несинонимичных опухолевых мутаций, иммуногенна и большинство иммуногенных неоантигенов распознается CD4⁺ Т-клетками. В работе S. Kreiter и соавт. мутации, являющиеся потенциальными мишенями для вакцинотерапии, идентифицировали при секвенировании экзона и выбирали с помощью биоинформационного анализа, оценивая уровни их экспрессии и связывание с молекулой главного комплекса гистосовместимости II класса. Оказалось, вакцинация синтетическими полиэпитопными мРНК-вакцинами индуцирует мощный контроль над опухолью и полное рассасывание ранее перевитых агрессивно растущих опухолей у мышей, меняет опухолевое микроокружение и индуцирует цитотоксический Т-лимфоцитарный ответ. Авторы предлагают рассматривать специализированный иммунотерапевтический подход как универсальную модель для разностороннего использования обширного репертуара неоэпитопных мишеней, дающую возможность эффективного поражения каждой опухоли пациента с помощью персонализированных вакцин, произведенных в нужное время [18].

В 2015 г. С. J. Cohen и соавт. впервые продемонстрировали успешное выделение Т-клеток, реактивных к неоантигенам, из периферической крови пациента перед иммунотерапией [19]. Для этого провели полноэкзомное секвенирование опухоли и нормальной дезоксирибонуклеиновой кислоты, выделенной у 8 пациентов с метастатической меланомой. С помощью алгоритма связывания пептида с молекулой главного комплекса гистосовместимости идентифицировали кандидатные мутантные эпитопы, которые затем синтезировали и использовали, чтобы генерировать панели тетрамеров МНС, которые были оценены по связыванию с опухолью, после чего культивированные Т-лимфоциты использовали для лечения пациентов. Эта стратегия привела к идентификации 9 мутантных эпитопов у 5 пациентов из 8. Клетки, реагирующие с 8 из 9 эпитопов, могли быть выделены из аутологичной периферической крови, где они определялись с частотой приблизительно между 0,4 и 0,002 % [19].

В исследовании A. L. Pritchard и соавт. использовали высокопроизводительный скрининговый подход, комбинирующий данные полноэкзомного секвенирования, исследования мРНК и общедоступный алгоритм прогнозирования неоэпитопов для идентификации мутантных белков в опухоли пациента, распознаваемых циркулирующими клетками иммунной системы [20]. В исследование были включены 5 пациентов, у 3 из которых был полный ответ в течение 15 лет на лечение аутологичными дендритноклеточными вакцинами. Аутологичные клеточные линии меланомы, ранее полученные из опухолевого материала больных, и мононуклеары их периферической крови использовали для создания смешанной культуры лимфоцитов с опухолевыми клетками, что приводило к экспансии неоантиген-реактивных Т-клеток, которые использовали в скрининге мутантных пептидов. Идентифицировали 7 мутантных антигенов, которые стимулировали Т-эффекторные клетки памяти у 2 из 5 пациентов [20].

Таким образом, использование данных секвенирования опухоли пациента и HLA-типирования циркулирующих клеток периферической крови в качестве основы для прогнозирования иммуногенных неоантигенов имеет большие возможности для применения в персонализированной терапии больных раком. Интеграция этих технологий в клиническую практику — многообещающая инновация в лечении онкологических больных.

Персонализированные неоантигенные вакцины. Клинические испытания

На основании результатов вышеизложенных исследований начаты клинические испытания ряда персонализированных противоопухолевых вакцин в Европе, Северной Америке и Китае.

В настоящее время активно развиваются 2 подхода к иммунотерапии опухолей с помощью неоантигенов: пептидные вакцины и РНК-вакцины. Пептидные вакцины могут содержать смеси синтетических пептидов с адъювантами или дендритные клетки, нагруженные пептидами.

Оба подхода имеют общие базовые этапы: в результате анализа мутантного опухоли пациента выбирают мутации для создания вакцины, которые с наибольшей вероятностью будут обеспечивать контроль над опухолью. Важно, чтобы мутации, на основе которых будут созданы противоопухолевые вакцины, подтверждались несколькими независимыми методами, были специфичными только для опухоли и содержались в транскриптах, кодирующих белки, вызывали изменения в последовательностях белков и экспрессировались в опухолевых клетках.

Преимущество РНК-вакцин заключается в том, что рибонуклеиновую кислоту можно быстро и доступно синтезировать в условиях GMP. РНК-вакцины имеют собственную адъювантную активность, могут представлять несколько эпитопов в одной молекуле, эндогенно транслируются, эффективно обеспечивают механизмы производства и презентации антигена и вызывают мощный противоопухолевый иммунитет [21]. Однако серьезным недостатком РНК-вакцин являются сложности в доставке к клеткам-мишеням *in vivo*, поскольку они не проходят через клеточную мембрану и разрушаются внеклеточными рибонуклеазами. Существуют разные подходы к адресной доставке таких вакцин. Например, это может быть использование РНК-трансфицированных дендритных клеток или прямое введение мРНК.

В работе L. M. Kranz и соавт. описана методика доставки рибонуклеиновой кислоты в дендритные клетки с помощью липидных капсул [22]. В исследовании представлены результаты эффективной доставки *in vivo* при внутривенном введении в дендритные клетки РНК-липоплексов, созданных на основе хорошо известных липидных носителей с оптимальной регулировкой заряда без необходимости функционализации частиц молекулярными лигандами. Липоплексы защищали рибонуклеиновую кислоту от экстрацеллюлярных рибонуклеаз и вызывали их эффективный захват и экспрессию кодируемого антигена популяциями дендритных клеток и макрофагов в различных лимфоидных компартментах. РНК-липоплексы активировали созревание дендритных клеток *in situ* и воспалительные иммунные механизмы, напоминающие механизмы ранней стадии вирусной инфекции. РНК-липоплексы индуцировали сильные ответы эффекторных Т-клеток и клеток памяти и вызывали INF α -зависимое отторжение прогрессирующих опухолей. В I фазе клинических испытаний по эскалации дозы РНК-липоплексов

у первых 3 пациентов с меланомой, леченных низкими дозами вакцины, наблюдали индукцию INF α и сильные антиген-специфические Т-клеточные ответы. Поскольку любой антиген, имеющий в основе полипептид, может быть кодирован рибонуклеиновой кислотой, РНК-липopleксы представляют собой универсальную легко применяемую вакцину для системной доставки к дендритным клеткам и синхронной индукции как мощного адаптивного иммунитета, так и врожденных иммунных механизмов, опосредованных индукцией интерферона для иммунотерапии рака.

В 2017 г. в Nature были опубликованы результаты клинических исследований вакцин для предотвращения рецидива метастатической меланомы после ее хирургического удаления. Одна из работ описывает клиническое использование вакцины на основе длинных пептидов, а другая — РНК-вакцины [23, 24]. В результате обоих исследований наблюдались активация CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и предотвращение рецидива заболевания у большинства пациентов. В случае рецидива после использования вакцин наблюдали хороший эффект анти-PD-1-терапии.

Работа, выполненная Р.А. Отт и соавт. [23], описывает клинические испытания иммуногенной персонализированной неоантигенной вакцины на основе длинных пептидов для лечения меланомы. Авторы исследования предположили, что вакцинация неоантигенными пептидами может, с одной стороны, увеличить уже существующую популяцию неоантиген-специфических Т-клеток, а с другой — индуцировать более широкий репертуар новых специфических к опухоли Т-клеток у онкологических больных, приводя к контролю развития опухоли. Для создания вакцины, направленной на персональные неоантигены опухоли пациента, исследователи провели полноэкзомное секвенирование дезоксирибонуклеиновой кислоты опухоли и нормальных клеток, полученных от этого пациента, идентифицировали соматические мутации, ортогонально проверили и оценили экспрессию мутированных аллелей РНК-секвенированием опухоли, предсказали, какие мутированные пептиды вероятнее всего связываются с аутологичными HLA-A или HLA-B белками пациентов и синтезировали клинически применимые длинные пептиды. Полученные пептиды смешали с иммуногенным адъювантом — поли-ICLC (Хилтонол), являющимся лигандом TLR3 и MDA5. Полученную вакцину оценили в клиническом исследовании I фазы, результаты которого показали доступность, безопасность и иммуногенность пептидной вакцины, направленной на 20 ранее предсказанных персональных опухолевых антигенов. Индуцированные вакциной полифункциональные CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки поражали 58 (60 %) и 15 (16 %) соответственно из

97 уникальных неоантигенов при вакцинации пациентов. Т-клетки отличали мутантные антигены от антигенов дикого типа и в некоторых случаях прямо распознавали аутологичные опухоли. Из 6 вакцинированных пациентов 4 не имели рецидива заболевания в течение 25 мес после вакцинации, тогда как у 2 больных с рецидивом была в дальнейшем применена анти-PD1-терапия и наблюдалась полная регрессия опухоли. Полученные в исследовании результаты обеспечивают обоснование для будущего развития данного иммунотерапевтического подхода, как отдельно, так и в комбинации с блокаторами контрольных точек или другими видами иммунотерапии [23].

В исследовании U. Sahin и соавт. представлен РНК-полинеоэпитопный подход к мобилизации иммунитета против спектра опухолевых мутаций [24]. Описаны результаты клинического применения у больных меланомой персонализированной неоантигенной РНК-вакцины, направленной на мутаном опухоли. Процесс создания вакцины включал комплексную идентификацию индивидуальных мутаций, компьютерный анализ таргетных неоэпитопов, дизайн и производство вакцины, уникальной для каждого пациента. У всех больных, принимавших участие в исследовании, развились Т-клеточные ответы против неоэпитопов вакцины. У 2 пациентов после вакцинации были удалены метастазы, в которых наблюдали индуцированную вакциной Т-клеточную инфильтрацию и неоэпитоп-специфическую гибель аутологичных опухолевых клеток. После начала вакцинации у больных стали значительно реже появляться метастазы и увеличилось время без прогрессирования. У 2 из 5 пациентов с метастазами наблюдался опосредованный вакциной объективный ответ. Один из этих пациентов имел рецидив из-за развития β 2-микроглобулин-дефицитной меланомы, что является показателем приобретенной резистентности. У 1 пациента развился полный ответ на вакцинацию в комбинации с анти-PD1-терапией. Таким образом, исследованная неоэпитопная вакцина может предотвращать рецидив заболевания в группе пациентов с высоким риском. Кроме того, рациональная комбинация вакцины с блокаторами PD-1/PD-L1. Т-клетки, специфичные к неоэпитопам, имели PD-1-положительный фенотип клеток памяти, после вакцинации наблюдалось снижение уровня PD-L1.

Недавно опубликованы результаты еще одного клинического применения пептидной неоантигенной вакцины для лечения рака поджелудочной железы [25], которое подтверждает, что новые подходы к секвенированию помогают быстро идентифицировать мутаном опухоли и создавать персонализированные противоопухолевые вакцины в течение нескольких недель после постановки диагноза. В статье

приведен клинический случай терапии 62-летнего пациента пептидной вакциной, содержащей 4 пептида, направленных на 2 мутации в опухоли поджелудочной железы, идентифицированные с помощью экзомного секвенирования. Вакцинацию начали во время химиотерапии во время 2-й полной ремиссии и продолжили через месяц. Отслеживали INF γ -положительный клеточный ответ против пептидов вакцины в периферической крови после 12, 17 и 34 вакцинаций, анализируя разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов и эпитопсвязывающие регионы пептид-реактивных Т-клеточных линий и клонов. При анализе INF γ -продуцирующих клеток подтверждали эпитоп-специфичность, функциональность и Th1-поляризацию. Наблюдали пептид-специфический Т-клеточный ответ против 3 из 4 пептидов вакцины. Молекулярный анализ выявил широкий репертуар реагирующих на вакцину специфичных Т-клеточных рецепторов. Наблюдаемые Т-клеточные ответы вероятно привели к клиническому эффекту: пациент жив в течение 6 лет после постановки диагноза и имеет полную ремиссию 4 года.

Представленные результаты доказывают, что недорогое и доступное ДНК-секвенирование привело к началу новой эры в иммунотерапии рака, так как дает возможность развития высоко персонализированных подходов к терапии опухолей.

Адъюванты для успешной противоопухолевой вакцинотерапии

Несмотря на огромный потенциал противоопухолевых вакцин, их эффективность при применении у людей ограничена. Результаты исследования эффективности противоопухолевых вакцин на животных и в клинических испытаниях многократно подтверждают необходимость использования адъювантов при вакцинотерапии опухолей. Причем давно используемые и разрешенные к применению адъюванты, такие как алюминиевые квасцы, неполный адъювант Фрейнда, не подходят для противоопухолевой вакцинации из-за недостаточной иммуногенности или же из-за развития нежелательных побочных реакций на них. Традиционно в вакцинотерапии адъюванты использовали в качестве депо или системы доставки антигенов антигенпрезентирующим клеткам [26].

В исследованиях противоопухолевых неоантигенных вакцин, проведенных в последние 5 лет, использовали адъюванты с иммуностимулирующими свойствами, наиболее часто — лиганды TLR-3, такие как поли-И:С (polyinosinic:polycytidylic acid, poly IC). TLR-3 — эндосомальный толлподобный рецептор 3 распознает инфицирование РНК-вирусами через внутриклеточную двухцепочечную рибонуклеиновую кислоту [27]. Рецепторы паттернов распознавания

(PRRs) играют ключевую роль в системе врожденного иммунитета и обеспечивают ответ организма, направленный против микробной инфекции. Анти-микробные сигналы, индуцированные PRR, обеспечивают продукцию интерферона и цитокинов и запускают воспалительный процесс, они влияют на прогрессию опухоли и развитие аутоиммунных заболеваний. На сегодняшний день известно, что среди всех PRR только сигнальный путь эндосомального TLR-3 не индуцирует системное воспаление и вызывает активацию антиген-специфичных CD8⁺ Т-клеток дендритными клетками [28]. Синтетический лиганд TLR-3 поли-И:С является мощным адъювантом, способным активировать образование антиген-специфичных антител, цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы 1-го типа. Однако помимо активации иммунных ответов поли-И:С активирует внутриклеточные рецепторы вирусной инфекции — RIG-1 и MDA5, ассоциированные с токсическими эффектами, такими как индукция системного цитокинового шторма [26]. Для того чтобы преодолеть эти эффекты, была разработана модифицированная синтетическая молекула гибрид ДНК и двухцепочечная рибонуклеиновая кислота, которая связывается с TLR-3, но не с RIG-1 и MDA5. Новый лиганд TLR3 (ARNAX) совместно с опухолеспецифическими антигенами индуцировал опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты, модулировал опухолевое микроокружение по Th1-типу противоопухолевого иммунного ответа, приводил к регрессии опухоли без развития воспаления на мышинных моделях. Комбинация ARNAX и опухолеспецифических антигенов с блокаторами PD-1/PD-L1 приводила к усилению противоопухолевого ответа и помогала преодолевать резистентность к анти-PD-1/PD-L1 [29].

Еще одна модификация поли-И:С, стабилизированная поли-L-лизином (poly ICLC) (торговое название — Хилтонол (Oncovir)) взаимодействует с TLR-3 и MDA5. Исследования, проведенные на добровольцах, показали повышение активности генов, вовлеченных в сигнальные пути врожденного иммунного ответа, в том числе, отвечающих за активацию интерферона и провоспалительных сигналов [30].

Так же, как и поли-И:С, поли-ICLC активировал опухолеспецифические цитотоксические Т-лимфоциты, NK- и NKT-клетки, обеспечивая значительную регрессию опухоли и увеличение продолжительности жизни у мышей [31].

Другая модификация поли-И:С — poly (I:C₁₂C) (Амплиген) — нетоксичный и произведенный в условиях GMP аналог с заменой однонуклеотидных оснований (G и U), которые делают его более устойчивым к гидролизу и значительно снижают токсичность. Было показано, что системное внутривенное введение Амплигена не вызывало токсических эффектов,

клинические испытания у пациентов с метастатическим раком почки показали, что он может вызывать противоопухолевые иммунные ответы, обеспечивающие увеличение выживаемости больных через механизмы активации NK- и Т-клеток [32].

Помимо лигандов TLR-3 совместно с неоантигенными вакцинами применяют другие адъюванты. Например, в исследовании [25] в качестве адъюванта использовали ГМ-КСФ, поскольку его эффективность была подтверждена для первой разрешенной к применению FDA вакцины против рака предстательной железы Provenge [33], а в III фазе клинических исследований ГМ-КСФ в комбинации с противоопухолевыми вакцинами показал улучшение клинического исхода у больных меланомой [34].

R. Kuai и соавт. показали, что нанодиски, имитирующие липопотеины высокой плотности, соединенные с неоантигенными пептидами и адъювантами, могут значительно улучшить доставку компонентов вакцины к лимфоидным органам и поддержать презентацию антигена дендритными клетками. Исследователи обнаружили, что вакцина с нанодисками более чем в 47 раз чаще вызывает неоантиген-специфический Т-клеточный ответ по сравнению с растворимыми вакцинами, а также иммунный ответ, который более чем в 31 раз сильнее по сравнению с адъювантом CpG в Monatinide. Вакцины с нанодисками вызывали рассасывание развившихся опухолей мышей MC-38 и B16F10 в комбинации с анти-PD-1- и анти-CTLA4-терапией [35].

Использование в противоопухолевых неоантигенных вакцинах иммуностимулирующих или иммуномодулирующих адъювантов, которые преодолевают

толерантность опухолевого микроокружения и вызывают мощный противоопухолевый иммунный ответ, может обеспечить эффективность вакцинотерапии.

Заключение

Инновации в секвенировании опухолевого экзосом и компьютерном анализе данных обозначили новую эру персонализированной иммунотерапии с помощью специфичных для пациента неоантигенов. Неоантигены — перспективная мишень для персонализированных противоопухолевых вакцин, позволяющая целенаправленно контролировать опухоль, не затрагивая нормальные ткани. Однако на сегодняшний день недостаточно клинических испытаний для того, чтобы сделать объективный вывод об их эффективности. Также требуются прояснения и оптимизации практические вопросы производства и применения персонализированных вакцин.

Проведенные разными группами исследования имеют много общих черт, подтверждая, что для эффективного контроля опухоли одного метода терапии неоантигенными пептидными или РНК-вакцинами недостаточно. Прогностическим фактором для оценки потенциальной эффективности терапии, направленной на преодоление иммунорезистентности опухолевых клеток, может служить уровень экспрессии PD/PD-L/CTLA на клетках опухоли и лимфоцитах. Не менее важным является определение уровня генетической нестабильности или количества мутаций в опухоли. Представленные исследования подтверждают мнение, что иммунотерапия опухолей наиболее эффективна после хирургического лечения, до получения пациентом химиотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bobisse S., Foukas P.G., Coukos G., Harari A. Neoantigen-based cancer immunotherapy. *Ann Transl Med* 2016;4(14):262. DOI: 10.21037/atm.2016.06.17. PMID: 27563649.
2. Robbins P.F., El-Gamil M., Li Y.F. et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 1996;183(3):1185–92. PMID: 8642260.
3. Mandruzzato S., Brasseur F., Andry G. et al. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 1997;186(5):785–93. PMID: 9271594.
4. Saeterdal I., Bjørheim J., Lislud K. et al. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(23):13255–60. DOI: 10.1073/pnas.231326898. PMID: 11687624.
5. Overwijk W.W., Wang E., Marincola F.M. et al. Mining the mutanome: developing highly personalized immunotherapies based on mutational analysis of tumors. *J Immunother Cancer* 2013;1:11. DOI: 10.1186/2051-1426-1-11. PMID: 24829748.
6. Alexandrov L.B., Nil-Zainai S., Wedge D.C. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500(7463):415–21. DOI: 10.1038/nature12477. PMID: 23945592.
7. Gubin M.M., Zhang X., Schuster H. et al. Checkpoint Blockade Cancer Immunotherapy Targets Tumour-Specific Mutant Antigens. *Nature* 2014;515(7528):577–81. DOI: 10.1038/nature13988. PMID: 25428507.
8. Pfeifer G.P. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. *Genome Med* 2010;2(8):54. DOI: 10.1186/gm175. PMID: 20707934.
9. Heemskerk B., Kvistborg P., Schumacher T.N. The cancer antigenome. *EMBO J* 2013;32(2):194–203. DOI: 10.1038/emboj.2012.333. PMID: 23258224.
10. McGranahan N., Furness A.J., Rosenthal R. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016;351(6280):1463–9.

- DOI: 10.1126/science.aaf1490.
PMID: 26940869.
11. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509–20. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596. PMID: 26028255.
 12. Nielsen M., Lundegaard C., Blicher T. et al. NetMHCpan, a method for quantitative predictions of peptide binding to any HLA-A and -B locus protein of known sequence. *PLoS One* 2007;2(8):e796. DOI: 10.1371/journal.pone.0000796. PMID: 17726526.
 13. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. *Cancer Res* 2012;72(5):1081–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722. PMID: 22237626.
 14. Matsushita H., Vesely M.D., Koboldt D.C. et al. Cancer Exome Analysis Reveals a T Cell Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. *Nature* 2013;482(7385):400–4. DOI: 10.1038/nature10755. PMID: 22318521.
 15. Robbins P.F., Lu Y.C., El-Gamil M. et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med* 2013;19(6):747–52. DOI: 10.1038/nm.3161. PMID: 23644516.
 16. Duan F., Duitama J., Al Seesi S. et al. Genomic and bioinformatic profiling of mutational neoepitopes reveals new rules to predict anticancer immunogenicity. *J Exp Med* 2014;211(11):2231–48. DOI: 10.1084/jem.20141308. PMID: 25245761.
 17. Yadav M., Jhunjunwala S., Phung Q.T. et al. Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* 2014;515(7528):572–6. DOI: 10.1038/nature14001. PMID: 25428506.
 18. Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N. et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. *Nature* 2015;520(7549):692–6. DOI: 10.1038/nature14426. PMID: 25901682.
 19. Cohen C.J., Gartner J.J., Horovitz-Fried M. et al. Isolation of neoantigen-specific T cells from tumor and peripheral lymphocytes. *Clin Invest* 2015;125(10):3981–91. DOI: 10.1172/JCI82416. PMID: 26389673.
 20. Pritchard A.L., Burel J.G., Neller M.A. et al. Exome Sequencing to Predict Neoantigens in Melanoma. *Cancer Immunol Res* 2015;3(9):992–8. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0088. PMID: 26048577.
 21. Boissguérin V., Castle J.C., Loewer M. et al. Translation of genomics-guided RNA-based personalised cancer vaccines: towards the bedside. *Br J Cancer* 2014;111(8):1469–75. DOI: 10.1038/bjc.2013.820. PMID: 25314223.
 22. Kranz L.M., Diken M., Haas H. et al. Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature* 2016;534(7607):396–401. DOI: 10.1038/nature18300. PMID: 27281205.
 23. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991. PMID: 28678778.
 24. Sahin U., Derhovanessian E., Miller M. et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017;547(7662):222–6. DOI: 10.1038/nature23003. PMID: 28678784.
 25. Sonntag K., Hashimoto H., Eyrieh M. et al. Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multi-peptide vaccines: a case report. *J Transl Med* 2018;16(1):23. DOI: 10.1186/s12967-018-1382-1. PMID: 29409514.
 26. Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int Immunol* 2016;28(7):329–38. DOI: 10.1093/intimm/dxw015. PMID: 27006304.
 27. Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11(5):373–84. DOI: 10.1038/ni.1863. PMID: 20404851.
 28. Matsumoto M., Takeda Y., Tatematsu M., Seya T. Toll-Like Receptor 3 Signal in Dendritic Cells Benefits Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol* 2017;8:1897. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01897. PMID: 29312355.
 29. Matsumoto M., Tatematsu M., Nishikawa F. et al. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production *in vivo*. *Nat. Commun* 2015;6:6280. DOI: 10.1038/ncomms7280. PMID: 25692975.
 30. Caskey M., Lefebvre F., Filali-Mouhim A. et al. Synthetic double-stranded RNA induces innate immune responses similar to a live viral vaccine in humans. *J Exp Med* 2017;208(12):2357–66. DOI: 10.1084/jem.20111171. PMID: 22065672.
 31. Damo M., Wilson D.S., Simeoni E., Hubbell J.A. TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma. *Sci Rep* 2015;5:17622. DOI: 10.1038/srep17622. PMID: 26631690.
 32. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 2009;27(25–26):3401–4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.071. PMID: 19200817.
 33. Small E.J., Fratesi P., Reese D.M. et al. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J Clin Oncol* 2000;18(23):3894–903. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.23.3894. PMID: 11099318.
 34. Kaufman H.L., Ruby C.E., Hughes T. et al. Current status of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the immunotherapy of melanoma. *J Immunother Cancer* 2014;2:11. DOI: 10.1186/2051-1426-2-11. PMID: 24971166.
 35. Kuai R., Ochyl L.J., Bahjat K.S. et al. Designer vaccine nanodiscs for personalized cancer immunotherapy. *Nat Mater* 2017;16(4):489–96. DOI: 10.1038/nmat4822. PMID: 28024156.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭТАПА ЗАМОРАЖИВАНИЯ В ТЕХНОЛОГИИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Е.В. Бlynская¹, С.В. Тишков¹, К.В. Алексеев², С.В. Минаев¹

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

²Московский медицинский университет «РЕАВИЗ»; Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатyrская, 2, стр. 2

Контакты: Сергей Валерьевич Тишков sergey-tishkov@ya.ru

Цель работы — продемонстрировать существующие возможности и методику математического моделирования этапа заморозки в технологии лиофилизации флаконов, наполненных раствором, содержащим фармацевтическую субстанцию и вспомогательные вещества. Процесс заморозки является определяющим для последующих этапов первичной сублимации и этапа досушки. Так, именно на этапе замораживания формируются кристаллы льда и определенная микроструктура, формирующая поры для последующих этапов и влияющая в дальнейшем на скорость всех этапов. Разработанные методики позволяют оценить кинетику охлаждения, замерзания, просчитать размеры ледяных кристаллов и определить проницаемость сублимационного слоя. Для этих расчетов необходимо знать условия и значения переменных, рассчитываемые и измеряемые во время пилотной заморозки. Однако моделирование позволяет сократить время разработки и оптимизации процесса, повышает скорость переноса технологического процесса на другое оборудование. В данном обзоре разобраны формулы, уравнения теплопроводности для каждой зоны охлаждения, уравнения для оценки размеров кристаллов и размера пор в высушенном слое, а также для расчета проницаемости сублимированного слоя. В статье сделаны выводы о перспективе методов моделирования этапа заморозки, рассмотрены уравнения, используемые в моделировании, и наглядно продемонстрированы модели переохлаждения, кристаллообразования и других массо- и теплообменных процессов во время этапа охлаждения и замораживания. Расчеты, представленные в этой работе, подтверждаются ссылками на экспериментальные данные и имеют большую практическую ценность.

Ключевые слова: лиофилизация, этап заморозки, математическое моделирование этапа заморозки в лиофилизации, молекулярная теория диффузии в системе Кнудсена

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-15-21

MATHEMATICAL MODELING OF THE STAGE OF FREEZING IN TECHNOLOGY OF LYOPHILIZED DRUGS

E. V. Blynskaya¹, S. V. Tishkov¹, K. V. Alekseyev², S. V. Minaev¹

¹V.V. Zakusov Institute of Pharmacology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

²Moscow medical university REAVIZ; bldg. 2, 2 Krasnobogatyrskaya St., Moscow 107564, Russia

The purpose of this work is to demonstrate the existing possibilities and methodology of mathematical modeling of the freezing phase in the technology of lyophilization of vials filled with a solution containing a pharmaceutical substance and auxiliary substances. The freezing process is crucial for the subsequent stages of primary sublimation and the drying stage. So it is at the stage of freezing that ice crystals are formed and a certain microstructure forming the pores for subsequent stages and influencing the speed of all stages in the future. The developed methods allow estimating the kinetics of cooling, freezing, calculating the sizes of ice crystals and determining the permeability of the sublimation layer. Of course, for these calculations it is necessary to know the conditions and values of the variables, calculated and measured during the pilot freezing. However, modeling allows to reduce the time of development and optimization of the process, increases the speed of transfer of the technological process to other equipment. In this review, formulas are analyzed, the thermal conductivity equations for each cooling zone, equations for estimating the crystal size and pore size in the dried layer, and calculating the permeability of the sublimated layer. The article draws conclusions about the perspective of modeling methods for the freezing phase, examines the equations used in modeling and demonstrates the model of supercooling, crystal formation and other mass and heat exchange processes during the cooling and freezing stage. The calculations presented in this paper are confirmed by references to experimental data and have great practical value.

Key words: lyophilization, freezing stage, mathematical modeling of the freezing stage in lyophilization, molecular theory of diffusion in the Knudsen system

Введение

Лиофилизация как метод создания лекарственных форм (ЛФ) получила широкое применение в фармацевтической промышленности, в частности как один из этапов подготовки субстанций для последующего включения в ЛФ (например, в таблетки). Лиофильно высушенные препараты применяются в основном для сохранения биологической активности вакцин, ферментов, пробиотических препаратов, для стабилизации белковых и пептидных фармацевтических субстанций липосомальных препаратов [1, 2], а также и для увеличения растворимости и солюбилизации плохо растворимых лекарственных средств [3, 4].

Разработка и получение стабильных лиофилизатов, соответствующих всем заданным параметрам, — довольно сложная задача, занимающая много времени и требующая дорогостоящих экспериментов для подбора режимов замораживания, сублимационного высушивания [5]. Однако для решения этих практических задач можно применить математическое моделирование процессов замораживания и лиофилизации.

Методы математического моделирования процессов лиофилизации дают возможность заранее просчитать, спрогнозировать процессы, которые могут происходить с лиофилизатом во время заморозки, сублимации и во время этапа досушивания. Необходимые данные для уравнений возможно получить благодаря таким методам исследований, как дифференциальная сканирующая калориметрия, термометрический анализ, а также другими методами анализа в совокупности со справочными данными. Все это во много раз упрощает разработку технологии процессов лиофилизации, повышает мобильность при переносе технологии с одних площадок на другие. Так, при изменении условий лиофилизации математическое моделирование дает возможность просчитать и математически обосновать необходимые изменения в режимах заморозки и сублимирования, чтобы получить продукт заданного качества.

Моделирование этапа замораживания

Для оптимизации процессов лиофилизации этап замораживания имеет критическое значение, поскольку скорость последующей первичной сублимации тесно связана с морфологией ледяного кристалла и соответствующими структурными параметрами, которые формируются во время этапа замораживания. Таким образом, главной проблемой для процесса оптимизации этого этапа является управление морфологией кристаллов льда (т. е. средними размерами ледяных кристаллов, формой и частными размерами кристаллов, распределением и т. д.).

Температурный профиль во время процесса замораживания схематизирован на рис. 1. Сначала образец

охлаждают путем снижения температуры с постоянной скоростью до некоторого уровня переохлаждения, при котором начинается зарождение кристаллов льда, а затем температура быстро увеличивается за счет скрытой теплоты, генерируемой зарождением кристаллов льда, пока не достигнет равновесия с температурой замерзания; потом температура умеренно уменьшается из-за поглощения скрытой теплоты, создаваемой ростом кристаллов льда, до полного замораживания льда, и продолжает уменьшаться до полного затвердевания криоконцентрированной фазы.

Для симулирования этих профилей температуры замораживания математическое моделирование может быть разделено на 2 этапа, а именно этап охлаждения, а затем этап замораживания.

Этап охлаждения

Необходимо симитировать этап охлаждения, чтобы получить исходное состояние температурного профиля на всем протяжении основной массы флакона для последующего этапа замораживания. Таким образом, на этапе охлаждения от $t = 0$ до отмеченного времени начала кристаллизации (t_n) моделируется при следующих условиях (условия показаны для примера, в каждом конкретном случае следует проводить измерения):

- $t = 0$: температура на всем протяжении флакона равномерна и равна примерно $15\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- $t = 0\text{--}300\text{ с}$: дно флакона в контакте с полкой лиофильной суши и поддерживается при постоянной температуре, равной $7\text{--}12\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- $t = 300\text{ с до } t_n$: нижняя часть флакона охлаждается с определенной скоростью охлаждения, например в $0,72\text{ К/мин}$.

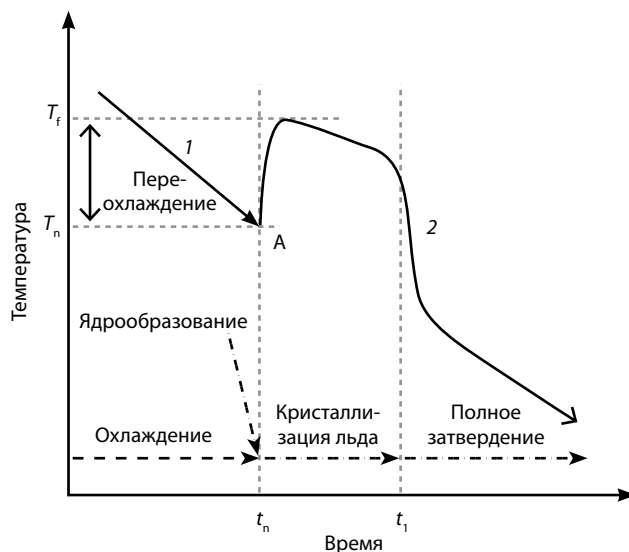


Рис. 1. Схема температурного профиля во время этапов охлаждения (1) и замораживания (2). T_f — температура фронта замораживания; T_n — температура зарождения кристаллов льда, $^{\circ}\text{C}$

Основным уравнением для моделирования этапа охлаждения служит уравнение теплопроводности (второй закон Фурье), которое применяется для всего объема рецептуры:

$$\rho C_{p-\text{liquid}} \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T), \quad (1)$$

где ρ — плотность, кг/м³;

C_p — теплоемкость, Дж/(кг·К);

T — температура, К;

t — время, с;

k — теплопроводность, Вт (м/К).

Из-за довольно небольших температурных диапазонов, участвующих в течение этого периода (диапазон ΔT между 25 и 50 К), предполагается, что плотность раствора и удельные значения теплоемкости постоянны на всем протяжении охлаждения раствора. Это предположение также принято для моделирования этапа заморозки.

Этап заморозки

На этапе заморозки образование ледяных кристаллов начинается в фиксированный момент времени (t_n), соответствующий температуре зарождения кристаллов льда (начала кристаллизации) (T_n), и впоследствии рост ледяных кристаллов развивался умеренно. Конечно, невозможно предсказать температуру начала кристаллизации, и поэтому она не рассматривается как фиксированный параметр в модели. Однако в некоторых исследованиях данная проблема решается использованием ультразвукового устройства, фиксирующего температуру начала кристаллизации кристалла льда [6]. Модель представляет собой сочетание 2 основных исследований: модели роста кристаллов льда в однородно переохлажденной жидкости [7] и модели равномерного роста кристалла льда, независимого от переохлаждения [8]. Эти 2 основных направления роста кристаллов льда возможно соединить и представить температуру начала кристаллизации ключевым параметром, который фиксирует соответствующие температурные градиенты и темпы роста ледяных кристаллов. Моделирование заморозания основано на уравнении теплопроводности, упоминаемом далее с двумя значениями, такими как тепло, вырабатываемое из скрытой теплоты начала кристаллизации льда (Q_n), и тепло, вырабатываемое из скрытой теплоты роста кристаллов льда (Q_c).

$$\rho C_{p-\text{apparent}} \frac{\partial T}{\partial t} = \nabla(k \nabla T) + Q_n + Q_c, \quad (2)$$

Предполагается, что скорость начала кристаллизации льда пропорциональна степени переохлаждения $T_f - T^*$, так что значение Q_n может быть выражено следующим образом:

$$Q_n = \Delta H_f k_i (T_f - T^*), \quad (2)$$

где ΔH_f — скрытая теплота кристаллизации, Дж/кг; T^* — температура в переохлажденной жидкости, К; T_f — температура фронта замораживания. Это значение становится равным нулю, как только переохлажденная вода полностью кристаллизуется.

Постоянная скорость начала кристаллизации k_i (кг/(м³·с·К)) может оцениваться по скорости продвижения фронта заморозания v (м/с), а именно:

$$k_i = \frac{vp}{s(T_f - T^*)}, \quad (4)$$

где T^* — однородная температура переохлаждения, К; s — толщина зоны переохлаждения, м.

Расчетное значение k_i предполагается постоянным в течение всего этапа замораживания, ($T_f - T^*$) — среднее значение на степень переохлаждения в представленной системе, которая получена из температуры самопроизвольного начала кристаллизации.

Кроме того, значение Q_c соответствует скрытой теплоте, выделяющейся при кристаллизации льда, и выражено классическим уравнением:

$$Q_c = \Delta H_f \frac{\partial}{\partial t} = (\rho X_{\text{ice}}), \quad (5)$$

где X_{ice} — ледяная фракция.

Как показано на рис. 2, в период роста кристаллов льда образец может быть разделен на 3 зоны, соответствующие 3 различным физическим состояниям, а именно: ледяную зону ($C_{p-\text{ice}}$), пористую (смешанную) зону ($C_{p-\text{mushy}}$) и зону, находящуюся в жидком состоянии ($C_{p-\text{liquid}}$).

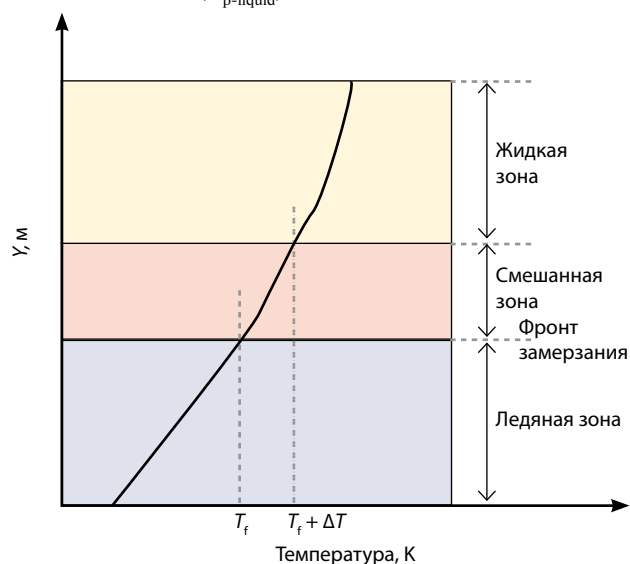


Рис. 2. Модель физических состояний модельного состава в образце. T_f — температура фронта замораживания; ΔT — разница температур; Y — расстояние от дна флакона к верхней границе замороженного раствора

Пористая зона представляет собой суспензию льда в переохлажденном растворе (ледяная фракция, X_{ice}) и обуславливается разницей температур (ΔT) между фронтом заморзания и жидкой зоной. ΔT — подходящий параметр, значение которого определяется из экспериментальных данных. Более того, предполагая, что скорость роста ледяного кристалла полностью контролировалась передачей тепла и что ледяная фракция, X_{ice} , коррелирует линейно с температурой в области фазового перехода, выражение этого значения можно записать следующим образом [9]:

$$\Delta H_f \frac{\partial}{\partial t} (\rho X_{ice}) = -\Delta H_f \rho \frac{\partial X_{ice}}{\partial T} \frac{\partial T}{\partial t} = -\Delta H_f \rho \frac{\Delta X_{ice}}{\Delta T} \frac{\partial T}{\partial t}. \quad (6)$$

Затем эти значения необходимо собрать в одно уравнение путем использования значения кажущейся теплоемкости $C_{p\text{-apparent}}$, определяющейся следующим образом [8]:

$$\rho C_{p\text{-apparent}} = \begin{cases} C_{p\text{-liquid}} & T > T_f + \Delta T \\ \frac{C_{p\text{-liquid}} + C_{p\text{-ice}}}{2} + \frac{\Delta H_f}{\Delta T} + \Delta X_{ice} & T_f \leq T \leq T_f + \Delta T, \\ C_{p\text{-ice}} & T < T_f \end{cases} \quad (7)$$

Изменения кажущейся теплопроводности и значения объемной плотности представлены в зависимости от температуры линейным законом по всей области между жидкостью и твердой зоной [10].

Условия на границах фаз

Как показано на рис. 3, на границе образца можно принять следующие условия (условия рассчитаны для примера, они могут изменяться от случая к случаю, значения соответствуют геометрическим размерам, представленным на рис. 3):

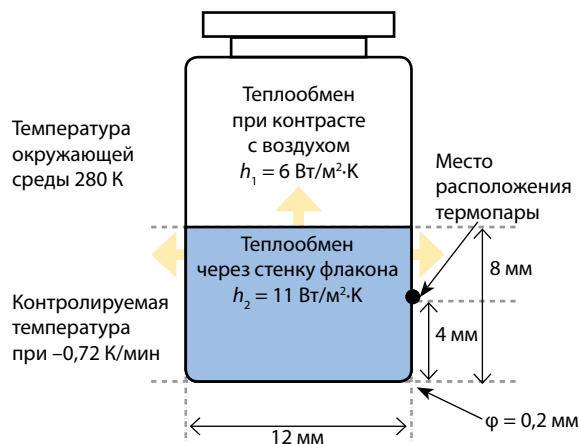


Рис. 3. Схема геометрии образца; h — конвективный коэффициент теплопередачи

- температура окружающей среды, $T_{\text{ambient}} = 280 \text{ K}$.
- конвективный теплообмен между воздухом и стеклом флакона, $h_1 = 11 \text{ Вт/(м}^2\cdot\text{K)}$ [5, 9].
- конвективный теплообмен между воздухом и верхней жидкой зоной, $h_2 = 6 \text{ Вт/(м}^2\cdot\text{K)}$ [5, 9].

Эти значения коэффициента теплопередачи, выражающие непрерывность теплового потока на границе стенки образца, введены в следующее уравнение:

$$-k \frac{\partial T}{\partial t} = h(T - T_{\text{ambient}}), \quad (8)$$

где h — конвективный коэффициент теплопередачи, $\text{Вт/(м}^2\cdot\text{K)}$.

Оценка размеров ледяных кристаллов

На основе анализа литературы и типа морфологии ледовых фаз можно принять следующий тип отношения для интерпретации данных ледовой морфологии:

$$L^* = aR^{-0,5}G^{-0,5}, \quad (9)$$

где L^* — средний размер кристаллов льда, м;

a — эмпирическая константа, которая выводится по экспериментальным данным, $\text{м}\cdot\text{с/К}$;

R — скорость заморзания, м/с ;

G — температурный градиент в замороженной зоне (К/м).

Значения R оцениваются по температурным профилям в разных местах (каждый 1 мм) от дна пробирки. Для каждой позиции (l_i) время (t_i) коррелирует с проходящим фронтом заморзания, в котором определена равновесная температура заморзания (T_f).

Значения G измеряются по температурным профилям для каждого выбранного времени (t_i), соответствующие слоям, для которых значения температуры более низкие, чем T_f , давая непосредственно величину градиента температуры (G).

Эти вычисляемые данные являются средними значениями, полученными путем усреднения частных размеров ледяных кристаллов в основной массе образца. Кроме того, оцениваются размеры распределения ледяных кристаллов в зависимости от местоположения. В целом можно отметить, что размеры ледяных кристаллов имеют тенденцию к увеличению в зависимости от высоты флакона, за исключением верхнего слоя флакона, где размеры ледяных кристаллов становятся меньше. Эта зависимость наиболее выражена в составах, в которых зарождение кристаллов льда происходит при более высоких температурах, соответствующих более низкой степени переохлаждения. Более того, такое поведение подтверждается микрофотографиями морфологии кристаллов льда



Рис. 4. Схематичное изображение кристаллов льда

и доказываемыми различными исследованиями по первичной сублимации в технологии лиофилизации [6, 11]. Схематично данные моделирования представлены на рис. 4.

Оценка проницаемости сублимационного слоя

Ранее было показано, что возможно оценить средние размеры ледяного кристалла как функцию температур начала кристаллизации. Чтобы интерпретировать зависимость скорости сублимации от морфологии кристаллов льда, проводится оценка проницаемости массопереносу воды через массу высушенного слоя как последний этап моделирования процесса заморозки. Для этого процесса принималось условие, что повышение температуры начала кристаллизации увеличит проницаемость сублимированных материалов массообмену водяным паром и способствует ускорению скорости этапа первичной сублимации во время лиофилизации. Проницаемость водяного пара, отмеченная как K , определяется следующим уравнением:

$$\bar{m} = \frac{KM_w}{R_g T} \text{grad} P, \quad (10)$$

где M_w — молекулярный вес воды, кг/кмоль;
 R_g — идеальная газовая постоянная, Дж/(кмоль·К);
 P — общее давление, Па.

В связи с этим экспериментальные значения K приблизительно оцениваются по экспериментальной величине скорости первичной сушки ($\bar{m}$) за соответствующий период сублимации на толщину высушенного слоя (e_{dry}) по следующему соотношению:

$$K_{\text{exp}} = \frac{e_{\text{dry}}}{P_s - P_c} \frac{R_g T_s}{M_w} \bar{m}, \quad (11)$$

где P_s — общее давление сублимационного фронта, Па;
 P_c — общее давление камеры, Па.

Кроме того, высушенная зона проницаемости K может теоретически оцениваться по средним значениям ледяного кристалла исходя из предположения,

что сухая структура лиофилизата представляет собой пучок трубчатых капилляров диаметром $\bar{d}_p$. В этом случае оценивают значение числа Кнудсена (Kn), затем, следуя молекулярной теории диффузии в системе Кнудсена, высчитывают проницаемость высушенного слоя K , по следующим уравнениям [12, 13]:

$$K_{\text{model}} = \frac{\varepsilon}{\tau} D_k \Omega, \quad (12)$$

где D_k — кнудсеновский коэффициент молекулярной диффузии, м²/с;

ε — пористость высушенного слоя;

τ — фактор кривизны (извилистости);

Ω — общий расход потока;

диффузия Кнудсена выражается

$$D_k = \frac{1}{3} \sqrt{\frac{8R_g T_s}{\pi M_w}} \bar{d}_p, \quad (13)$$

и коэффициент суммарного вклада потока Ω равен

$$\Omega = \frac{1}{l + \bar{d}_p/\lambda}, \quad (14)$$

где λ — средняя свободной траектории и задается

$$\lambda = \frac{k_B T_s}{\sqrt{2} \pi d_m^2 P}, \quad (15)$$

где k_B — постоянная Больцмана, Дж/К;

d_m — диаметр молекулы воды, м.

Для этих расчетов предполагается, что имеющиеся размеры ледяных кристаллов соответствуют диаметру пор ($\bar{d}_p$) (рис. 5, 6). Форм-фактор ε/τ — это эмпирическая константа, которая определяется на основе экспериментальных данных.

Приведенные графики ясно показывают, что сопротивление массопереносу водяного пара снижается по мере увеличения температуры начала кристаллизации, поэтому скорость сушки может быть ускорена за счет увеличения температуры начала кристаллизации. Следовательно, подтверждается, что для данной системы массоперенос после заморозания напрямую зависит от морфологии замороженного состава. Также из этих вычислений можно наблюдать отношения между значениями K и температурой начала кристаллизации льда для каждого набора данных.

Кроме того, существуют данные, которые подтверждают адекватность этой модели по оценке морфологических параметров ледяного кристалла и, следовательно, по оценке проницаемости для водяного пара через высушенный слой во время этапа сублимации фармацевтических препаратов внутри флаконов [14].

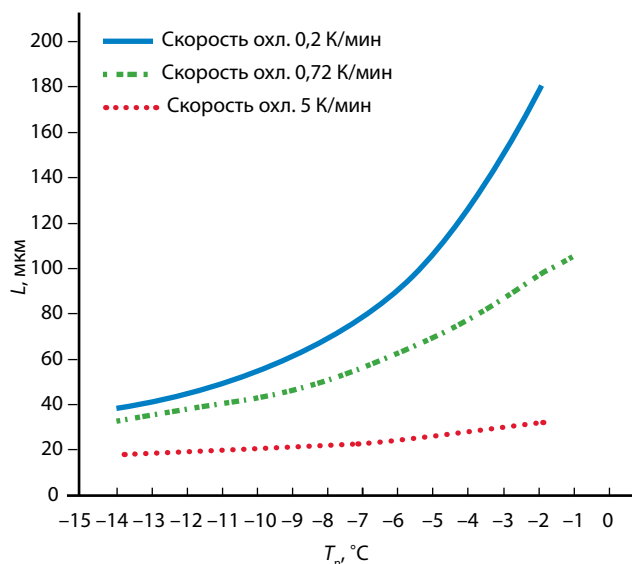


Рис. 5. Моделирование влияния скорости охлаждения на размер кристаллов льда (L). T_n — температура зарождения кристаллов льда, $^{\circ}\text{C}$

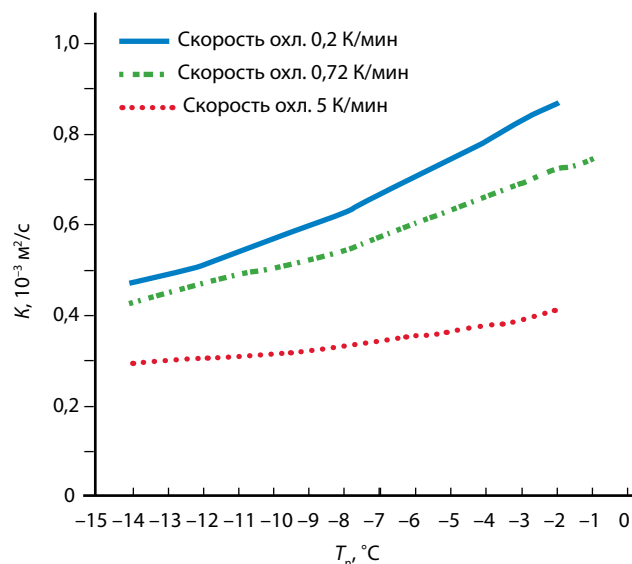


Рис. 6. Моделирование влияния скорости охлаждения на проницаемость высушенного слоя (K). T_n — температура зарождения кристаллов льда, $^{\circ}\text{C}$

Выводы

1. Математическое моделирование процессов замораживания имеет практическую ценность для оптимизации процесса лиофилизации, так как дает возможность проводить сублимацию с наилучшими показателями процесса, получая продукт высокого качества.
2. Математические методы позволяют не только рассчитывать тепловые процессы на этапе заморозки и охлаждения, но и оценивать размер ледяных кристаллов и проницаемость сублимационного слоя.

3. Формулы и уравнения могут быть использованы для расчета таких значений, как коэффициент теплопередачи, теплопроводность, скорость начала кристаллизации, теоретическая проницаемость водяного пара. Для оценки проницаемости сублимационного слоя рассмотрена молекулярная теория диффузии в системе Кнудсена.
4. Наглядно продемонстрирована модель переохлаждения, кристаллообразования и других массо- и теплообменных процессов во время этапа охлаждения и замораживания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гулякин И.Д., Хашем А., Николаева Л.Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолакарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):55–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60. [Gulyakin I.D., Hashem A., Nikolaeva L.L. et al. Development of a dosage form for the intravenous administration of an indole carbazole derivative, LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(2):55–60 (In Russ.)].
2. Ланцова А.В., Котова Е.А., Санарова Е.В. и др. Разработка лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифелина. Российский биотерапевтический журнал 2012;14(2):79–84. DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-39-42. [Lantsova A.V., Kotova E.A., Sanarova E.V. et al. Development of a lyophilized liposomal drug form of cipheline. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2015;14(2):79–84 (In Russ.)].
3. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;2:20–5. [Arshinova O.Yu., Oborotova N.A., Sanarova E.V. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of drugs. Razrabotka i Registratsiya Lekarstvennykh Sredstv = Development and registration of medicines 2013;2:20–5 (In Russ.)].
4. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков. Фармация 2017;66(1):14–8. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V., Marakhova A.I. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of peptides and proteins. Pharmatsiya = Pharmacy 2017;66(1):14–8 (In Russ.)].
5. Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологические подходы к совершенствованию процесса

- лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):6–11. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. Technological approaches to improving the process of lyophilization of protein and peptide drugs. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2017;16(1):6–11 (In Russ.)].
6. Nakagawa K., Hottot A., Vessot S. et al. Modeling of freezing step during vial freeze-drying of pharmaceuticals – influence of nucleation temperature on primary drying rate. Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering 2011;6(2): 288–293. DOI: 10.1002/apj.424.
 7. Qin F.G.F., Zhao J.C., Russell A.B. et al. Simulation and experiment of the unsteady heat transport in the onset time of nucleation and crystallization of ice from the subcooled solution. International Journal of Heat and Mass Transfer. 2003;46(17): 3221–3231. DOI: 10.1016/S0017-9310(03)00097–8.
 8. Lunardini V.J. Finite difference method for freezing and thawing in heat transfer in cold climates. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1981. 345 p.
 9. Hottot A., Peczkalski R., Vessot S. et al. Freeze-drying of pharmaceutical proteins in vials: Modeling of freezing and sublimation steps. Drying Technology 2006;24(5):561–570. DOI: 10.1080/07373930600626388.
 10. Fennema O.R., Powrie W.D., Marth E.H. Low-temperature preservation of foods and living matter. New York: Marcel Dekker, 1973. 598 p.
 11. Pikal M., Shah J.S., Senior D., Lang J.E. et al. Physical chemistry of freeze-drying: Measurement of sublimation rates for frozen aqueous solutions by a microbalance technique. Journal of pharmaceutical sciences 1983;72(6):635–50. DOI: 10.1002/jps. 2600720614.
 12. Simatos D., Blond G., Dauvois P., Sauvageot F. La Lyophilisation – Principes et Applications. France: Collection de l'A.N.R.T., 1973:349–58. DOI: 10.1002/aic.11147.
 13. Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Determination of mass and heat transfer parameters during freeze-drying cycles of pharmaceutical products. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology 2005;59(2):138–53. DOI: 10.1016/0378-5173(95)00094-Y.
 14. Nakagawa K., Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Modeling of freezing step during freeze-drying of drugs in vials. AIChE Journal 2007;53(5):1362–72. DOI:10.1002/aic.11147.

ИНГИБИТОРЫ ТИРОЗИНКИНАЗЫ EGFR В ЛЕЧЕНИИ МЕТАСТАЗОВ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО EGFRm В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ

Д.Р. Насхлеташвили, В.А. Горбунова, М.Б. Бычков, А.Х. Бекашев, В.Б. Карахан,
В.А. Алешин, Е.А. Москвина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Давид Романович Насхлеташвили nas-david@yandex.ru

В структуре метастатического поражения головного мозга рак легкого занимает первое место. В обзоре представлены методы лечения метастатического поражения головного мозга при немелкоклеточном раке легкого: от локальных методов лечения (облучение всего головного мозга, стереотаксическая радиохirurgия и хирургия опухолей центральной нервной системы) до системной противоопухолевой лекарственной терапии с акцентом на новые таргетные препараты (ингибиторы EGFR), которые показали высокую эффективность при метастазах немелкоклеточного рака легкого в центральную нервную систему.

Ключевые слова: головной мозг, метастазы, немелкоклеточный рак легкого, ингибиторы EGFR

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-22-30

EGFR TYROSINE KINASE INHIBITORS IN THE TREATMENT OF METASTASES OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER IN THE BRAIN

D.R. Naskhletashvili, V.A. Gorbunova, M.B. Bychkov, A.Kh. Bekyashev, V.B. Karakhan, V.A. Aleshin, E.A. Moskvina

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe shosse, Moscow 115478, Russia

Brain metastases are very common in non-small cell lung cancer. The condition of these patients is complicated and difficult to treat, and adverse reactions following treatment can affect the nervous system, which severely reduces quality of life. In this review we discuss the methods in use from local therapies such as whole brain irradiation, stereotactic radiosurgery and central nervous system surgery to systemic therapy. We also highlight drugs for targeted therapy of non-small lung cancer cells metastasis in the brain that have been effective in the treatment of metastases in central nervous system.

Key words: brain, metastases, non-small cell lung cancer, EGFR inhibitors

В последние годы отмечается увеличение частоты метастатических опухолей головного мозга. Рак легкого занимает первое место среди злокачественных опухолей в структуре метастатического поражения головного мозга (до 48 %) [1, 2].

Пациенты с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ) — гетерогенная группа больных. У 10 % людей европеоидной расы и у 30–50 % азиатов при аденокарциноме легкого выявляются драйверные мутации в гене *EGFR* [3]. В 90–95 % случаев это мутации экзонов 19 и 21 гена *EGFR* [4]. У больных аденокарциномой легкого с мутациями в гене *EGFR* выше продолжительность жизни и частота метастатического поражения головного мозга (ГМ). При первичном диагнозе НМРЛ метастазы в ГМ выявляются у 19–25 % пациентов с мутацией в гене *EGFR* в сравнении с 7–13 % пациентов с диким типом ре-

цептора EGF, а доля больных НМРЛ EGFRm, у которых метастазы появляются в центральной нервной системе (ЦНС) в процессе лечения, достигает 44 % [5–9].

При этом увеличение частоты клинически проявляемых метастазов связано как с совершенствованием диагностики, внедрением в клиническую практику компьютерной и магнитно-резонансной томографии, так и с увеличением продолжительности ремиссий и жизни больных при использовании более эффективных современных программ лечения [10, 11].

Чаще всего метастазы в ГМ множественные, с минимальным перифокальным отеком и имеют малые размеры. Метастазы в ГМ ассоциируются с плохим прогнозом заболевания: медиана общей выживаемости (ОВ) от 4–11 нед у нелеченых

пациентов и 4–15 мес у пациентов, находящихся на терапии [12, 13].

Цель нашего обзора заключается в обобщении доступных методов лечения метастатического поражения ГМ при НМРЛ: от местных методов терапии, таких как облучение всего мозга (WBRT), стереотаксическая радиохирургия (SRS) и хирургия ЦНС, и до системной терапии с акцентом на новые таргетные препараты, которые показали эффективность при метастазах НМРЛ в ЦНС.

Лучевая терапия (ЛТ) на область ГМ является стандартным методом лечения больных с метастатическим поражением ГМ. Режим лечения включает 14 фракций по 2,5 Гр до суммарной очаговой дозы 35 Гр (или 10 фракций по 3,0 Гр до суммарной очаговой дозы 30 Гр). ЛТ снижает неврологический дефицит, зависимость от стероидов. Использование ЛТ позволяет увеличить среднюю продолжительность жизни больных с метастазами в ГМ с 1–2 мес (больные, получающие симптоматическую терапию стероидами) до 2,3–7,1 мес в зависимости от класса больных по рекурсивному парциальному анализу (RPA) [14]. При этом следует также учитывать риск когнитивных нарушений при ЛТ на весь ГМ, который увеличивается у пациентов с более длительной выживаемостью (1 год и более), с относительно хорошим прогнозом. При метастазах в ГМ до 3,0 см в диаметре и числе очагов до 4 (а по данным последних исследований, и до 10 очагов в ГМ) возможно проведение стереотаксической радиохирургии. Прогностически значимыми факторами являются состояние больного (по шкале Карновского или шкале ECOG), возраст и наличие экстракраниальных метастазов, системный контроль заболевания.

В случае солитарных метастазов в ГМ (отсутствия метастазов в другие органы, единичный очаг в ГМ) методом выбора на первом этапе лечения является хирургическое удаление метастатического узла с последующей ЛТ и противоопухолевой лекарственной терапией. При множественных метастазах в ГМ хирургическое удаление метастатических узлов из ГМ рекомендуется по клинико-рентгенологическим показаниям (выраженный неврологический дефицит, масс-эффект опухоли, угроза вклинения, ликвородинамические нарушения) при условии системного контроля опухолевого процесса [15, 16].

К сожалению, только ЛТ и хирургическое лечение не могут полностью решить проблему увеличения продолжительности и сохранения качества жизни больных НМРЛ с метастазами в ЦНС. С учетом неудовлетворительных результатов выживаемости проводятся исследования по изучению новых схем противоопухолевой лекарственной терапии у больных с метастазами НМРЛ в ГМ. При этом остаются не до конца решенными вопросы об эффективности

противоопухолевой лекарственной терапии в лечении метастатического опухолевого процесса в ГМ. Это связано с относительно небольшим количеством исследований препаратов с включением пациентов с церебральными метастазами — тяжелой и прогностически неблагоприятной группы больных, которые нуждаются в выраженном и быстро развивающемся эффекте терапии, а также в удобстве приема (пероральные формы лекарственных препаратов) и благоприятном профиле токсичности препаратов.

Следует также принимать во внимание факторы, влияющие на проницаемость гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для лекарственных препаратов. ГЭБ, в частности, представляет собой метаболически регулируемую микросреду, которая способствует пролиферации опухолевых клеток после экстравазации в периваскулярном пространстве или паренхиме ГМ [5]. ГЭБ также является физиологическим препятствием для доставки лекарственных веществ в ЦНС и может способствовать развитию резистентности к терапии.

На проницаемость ГЭБ влияют молекулярная масса и размеры молекул (чем меньше вещество, тем легче оно диффундирует через клеточную мембрану путем свободной диффузии), липофильность (липофильные структурные элементы клеточной мембраны, а также плотные межклеточные контакты снижают количество веществ, которые могут свободно диффундировать через ГЭБ) и эффлюкс-система (система активного транспорта, способная выводить лекарственные препараты из ЦНС).

Ранние исследования традиционных системных химиотерапевтических препаратов показали клиническую пользу последних у больных при метастазировании НМРЛ в ЦНС, особенно при бессимптомном течении заболевания, благодаря чему часто удавалось избежать местных вмешательств, таких как хирургия и ЛТ [17, 18]. Частота интракраниального ответа при применении химиотерапевтических препаратов достигает 68 % у пациентов с бессимптомными метастазами, однако время до прогрессирования (ВБП) обычно ограничивается несколькими месяцами, а ОВ составляет от 5 до 16 мес [19]. Лучшие интракраниальные эффекты были достигнуты с использованием схем, содержащих цисплатин и пеметрексед или бевацизумаб, карбоплатин и паклитаксел [19].

В последние годы изучаются различные режимы лечения в зависимости от гистологической формы опухоли и молекулярно-генетических факторов. Произошли существенные изменения в тактике лечения опухолевых заболеваний благодаря внедрению в клиническую практику таргетных препаратов — ингибиторов тирозинкиназы (ИТК) EGFR и ALK, которые показали высокую эффективность в системном контроле опухолевого процесса [20–23].

Первые описания клинических случаев, подтверждающие эффективность гефитиниба (ИТК EGFR) у больных с метастазами в ГМ, были опубликованы в 2003–2005 гг. [20–23].

В 2011 г. на конгрессе Американского общества клинической онкологии (American Society of Clinical Oncology, ASCO) были представлены результаты нескольких исследований по изучению ИТК EGFR гефитиниба в лечении больных НМРЛ с метастазами в ГМ. Было показано, что ИТК EGFR высокоэффективны (от 66 до 89 % объективных ответов, ВБП – от 6,6 до 10 мес) при метастатическом поражении ГМ у больных аденокарциномой легкого с мутацией в гене *EGFR* [24, 25].

Во II фазе исследования гефитиниба в Японии была проведена оценка эффективности лечения 41 пациента [26]. Объективный эффект в ГМ был достигнут у 87,5 % больных с медианой ВБП 14,5 мес (95 % доверительный интервал (ДИ) 10,2–18,3 мес) и медианой ОВ 21,9 мес (95 % ДИ 18,5–30,1 мес). В другом исследовании эффект гефитиниба и эрлотиниба был оценен у 31 пациента с НМРЛ с синхронными (выявлены при установлении диагноза рака легкого) бессимптомными метастазами в ГМ. Контроль опухолевого роста в ГМ (стабилизации длительностью более 6 мес плюс частичные и полные регрессии) составил 96,9 %, медиана ВБП – 7,1 мес, медиана ОВ – 18,8 мес [27].

Эрлотиниб и гефитиниб, несмотря на их небольшой молекулярный вес, имеют различные фармакологические характеристики в отношении ЦНС [28]. Было показано, что эрлотиниб определяется в высокой концентрации в зоне метастатического поражения ГМ в отличие от нормальной ткани ГМ. Однако OSI-420, активный метаболит эрлотиниба, является субстратом Р-гликопротеина (Р-gp) эффлюкс-системы, что снижает концентрацию препарата в ЦНС [29]. Гефитиниб ингибирует активность Р-гликопротеинов, при этом ни один из его известных метаболитов не является субстратом эффлюкс-системы [30]. К сожалению, оба препарата имеют невысокую концентрацию в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). При стандартной дозировке уровень концентрации их в ЦСЖ ниже, чем в плазме. Концентрация эрлотиниба в ЦСЖ составляет около 5 % от концентрации в плазме крови, а гефитиниба – около 2,5 % [31, 32].

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина проведено исследование по оценке эффективности таргетной терапии у больных НМРЛ с церебральными метастазами. Таргетную терапию эрлотинибом или гефитинибом проводили 45 больным НМРЛ с метастатическим поражением ГМ. У 25 больных (группа А) были выявлены драйверные мутации гена *EGFR*, у 20 пациентов (группа В) не было мутаций гена *EGFR*

в опухоли. В группе А в 3 (12,0 %) случаях достигнута полная регрессия метастазов в ГМ, в 16 (64,0 %) случаях – частичная регрессия. Медиана ВБП составила 10 мес. Медиана ОВ составила 17,0 мес. В группе В не было отмечено объективных ответов. Медиана ВБП в группе В составила 2 мес, а медиана ОВ – 4 мес. Различия в эффекте лечения, медиане ВБП и ОВ между группами А и В статистически значимы ($p < 0,05$). Таким образом, было показано, что применение ИТК EGFR при наличии драйверных мутаций в гене *EGFR* в опухоли позволяет достоверно увеличить эффективность лечения и выживаемость больных НМРЛ с церебральными метастазами [33, 34].

Ингибитор тирозинкиназы EGFR 2-го поколения афатиниб также изучался у больных НМРЛ с мутациями EGFR и с метастазами в ГМ.

Два исследования – LUX–Lung 3 и LUX–Lung 6 – включали 42 (12,2 %) и 49 (13,5 %) пациентов соответственно с клинически бессимптомными и контролируемыми метастазами в ГМ, большинство из которых имели общие мутации в гене *EGFR* ($n = 81$ (89 %)) [35, 36]. Среди этих пациентов с метастазами в ГМ наблюдалась тенденция к повышению ВБП при лечении афатинибом по сравнению со стандартной химиотерапией как в LUX–Lung 3 (11,1 мес против 5,4 мес, отношение рисков (ОР) 0,54; 95 % ДИ 0,23–1,25; $p = 0,1337$), так и в LUX–Lung 6 (8,2 мес против 4,7 мес, ОР 0,47; 95 % ДИ 0,18–1,21; $p = 0,1060$). Комбинированный анализ обоих исследований показал значительное улучшение ВБП для группы, получавшей афатиниб, по сравнению с группой химиотерапии (8,2 мес против 5,4 мес, ОР 0,50; 95 % ДИ 0,27–0,95; $p = 0,0297$). Следует отметить, что преимущество ВБП в отношении афатиниба по сравнению с химиотерапией было связано с предшествующим облучением всего ГМ, при этом медианные значения ВБП составляли 13,8 мес против 4,7 мес (ОР 0,37; 95 % ДИ 0,12–1,17; $p = 0,0767$) для пациентов с предшествующим облучением всего ГМ ($n = 24$) и 6,9 мес против 5,4 мес (ОР 0,62; 95 % ДИ 0,28–1,36; $p = 0,2222$) для пациентов без предшествующего облучения всего ГМ ($n = 57$). Одним из возможных объяснений этого вывода является то, что облучением всего ГМ, за которым следует терапия афатинибом, может давать большую ВБП. Вероятно, это связано с тем, что облучение всего ГМ, возможно, нарушило ГЭБ и тем самым облегчило проникновение афатиниба в мозг [35, 36]. Частота прогрессирования за счет метастазов в ЦНС у пациентов с метастазами в ЦНС на исходном уровне была одинаковой для подгруппы афатиниба (LUX–Lung 3: $n = 9$, или 45,0 %; LUX–Lung 6: $n = 6$, или 21,4 %) и химиотерапии (LUX–Lung 3: $n = 5$, или 33,3 %; LUX–Lung 6: $n = 5$, или 27,8 %).

Аналогичные показатели прогрессирования в ЦНС наблюдались в 2 исследованиях у всех пациентов без метастазов в ЦНС на исходном уровне (LUX–Lung 3: $n = 3$, или 3,7 %; LUX–Lung 6: $n = 4$, или 4,7 %). Медиана ОВ у пациентов с метастазами в ЦНС не различалась значительно между группами афатиниба и химиотерапии – LUX–Lung 3: 19,8 мес против 23,2 мес соответственно, ОР 1,15; 95 % ДИ 0,49–2,67; $p = 0,7517$; LUX–Lung 6: 22,4 мес против 24,7 мес, ОР 1,13; 95 % ДИ 0,56–2,26; $p = 0,7315$) или при объединенном анализе данных (22,4 мес против 25,0 мес, ОР 1,14; 95 % ДИ 0,66–1,94; $p = 0,6412$) [35, 36].

Поскольку эффективность лечения НМРЛ EGFRm с метастатическим поражением ЦНС только ИТК EGFR 1–2-го поколения оставляла желать лучшего, исследователи изучали эффективность комбинации ИТК EGFR с ЛТ. Доклинические исследования показали синергетический эффект комбинации ИТК EGFR и ЛТ [37]. Возможно, это связано с радиосенсибилизирующим эффектом ИТК EGFR и повреждением ГЭБ вследствие воздействия ЛТ [37, 38]. В нескольких исследованиях было показано, что облучение ГМ может привести к повышению проницаемости ГЭБ, что играет важную роль в повышении концентрации ИТК EGFR в ЦСЖ [39–41].

Кроме того, в различных исследованиях II фазы оценивали эффективность и токсичность сочетанного лечения. В исследовании II фазы S. Ma и соавт. изучали сочетание ЛТ на весь ГМ и гефитиниба у 21 пациента с метастазами НМРЛ в ГМ. Все пациенты получили ЛТ в дозе 40 Гр (20 фракций по 2 Гр). Лечение гефитинибом начиналось в процессе ЛТ и продолжалось до прогрессирования или неприемлемой токсичности. У 4 (19 %) пациентов был достигнут полный эффект, у 13 (62 %) – частичная регрессия

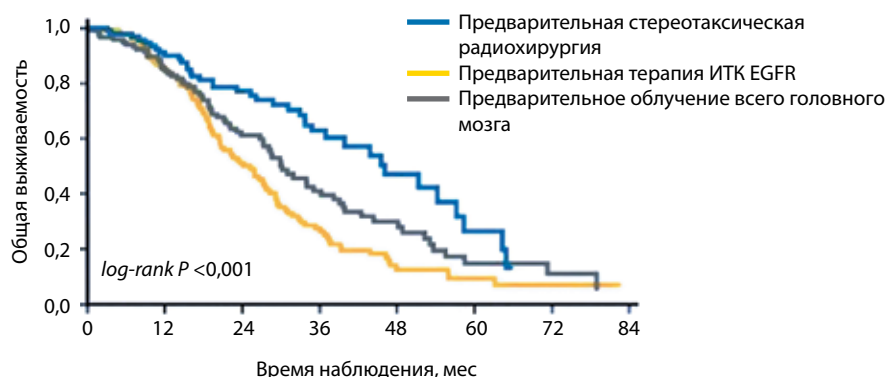
в ГМ. Медиана ВБП и ОВ составили 10,0 мес (95 % ДИ 7,5–12,5 мес) и 13,0 мес (95 % ДИ 8,2–17,8 мес) соответственно [42]. Эрлотиниб показал аналогичные результаты в исследовании II фазы, в котором 40 пациентов с НМРЛ с метастазами в ГМ, без отбора по EGFR-мутации, получали стандартные дозы эрлотиниба и параллельно ЛТ на весь ГМ. Объективный ответ составил 86 %, медиана ОВ 11,8 мес (95 % ДИ 7,4–19,1 мес). Статус мутации в гене *EGFR* был известен в 17 случаях, и медиана ОВ составила 19,1 мес у больных с мутацией *EGFR* против 9,3 мес без мутаций *EGFR* [43].

В настоящее время широко обсуждается вопрос лучшей последовательности ЛТ и ИТК EGFR при метастазах НМРЛ в ГМ. Так, в исследовании W.J. Magnuson и соавт. предварительная стереотаксическая радиохирургия, за которой следует эрлотиниб, демонстрирует преимущество по показателю медианы ОВ по сравнению с предварительной терапией эрлотинибом с последующей ЛТ или по сравнению с предварительным облучением всего ГМ с последующим назначением эрлотиниба (см. рисунок) [44].

Тем не менее сочетание ИТК EGFR в качестве радиосенсибилизаторов и ЛТ в лечении метастазов в ГМ должно быть исследовано дополнительно. На сегодняшний день нет проспективных рандомизированных исследований, в которых сравнивали бы сочетание ЛТ с ИТК EGFR с одной ЛТ и с ИТК EGFR в монотерапии.

Результаты эффективности терапии метастатического поражения ЦНС при НМРЛ EGFRm изменились с появлением ИТК EGFR 3-го поколения осимертиниба (Тагриссо). Это селективный ИТК EGFR, эффективный как при активирующих мутациях в гене *EGFR*, так и при мутации резистентности T790M.

Предварительная стереотаксическая радиохирургия, за которой следует эрлотиниб, демонстрирует преимущество по показателю «медиана общей выживаемости» по сравнению с предварительной терапией эрлотинибом с последующей лучевой терапией или по сравнению с предварительным облучением всего головного мозга с последующим назначением эрлотиниба



Предварительная стереотаксическая радиохирургия	100	76	51	29	13	5	1	1
Предварительная терапия ИТК EGFR	120	97	52	27	15	6	3	1
Предварительное облучение всего головного мозга	131	103	54	24	8	4	2	0

Лучшая последовательность лучевой терапии и ИТК EGFR 1-го поколения при метастазах в головном мозге (адаптировано из [44])

Доклиническое исследование, в ходе которого сравнивали проникновение в ГМ и активность осимертиниба и других ИТК EGFR, показало, что концентрация осимертиниба (ИТК EGFR 3-го поколения) в ГМ была значительно выше, чем у gefitinib: $C_{\max}$ 2,8 и 0,17 ммоль соответственно, а для афатиниба концентрация препарата в ГМ была ниже предела количественного определения. Аналогичные данные получены и для отношения концентраций ГМ/плазма: осимертиниб — 3,4, gefitinib — 0,21, афатиниб — <0,36. Кроме того, осимертиниб вызвал регрессию опухоли в ксенотрансплантантной модели EGFRm метастазов в ГМ. Эти данные говорят о потенциальной высокой клинической эффективности осимертиниба по сравнению с другими ИТК EGFR [45].

Одними из первых клинических исследований осимертиниба у пациентов с метастазами в ЦНС были исследования его применения во 2-й линии терапии НМРЛ EGFRm у больных с прогрессированием заболевания на фоне ИТК EGFR и выявленной мутацией T790M, которая является наиболее распространенной причиной приобретенной резистентности и составляет до 51–68 % всех ее случаев [46, 47]. Осимертиниб был разработан как специфичный ИТК EGFR, действующий при мутации T790M, при этом он активно работает и при драйверных мутациях в гене *EGFR*. Клинические исследования I–III фаз AURA, AURA2, AURA3 продемонстрировали высокую эффективность осимертиниба при лечении пациентов НМРЛ EGFRm с метастазами в ЦНС и лептоменингеальными метастазами, а также снижение вероятности прогрессирования в ЦНС [48, 49, 52–54].

Осимертиниб (Тагриссо) получил ускоренное одобрение FDA (Food and Drug Administration, Управление по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США) у больных с мутацией T790M в гене *EGFR* на основании результатов исследований I и II фазы AURA и AURA2. Отдельно оценивали эффект лечения пациентов с метастазами НМРЛ в ГМ [49–51]. Сводный анализ результатов исследований AURA и AURA2 показал, что у 31 % пациентов (128 пациентов из 411) были метастазы в ГМ [52]. Объективный ответ составил 61 %, и он отмечался у 56 и 64 % пациентов с метастазами в ГМ и без них соответственно. Сообщалось о случаях полных регрессий метастазов в ГМ.

На конгрессе ASCO 2017 были представлены результаты исследования AURA3. Главными критериями включения в исследование были:

- 1) местно-распространенный или метастатический НМРЛ;
- 2) прогрессирование заболевания после терапии ИТК EGFR в первой линии;

3) зарегистрированная драйверная мутация в гене *EGFR* с подтверждением мутации T790M EGFR в ткани опухоли после первой линии терапии ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений;

4) не более 1 линии предшествующей терапии прогрессирующего НМРЛ;

5) допустимость стабильных бессимптомных метастазов в ЦНС.

Для группы осимертиниба зафиксированы более длительная ВБП и более высокая частота объективных ответов по сравнению с группой химиотерапии (пеметрексед + производные платины) у пациентов с метастазами в ЦНС. Медиана ВБП у пациентов с метастазами в ЦНС составила 8,5 мес в группе осимертиниба по сравнению с 4,2 мес в группе химиотерапии. Частота объективных ответов (полные и частичные регрессии) у пациентов с метастазами в ЦНС составила 70 % в группе осимертиниба по сравнению с 31 % в группе химиотерапии, а медиана длительности ответа 8,9 мес и 5,7 мес соответственно. Эффекты у пациентов с метастазами в ЦНС наблюдались независимо от статуса предшествующей ЛТ на область ГМ. Показана также активность осимертиниба у пациентов с лептоменингеальными метастазами [53–55].

Безусловно, такие результаты эффективности осимертиниба во 2-й линии терапии НМРЛ EGFRm у пациентов с метастатическим поражением ЦНС значительно отличаются от альтернативной терапии. Еще более впечатляют результаты исследования FLAURA (международное рандомизированное двойное слепое исследование III фазы): действие осимертиниба в 1-ой линии терапии НМРЛ EGFRm изучали в сравнении со стандартной терапией ИТК EGFR (gefitinib, erlotinib) [56]. Допускалось включение в исследование пациентов с несопровождающимися неврологическими симптомами или стабильными метастазами в ЦНС, они составили 23 % всех больных, включенных в исследование (по «заслепленной» независимой централизованной экспертной оценке — BICR). Осимертиниб продемонстрировал номинальное статистически значимое улучшение ВБП (для пациентов с метастатическими очагами в ЦНС) по сравнению с препаратами сравнения ИТК EGFR: медиана ВБП при метастазах в ЦНС не была достигнута для подгруппы, получавшей осимертиниб (95 % ДИ 16,5 — не достигнуто), для подгруппы ИТК EGFR медиана ВБП составила 13,9 мес (95 % ДИ 8,3 — не достигнуто); зрелость данных для оценки событий прогрессирования в ЦНС, включая смерть: 30 % на фоне Тагриссо, 45 % на фоне стандартной терапии ИТК EGFR. Частота объективного ответа для пациентов с измеримыми метастазами в ЦНС составила 91 % в подгруппе осимертиниба (95 % ДИ 71–99), при этом у 5 пациентов был зарегистрирован полный ответ и 68 % в подгруппе gefitinib/erlotinib

(95 % ДИ 43–87), в этой подгруппе не было зафиксировано полных ответов и было 2 случая прогрессирования заболевания после проведенной ЛТ ГМ в анамнезе. Не менее важным является тот факт, что при использовании осимертиниба у меньшего числа пациентов выявлено прогрессирование в ЦНС — 20 % по сравнению с современным стандартом ИТК EGFR 39 %, и меньше пациентов с прогрессированием заболевания в виде появления новых очагов в ЦНС относительно препаратов сравнения ИТК EGFR: 12 % и 30 % соответственно. Таким образом, можно говорить о том, что Тагриссо способствует профилактике метастазирования НМРЛ в ЦНС [56].

Сводная таблица по эффективности терапии метастатического поражения ЦНС у пациентов с НМРЛ EGFR разными ИТК EGFR приводится исключительно для обобщенного представления имеющихся данных.

В заключение отметим, что ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений являются эффективными в лечении пациентов с НМРЛ с метастазами в ГМ, с драйверны-

ми мутациями в гене EGFR. Сочетание ИТК EGFR с другими вариантами лечения, такими как хирургия, радиотерапия, может улучшить результаты лечения. Несмотря на то что ИТК EGFR 1-го и 2-го поколений показали высокую непосредственную эффективность, через короткий промежуток времени (в среднем 9–13 мес) отмечается прогрессирование болезни. Одной из основных причин этого является метастатическое поражение ЦНС. Развитие мутации EGFR T790M — наиболее распространенная причина приобретенной резистентности. С учетом неизбежного развития лекарственной устойчивости появление 3-го поколения ИТК EGFR (осимертиниба), способного воздействовать и при активирующих мутациях в гене EGFR и при мутации T790M и преодолеть вторичную резистентность, с доказанной высокой концентрацией в ГМ и ЦСЖ и эффективностью при лечении пациентов с НМРЛ EGFRm с метастазами в ЦНС и лептоменингеальными метастазами, а также снижающего вероятность прогрессирования в ЦНС, имеет

Эффективность терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR метастатического поражения центральной нервной системы у пациентов с немелкоклеточным раком легкого

Исследование, число пациентов	Характеристика пациентов	Препарат	Число пациентов с метастазами в ЦНС (%)	Медиана ВВП, мес	Частичный объективный ответ, %	Медиана ОВ, мес
LL3 (n = 345) [35, 36]	Пациенты с НМРЛ EGFRm без предшествующей системной терапии ИТК EGFR/антинеопластической терапии с клинически бессимптомными и контролируруемыми метастазами в ГМ	Афатиниб	42 (12,2 %)	11,1	70	19,8
LL6 (n = 364) [35, 36]	Пациенты (азиаты) с НМРЛ EGFRm без предшествующей системной терапии ИТК EGFR/антинеопластической терапии с клинически бессимптомными и контролируруемыми метастазами в ГМ	Афатиниб	49 (13,5 %)	8,2	75	22,4
Объединенный анализ LL3 + LL6 (n = 709) [35, 36]	Пациенты с НМРЛ EGFRm без предшествующей системной терапии ИТК EGFR/антинеопластической терапии с клинически бессимптомными и контролируруемыми метастазами в ГМ с предшествующим облучением всего ГМ	Афатиниб	24 (30 %) (3 %)	13,8	82 (del19), 60 (L858R)	22,4
	Пациенты с НМРЛ EGFRm без предшествующей системной терапии ИТК EGFR/антинеопластической терапии с клинически бессимптомными и контролируруемыми метастазами в ГМ без предшествующего облучения всего ГМ	Афатиниб	57 (70 %)	6,9		
FLAURA (n = 556) [56]	Пациенты НМРЛ EGFRm без предшествующей системной терапии ИТК EGFR / антинеопластической терапии с несопровождающимися неврологическими симптомами или стабильными метастазами в ЦНС (измеримыми и/или не поддающимися измерению метастазами в ЦНС)	Гефитиниб/эрлотиниб	67 (24 %)	13,9 (95 % ДИ (8,3, НД))*	68 (подгруппа с измеримыми метастазами в ЦНС)	Нет данных
FLAURA (n = 556) [6]		Осимертиниб	61 (22 %)	Не достигнута (95 % ДИ 16,5 — не достигнуто)*	91 (подгруппа с измеримыми метастазами в ЦНС)	Нет данных

*Зрелость данных для оценки событий прогрессирования в центральной нервной системе, включая смерть, 30 % на фоне осимертиниба, 45 % на фоне стандартной терапии ингибиторами тирозинкиназы EGFR. ОВ — общая выживаемость; НМРЛ — немелкоклеточный рак легкого; ГМ — головной мозг; ИТК — ингибиторы тирозинкиназы; ЦНС — центральная нервная система; ДИ — доверительный интервал; ВВП — выживаемость без прогрессирования.

большое значение и представляется весьма перспективным. А данные по эффективности Тагриссо в первой линии терапии НМРЛ EGFRm, в том числе у пациентов с метастазами в ЦНС и без них, и продемонстрированному преимуществу использования осимертиниба по сравнению с текущим стандартом терапии ИТК EGFR (гефитиниб, эрлотиниб) по ВВП, частичному объективному ответу и снижению частоты прогрессирования в ЦНС позволяют рекомендовать его как препарат выбора. За последние годы значительно улучшилось понимание биологии

и механизмов метастатического поражения ГМ, работы ГЭБ, проникновения противоопухолевых препаратов в ЦНС. В будущем, с изучением новых мишеней, активно развивающаяся таргетная терапия будет играть все большую роль в лечении церебральных метастазов [57, 58]. Необходимы также проспективные рандомизированные исследования по изучению ИТК EGFR с параллельной ЛТ на весь ГМ или без нее либо со стереотаксической радиотерапией в группах пациентов, отобранных на основе EGFR мутационного статуса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Wen P.Y., Black P.M., Loeffler J.S. Cancer: Principles and Practice of Oncology (6th ed.). In: Metastatic Brain Cancer. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. P. 2655–2670.
- Tabouret E., Chinot O., Metellus P. et al. Recent trends in associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(5):339–46. DOI: 10.1093/jnci/dji055. PMID: 15741570.
- Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004;350(21):2129–39. DOI: 10.1056/NEJMoa040938 PMID: 15118073.
- D'Antonio C., Passaro A., Gori B. et al. Bone and brain metastasis in lung cancer: recent advances in therapeutic strategies. *Ther Adv Med Oncol* 2014;6(3):101–14. DOI: 10.1177/1758834014521110. PMID: 24790650.
- Han G., Bi J., Tan W. et al. A retrospective analysis in patients with EGFR-mutant lung adenocarcinoma: is EGFR mutation associated with a higher incidence of brain metastasis? *Oncotarget* 2016;7(35):56998–7010. DOI: 10.18632/oncotarget.10933. PMID: 27486770.
- Stanic K., Zwitter M., Hitij N.T. et al. Brain metastases in lung adenocarcinoma: impact of EGFR mutation status on incidence and survival. *Radiol Oncol* 2014;48(2):173–83. DOI: 10.2478/raon-2014-0016. PMID: 24991207.
- Rangachari D., Yamaguchi N., VanderLaan P.A. et al. Brain metastases in patients with EGFR-mutated or ALK-rearranged non-small-cell lung cancers. *Lung Cancer* 2015;88(1):108–11. DOI: 10.1016/j.lungcan.2015.01.020. PMID: 25682925.
- Langer C.J., Mehta M.P. Current management of brain metastases, with a focus on systemic options. *J Clin Oncol* 2005;23(25):6207–19.
- Schouten L.J., Rutten J., Huvneers H.A. et al. Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma. *Cancer* 2002;94:2698–705. PMID: 12173339.
- Tabouret E., Chinot O., Metellus P. et al. Recent trends in epidemiology of brain metastases: an overview. *Anticancer Res* 2012;32:4655–62. PMID: 23155227.
- Sundstrom J.T., Minn H., Lertola K.K., Nordman E. Prognosis of patients treated for intracranial metastases with whole-brain irradiation. *Ann Med* 1998;30:296–9. PMID: 9677016.
- Besse B., Le Moulec S., S  n  lard H. et al. A phase II trial of bevacizumab in combination with first-line chemotherapy or second-line erlotinib in non-squamous NSCLC patients with asymptomatic untreated brain metastases. *Ann Oncol* 2012;23:9. Abstr 1299.
- Gaspar L., Scott C. Rotman L. et al. Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in there Radiation Therapy Oncology Groups (RTOG) brain metastases trials. *Int. J. Radiat Oncol Biol Phys.* 1997;43:745–51. DOI: 10.1016/S0360-3016(96)00619-0.
- NCCN Guidelines. Портал национальной всеобщей онкологической сети nccn.org. [Электронный ресурс] 25.01.18 version 2.2018-december 19, 2017. URL: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/nscl.pdf.
- Горбунова В.А., Артамонова Е.В., Бредер В.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению немелкоклеточного рака легкого. Злокачественные опухоли. 2017. URL: https://rosoncweb.ru/standarts/RUSSCO/2017/recoms2017_01.pdf.
- Gorbunova V.A., Artamonova E.V., Breder V.V. et al. Practical recommendations for drug treatment of non-small cell lung cancer. *Zlokachestvennye opukholi = Malignant Tumors*. 2017. URL: https://rosoncweb.ru/standarts/RUSSCO/2017/recoms2017_01.pdf. (In Russ.).
- Minotti V., Crino L., Meacci M.L. et al. Chemotherapy with cisplatin and teniposide for cerebral metastases in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer* 1998;20:93–8. PMID: 9711527.
- Kelly K., Bunn Jr P.A. Is it time to re-evaluate our approach to the treatment of brain metastases in patients with non-small cell lung cancer? *Clin Cancer Res* 1998;20:85–91. PMID: 9711526.
- Besse B., Le Moulec S., Mazi  res J. et al. Bevacizumab in Patients with Nonsquamous Non-Small Cell Lung Cancer and Asymptomatic, Untreated Brain Metastases (BRAIN): A Nonrandomized, Phase II Study. *Clin Cancer Res* 2015;21(8):1896–903. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2082. PMID: 25614446.
- Poon A.N., Ho S.S., Yeo W., Mok T.S. Brain metastasis responding to gefitinib alone. *Oncology* 2004;67(2):174–8. DOI: 10.1159/000081005. PMID: 15539923.
- Cappuzzo F., Calandini C., Bartolini S., Crin   L. ZD 1839 in patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer (NSCLC): report of four cases. *Br J Cancer* 2003;89:246–7. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601116. PMID: 12865910.
- Gurpide A., Perez-Gracia J.L. et al. Activity of gefitinib in central nervous system metastases in patients with non-small-cell lung cancer. Two case reports and review of the literature. *Clin Lung Cancer* 2005;7(2):138–40.

22. Namba Y., Kijima T., Yokota S. et al. Gefitinib in patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer: review of 15 clinical cases. *Clin Lung Cancer* 2004;6(2):123–8. DOI: 10.3816/CLC.2004.n.026. PMID: 15476598.
23. Kim K., Lee D.H., Lee J. et al. Efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors for brain metastasis in non-small cell lung cancer patients harboring either exon 19 or 21 mutations. *J Clin Oncol* 2011;suppl 29;abstr 7606.
24. Li Z., Lu J., Zhao Y. et al. The retrospective analysis of the frequency of EGFR mutations and the efficacy of gefitinib in NSCLC patients with brain metastasis. *J Clin Oncol* 2011;suppl 29;abstr e18065.
25. Iuchi T., Shingyoji M., Sakaida T. et al. Phase II trial of gefitinib alone without radiation therapy for Japanese patients with brain metastases from EGFR-mutant lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2013;82(2):282–7. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.08.016. PMID: 24021541.
26. Kim J.E., Lee D.H., Choi Y. et al. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors as a first-line therapy for never-smokers with adenocarcinoma of the lung having asymptomatic synchronous brain metastasis. *Lung Cancer* 2009;65(3):351–4. DOI: 10.1016/j.lungcan.2008.12.011. PMID: 19157632.
27. Weber B., Winterdahl M., Memon A. et al. Erlotinib accumulation in brain metastases from non-small cell lung cancer: visualization by positron emission tomography in a patient harboring a mutation in the epidermal growth factor receptor. *J Thorac Oncol* 2011;6(7):1287–9. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318219ab87. PMID: 21847041.
28. Elmeliegy M.A., Carcaboso A.M., Tagen M. et al. Role of ATP-binding cassette and solute carrier transporters in erlotinib CNS penetration and intracellular accumulation. *Clin Cancer Res* 2011;17(1):89–99. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1934. PMID: 21088257.
29. Kitazaki T., Oka M., Nakamura Y. et al. Gefitinib, an EGFR tyrosine kinase inhibitor, directly inhibits the function of P-glycoprotein in multidrug resistant cancer cells. *Lung Cancer* 2005;49(3):337–43. DOI: 10.1016/j.lungcan.2005.03.035. PMID: 15955594.
30. Togashi Y., Masago K., Fukudo M. et al. Cerebrospinal fluid concentration of erlotinib and its active metabolite OSI-420 in patients with central nervous system metastases of non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2010;5(7):950–5. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181e2138b. PMID: 20479691.
31. Wakeling A.E., Guy S.P., Woodburn J.R. et al. ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res* 2002;62(20):5749–54. PMID: 12384534.
32. Naskhletashvili D.R., Gorbounova V. Epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) erlotinib and gefitinib in the treatment of patients with brain metastases (BM) from non-small cell lung cancer (NSCLC). 37th ESMO Congress, Austria, Vienna, 28 September – 2 October 2012. Abstr 1330.
33. Насхлеташвили Д.Р., Горбунова В.А., Бычков М.Б. и др. Гефитиниб («Иресса») в лечении метастазов немелкоклеточного рака легкого в головном мозге. *Опухоли головы и шеи* 2012;3:63–5. [Naskhletashvili D.R., Gorbounova V.A., Bychkov M.B. et al. Gefitinib (Iressa) in treatment of brain metastases of non-small cell lung cancer. *Opucholi golovy i shei* = Head and Neck Tumors 2012;3:63–5. (In Russ.)].
34. Yang J.C., Wu Y.L., Schuler M. et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015;16(2):141–51. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)71173–8. PMID: 25589191.
35. Schuler M, Wu YL, Hirsh V. et al. First-Line Afatinib versus Chemotherapy in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Common Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations and Brain Metastases. *J Thorac Oncol* 2016;11(3):380–90. DOI: 10.1016/j.jtho.2015.11.014. PMID: 26823294.
36. Chinnaiyan P., Huang S., Vallabhane G. et al. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res* 2005;65:3328–35. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3547. PMID: 15833866.
37. Akimoto T., Hunter N.R., Buchmiller L. et al. Inverse relationship between epidermal growth factor receptor expression and radiocurability of murine carcinomas. *Clin Cancer Res* 1999;5:2884–90. PMID: 10537357.
38. Qin D., Ma J., Xiao J. et al. Effect of brain irradiation on blood-CSF barrier permeability of chemotherapeutic agents. *Am J Clin Oncol* 1997;20:263–5.
39. Qin D., Ou G., Mo H. et al. Improved efficacy of chemotherapy for glioblastoma by radiation-induced opening of blood-brain barrier: clinical results. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;51:959–62. PMID: 11704317.
40. DeAngelis L.M., Delattre J.Y., Posner J.B. Radiation-induced dementia in patients cured of brain metastases. *Neurology* 1989;39:789–96. PMID: 2725874.
41. Ma S., Xu Y., Deng Q. et al. Treatment of brain metastasis from non-small cell lung cancer with whole brain radiotherapy and Gefitinib in a Chinese population. *Lung Cancer* 2009;65:198–203.
42. Welsh J.W., Komaki R., Amini A. et al. Phase II trial of erlotinib plus concurrent whole-brain radiation therapy for patients with brain metastases from non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:895–902. DOI: 10.1200/JCO.2011.40.1174. PMID: 23341526.
43. Magnuson W.J., Lester-Coll N.H., Wu A.J. et al. Management of Brain Metastases in Tyrosine Kinase Inhibitor-Naïve Epidermal Growth Factor Receptor-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer: A Retrospective Multi-Institutional Analysis. *J Clin Oncol* 2017;35(10):1070-1077. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.7144. PMID: 28113019.
44. Ballard P., Yates J.W.T., Yang Zh. et al. Preclinical Comparison of Osimertinib with Other EGFR-TKIs in EGFR-Mutant NSCLC Brain Metastases Models, and Early Evidence of Clinical Brain Metastases Activity. *Clin Cancer Res* 2016;22(20):130–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0399.
45. Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T. et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2005;352:786–92. DOI: 10.1056/NEJMoa044238. PMID: 15728811.
46. Yun C.H., Mengwasser K.E., Toms A.V. et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2070–5. DOI: 10.1073/pnas.0709662105. PMID: 18227510.
47. Cross D.A., Ashton S.E., Ghiorghiu S. et al. AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. *Cancer Discov* 2014 Sep;4(9):1046–61. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0337. PMID: 24893891.
48. Ramalingam S., Yang J.C., Lee C.K. et al. Osimertinib as first-line treatment for EGFR mutation-positive advanced NSCLC: updated efficacy and safety results from two Phase I expansion cohorts. *J Thorac Oncol* 2016;11:152.
49. Yang J., Ramalingam S.S., Janne P.A. et al. LBA2 PR: Osimertinib (AZD9291) in pre-treated pts with T790M-positive advanced NSCLC: updated Phase 1 (P1) and pooled Phase 2 (P2) results. *J Thorac Oncol* 2016;11:152–3.

50. Kim D., Yang J., Cross D. et al. Preclinical evidence and clinical cases of AZD9291 activity in EGFR-mutant nonsmall cell lung cancer (NSCLC) brain metastases (BM). *Ann Oncol* 2014;25:iv146–64.
51. Ahn M.J., Tsai C.M., Yang J.C. et al. 3083 AZD9291 activity in patients with EGFR-mutant advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) and brain metastases: data from Phase II studies. *Eur J Cancer* 2015;51:625–6.
52. Mok T.S., Wu Y.-L., Ahn M.-J. et al. Osimertinib or platinum–pemetrexed in EGFR T790M–positive lung cancer. *N Engl J Med* 2017;376:629–40.
53. Wu Y.-L., Jenkins S., Ramalingam S.S. et al. Osimertinib vs platinum–pemetrexed for T790M-mutation positive advanced NSCLC (AURA3): plasma ctDNA analysis [abstract and oral presentation]. Presented at: World Conference on Lung Cancer; December 4–7, 2016; Vienna, Austria. *J Thorac Oncol* 2017;12(Suppl 1):386. Abstr MA08.03.
54. Mok T., Ahn M.-J., Han J.-Y. et al. CNS response to osimertinib in patients with T790M-positive advanced NSCLC: data from a randomized phase III trial (AURA3) [abstr and oral presentation]. Presented at: American Society of Clinical Oncology Congress; 2–6 June 2017; Chicago, IL. *J Clin Oncol* 2017;35(Suppl). Abstr 9005.
55. Vansteenkiste J., Reungwetwattana T., Nakagawa K. et al. LBA5 CNS response to osimertinib vs standard of care (SoC) EGFR-TKI as first-line therapy in patients (pts) with EGFR-TKI sensitising mutation (EGFRm)-positive advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Data from the FLAURA study. *Ann Oncol* 2017;28(Issue suppl 10) 1 <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx729.007>
56. Berghoff A.S., Preusser M. The future of targeted therapies for brain metastases. *Future Oncol* 2015;11:2315–27.
57. Venur V.A., Ahluwalia M.S. Targeted therapy in brain metastases: Ready for primetime? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016;35:e123–30. DOI: 10.14694/EDBK_100006. PMID: 27249714.

МОДЕЛИ ПОДКОЖНОГО И ОРТОТОПИЧЕСКОГО КСЕНОГРАФТОВ РАКА МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ ЧЕЛОВЕКА У МЫШЕЙ *NUDE* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВОЗДЕЙСТВИЙ, НАЦЕЛЕННЫХ НА РЕЦЕПТОР ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА

М.С. Воронцова¹, Т.А. Кармакова¹, Е.А. Плотникова¹, Н.Б. Морозова¹, М.А. Абакумов^{2,3},
Р.И. Якубовская¹, Б.Я. Алексеев¹

¹МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России;
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 3;

²ФГБОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³НИТУ «МИСЦ»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4

Контакты: Татьяна Анатольевна Кармакова kalmar123@yandex.ru

Введение. Подходы, основанные на принципах таргетной терапии, рассматриваются как перспективное направление создания новых методов лечения, способных увеличить эффективность лечения больных раком мочевого пузыря (РМП).

Цель исследования — получение ортотопической модели РМП человека у мышей линии nude и обоснование ее пригодности для экспериментального изучения таргетных препаратов, нацеленных на рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР).

Материалы и методы. Объектом исследования служили эктопические подкожные и ортотопические ксенографты РМП человека, полученные с использованием культивируемых клеток линий EJ и 5637. Рост ортотопических ксенографтов *in vivo* оценивали методом магнитно-резонансной томографии. Для исследования тканей опухолей использованы методы гистологического и иммуногистохимического анализа.

Результаты. Показано, что как эктопические, так и ортотопические ксенографты EJ и 5637 характеризуются высокой воспроизводимостью модели, хорошим кровоснабжением ткани, высоким уровнем экспрессии РЭФР и отличаются локализацией рецептора в опухолевых клетках. Прлиферация клеток EJ и 5637 в слизистой оболочке мочевого пузыря мышей при их внутримышечной имплантации преимущественно приводит к образованию мышечно-неинвазивной формы опухоли.

Заключение. Ксенографты EJ и 5637 у иммунодефицитных мышей могут быть использованы в качестве моделей РМП человека для изучения эффективности биотерапевтических воздействий, использующих в качестве мишени РЭФР.

Ключевые слова: рак мочевого пузыря, ксенографт опухоли, мыши nude, рецептор эпидермального фактора роста

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-31-40

SUBCUTANEOUS AND ORTHOTOPIC XENOGRAFT MODELS OF HUMAN BLADDER CARCINOMA IN *NUDE* MICE FOR EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-TARGETED TREATMENT

M.S. Vorontsova¹, T.A. Karmakova¹, E.A. Plotnikova¹, N.B. Morozova¹, M.A. Abakumov^{2,3}, R.I. Yakubovskaya¹, B. Ya. Alexeev¹

¹P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — Branch of the National Medical Research Center of Radiology,
Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovitianova st., Moscow 117997, Russia;

³National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninskiy Prospekt, Moscow 119094, Russia

Introduction. Approaches based on the principles of a targeted therapy are considered a promising strategy that is capable to improve the effectiveness of treatment for bladder cancer (BC) patients.

The purpose of the study was to establish an orthotopic xenograft model of human BC in mice and to prove its suitability for experimental examination of drugs targeting the epidermal growth factor receptor (EGFR).

Materials and methods. The objects of the study were ectopic subcutaneous and orthotopic human BC xenografts established using EJ and 5637 human BC cell lines. The growth of orthotopic xenografts *in vivo* was assessed by magnetic resonance imaging. Tumor tissues were investigated using histological and immunohistochemical techniques.

Results. It was shown that EJ and 5637 xenografts exhibit a good reproducibility, a sufficient blood supply of the tumor tissues, a high level of EGFR expression, and different pattern of a subcellular receptor localization. Implantation and subsequent proliferation of human EJ or 5637 cells in the murine bladder mucosa presumably results in muscle-non-invasive tumor formation.

Conclusions. The EJ and 5637 xenograft models can be useful for investigation of the efficacy of EGFR-targeted biotherapeutic treatments.

Key words: bladder cancer, orthotopic xenograft tumor model, nude mice, epidermal growth factor receptor

Введение

Рак мочевого пузыря (РМП) — одна из наиболее часто встречающихся злокачественных опухолей. РМП характеризуется высокими темпами годового прироста заболеваемости и занимает одно из ведущих мест в структуре онкологической смертности в развитых странах мира, в том числе в России [1, 2]. Высокий риск рецидива опухоли после органосохраняющего лечения [3, 4], а также ограниченные возможности радикального лечения при местнораспространенных формах РМП [5–7] делают данное заболевание актуальной проблемой современной онкоурологии.

Прогресс на пути улучшения отдаленных результатов лечения больных злокачественными новообразованиями связывают с таргетными методами лечения [8]. Привлекательной мишенью для разработки различных вариантов таргетной терапии при РМП являются мембранные белки семейства рецепторов эпидермального фактора роста (РЭФР, ErbB) [9, 10]. Высокая экспрессия РЭФР (ErbB1) в клетках первичного РМП, по данным клинко-морфологических исследований, наблюдается в 74–86 % случаев, коррелирует с глубокой инвазией, низкой степенью дифференцировки и высокой пролиферативной активностью опухоли [11, 12]. Адыовантное применение при распространенных формах РМП моноклональных антител к РЭФР (цетуксимаб) или ингибиторов тирозинкиназы (гефитиниб, лапатиниб) не показало ожидаемой клинической эффективности [13–15]. Это стимулирует поиск причин резистентности РМП к данным видам терапии и путей ее преодоления, поиск новых препаратов и схем комбинированного лечения, а также разработку способов направленной доставки к клеткам РМП цитостатиков, фотосенсибилизаторов, диагностических и терапевтических радионуклидов с использованием РЭФР в качестве мишени [16–20].

Экспериментальные исследования *in vivo* чаще всего выполняются на моделях эктопических трансплантатов РМП человека, полученных подкожной инокуляцией культивируемых опухолевых клеток или имплантацией операционного материала иммунодефицитным мышам [21]. С учетом механизма противоопухолевого действия релевантность модели для оценки активности ингибиторов РЭФР-ассоциированных тирозинкиназ, как правило, подтверждают определением содержания рецептора в клетках методом вестерн-блота [22, 23], для тестирования воздействий на основе антител к РЭФР — дополняют характеристику модели иммуногистохимическим исследованием внутриклеточного распределения рецептора [18, 24].

Исследования РЭФР-направленных воздействий на ортотопических моделях ксенографтов РМП человека немногочисленны, хотя известно, что такая

модель позволяет в большей степени воспроизвести особенности микроокружения опухоли, которые могут влиять как на экспрессию молекулярной мишени, так и на ответ опухоли на воздействие. Опубликованные работы с использованием такой модели либо не содержат удовлетворительной характеристики гистологических особенностей ксенографтов [17, 22], либо представленные в них данные недостаточно информативны в отношении характера экспрессии рецептора-мишени в опухолевых клетках [16, 25, 26].

Целью настоящей работы стало получение модели ортотопического ксенографта РМП человека и обоснование ее пригодности для экспериментального и доклинического изучения препаратов, нацеленных на опухолевые клетки с высокой экспрессией РЭФР.

Материалы и методы

Культуры опухолевых клеток

В работе использованы клеточные линии карциномы мочевого пузыря человека EJ и 5637 (любезно предоставлены профессором А.С. Соболевым, лаборатория молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена РАН, Москва). Клетки культивировали во флаконах с площадью поверхности 25 или 75 см² (Costar, США) на среде DMEM (для культуры EJ) или RPMI-1640 (для культуры 5637) с добавлением 2 mM L-глутамин и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Среды и культуральные добавки получены от компании «ПанЭко» (Россия).

Животные

Мыши линии BALB/c *nu/nu* (*nude*), самки с массой тела 19–21 г (возраст 7–8 нед), получены из НПП «Питомник лабораторных животных» — филиала ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН. Животных содержали в специализированном помещении вивария, в условиях повышенной температуры и влажности. Уход за животными, все экспериментальные процедуры и манипуляции выполнялись в соответствии с правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных [27].

Получение ксенографтов опухолей

Для имплантации мышам использовали клеточные линии, прошедшие от 3 до 7 пассажей культивирования. Клетки снимали с поверхности культуральных флаконов раствором Версена, отмывали в среде, не содержащей эмбриональную телячью сыворотку, подсчитывали количество жизнеспособных клеток в камере Горяева и на той же среде готовили клеточную суспензию для введения животным.

На этапе подбора количества вводимых клеток экспериментальные группы состояли из 4 мышей,

на этапе характеристики роста ксенографтов — из 5–8 мышей.

Для получения подкожного ксенографта суспензию опухолевых клеток в количестве 1×10^6 , 3×10^6 или 5×10^6 инокулировали мышам подкожно на правый бок в объеме 0,1 мл. Объем опухоли рассчитывали по формуле

$$V = d_1 \times d_2^2 \times 0,52,$$

где d_1 и d_2 — 2 взаимно перпендикулярных размера опухоли.

Перед процедурой внутривнутренней инстилляции мышей анестезировали интраперитонеальным введением золазепама гидрохлорида («Золетил 100», 20 мг/кг) и ксилосина гидрохлорида («Ксилазин», 15 мг/кг) за 5 мин до начала манипуляций и фиксировали на препаровальном столике. Слизистую оболочку мочевого пузыря подвергали химическому повреждению по методике [28] путем введения через стерильный катетер, установленный в мочеиспускательный канал, 0,1 М раствора соляной кислоты с последующей его нейтрализацией 0,1 М раствора гидроксида натрия. После промывания полости мочевого пузыря стерильным физиологическим раствором в мочевой пузырь вводили 70 мкл суспензии, содержащей 1×10^6 , 3×10^6 или 5×10^6 опухолевых клеток. В течение 1 ч мышей время от времени переворачивали, а при признаках выхода из наркоза — освобождали от фиксации. Осмотр, оценку общего состояния и взвешивание животных после процедуры проводили ежедневно. Снижение массы тела мышей более чем на 20 % от исходного показателя служило показанием для выведения животных из опыта. Эвтаназию животных проводили парами эфира.

Магнитно-резонансная томография

Исследование проводилось на базе Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (ЦКП «Медицинские и биотехнологические нанотехнологии»). Исследование выполнялось на магнитно-резонансном томографе ClinScan 7T 70/30 (Bruker Biospin, Германия) с постоянным магнитным полем 7 Тл (градиентная система BGA 12S/20) при газовой анестезии животных. Обработка результатов проводилась с использованием программного обеспечения SyngoMR 15.

Подготовка материала для гистологического и иммуногистохимического исследования

Образцы тканей, полученные при аутопсии животных, фиксировали в нейтральном забуференном 10 % формалине и после стандартной гистологической проводки заключали в парафин. Готовили серийные срезы тканей толщиной 4 мкм. Для гисто-

логического анализа срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Г&Э).

Иммуногистохимическое окрашивание

Для выявления экспрессии РЭФР в опухолевых клетках использовали моноклональное кроличье антитело D38B1 (Cell Signaling Technology, CA), для выявления клеток эндотелия — моноклональное крысиное антитело к CD34 мыши (BD Pharmingen™). Срезы окрашивали с использованием общепринятой техники непрямого иммунопероксидазного анализа. Для демаскировки антигена стекла с депарафинизированными срезами выдерживали в 0,1 М натрий-цитратном буфере (pH 6,0) при 95 °С в течение 20 мин. Система вторичных реагентов включала биотинилированные поликлональные антитела к иммуноглобулинам соответствующей видоспецифичности (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), конъюгат стрептавидина с пероксидазой конского хрена (Dako) и хромогенный субстрат Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako). На контрольные срезы вместо первичных антител наносили неспецифические иммуноглобулины кролика или крысы (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). После завершения реакции клетки и срезы докрашивали гематоксилином и заключали в канадский бальзам. Микропрепараты анализировали под микроскопом Olympus BX51 (Olympus Optical Co, Япония), оснащенным системой документирования изображений.

Результаты

Подкожные ксенографты РМП человека EJ и 5637 у мышей *nude*

На 1-м этапе выполнена оценка способности клеток EJ и 5637 к росту *in vivo* при подкожной инокуляции бестимусным мышам и исследована экспрессия РЭФР в клетках подкожных ксенографтов.

Скорость пролиферации клеток EJ, 5637 при культивировании *in vitro* была сходной (по результатам МТТ-теста, данные не представлены), однако при подкожной инокуляции мышам *nude* клетки 5637 отличались более агрессивным биологическим поведением. Так, 100 % выход опухолей, т. е. образование подкожных ксенографтов у всех мышей в экспериментальной группе, при использовании клеток линии EJ достигался при инокуляции животным опухолевого материала в количестве не менее 3×10^6 клеток, образование подкожных ксенографтов при использовании клеток линии 5637 — в количестве 1×10^6 клеток и более. Скорость увеличения объема опухоли 5637 значительно опережала скорость роста опухоли EJ. Через 21 день после инокуляции клеток EJ в количестве 3×10^6 размер подкожных образований варьировал от 100 до 250 мм³, при инокуляции того же количества клеток 5637 — от 220 до 450 мм³ (рис. 1).

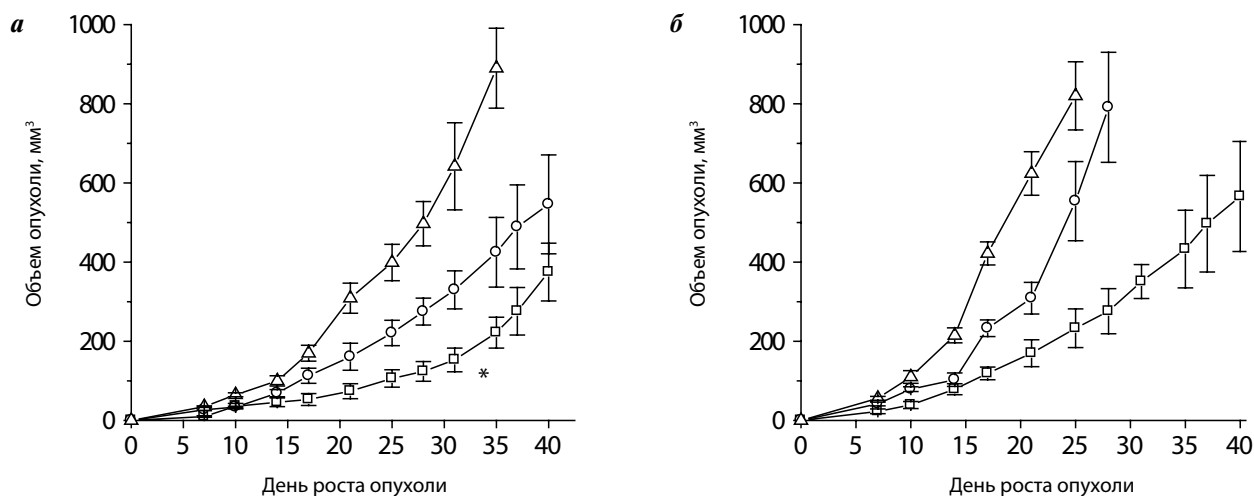


Рис. 1. Кривые роста подкожных ксенографтов рака мочевого пузыря человека EJ (а) и 5637 (б) у мышей *nude* в зависимости от количества инокулируемых клеток: 1×10^6 (квадратные символы), 3×10^6 (круглые символы), 5×10^6 (треугольные символы). В группах — по 5 животных; в группе мышей с привитыми клетками EJ в количестве 1×10^6 (отмечено звездочкой) выход опухолей зафиксирован у 3 из 5 животных. Размеры опухолей (объем, мм³) представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего

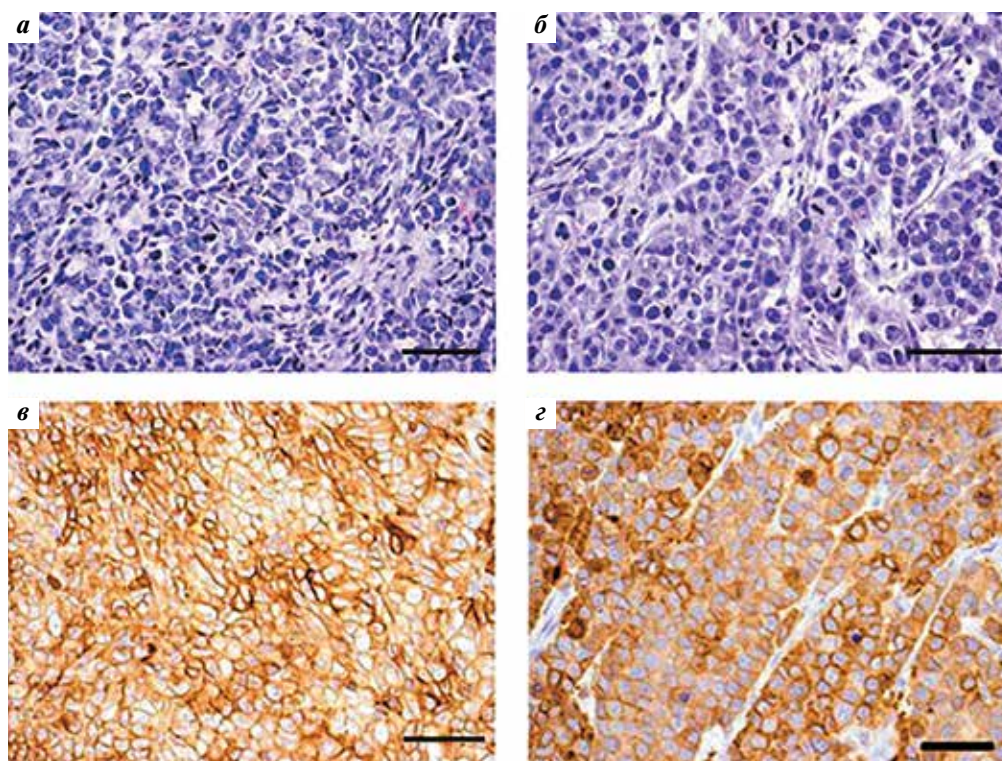


Рис. 2. Гистологические препараты подкожных ксенографтов рака мочевого пузыря человека EJ (а, в) и 5637 (б, г) у мышей *nude*; 21-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином (увеличение $\times 200$; отметка шкалы — 100 мкм) а, в — общая морфологическая картина, Г&Э; б, г — экспрессия рецептора эпидермального фактора роста в опухолевых клетках, иммунопероксидазная реакция с антителом D38B1, докрасивание гематоксилином

По результатам гистологического исследования подкожные ксенографты опухолей EJ и 5637 имели солидное строение, морфологически соответствующее низкодифференцированному новообразованию. В ткани обеих опухолей определялось большое количество митозов. Опухоли EJ отличались плеоморф-

ными клетками, тесно расположенными в тонкой хаотичной стромальной сети (рис. 2а). Клетки опухоли 5637 были более мономорфны и образовывали разделенные прослойками соединительной ткани островки, которые особенно четко прослеживались по периферии роста опухолей (рис. 2б). На 21-й день

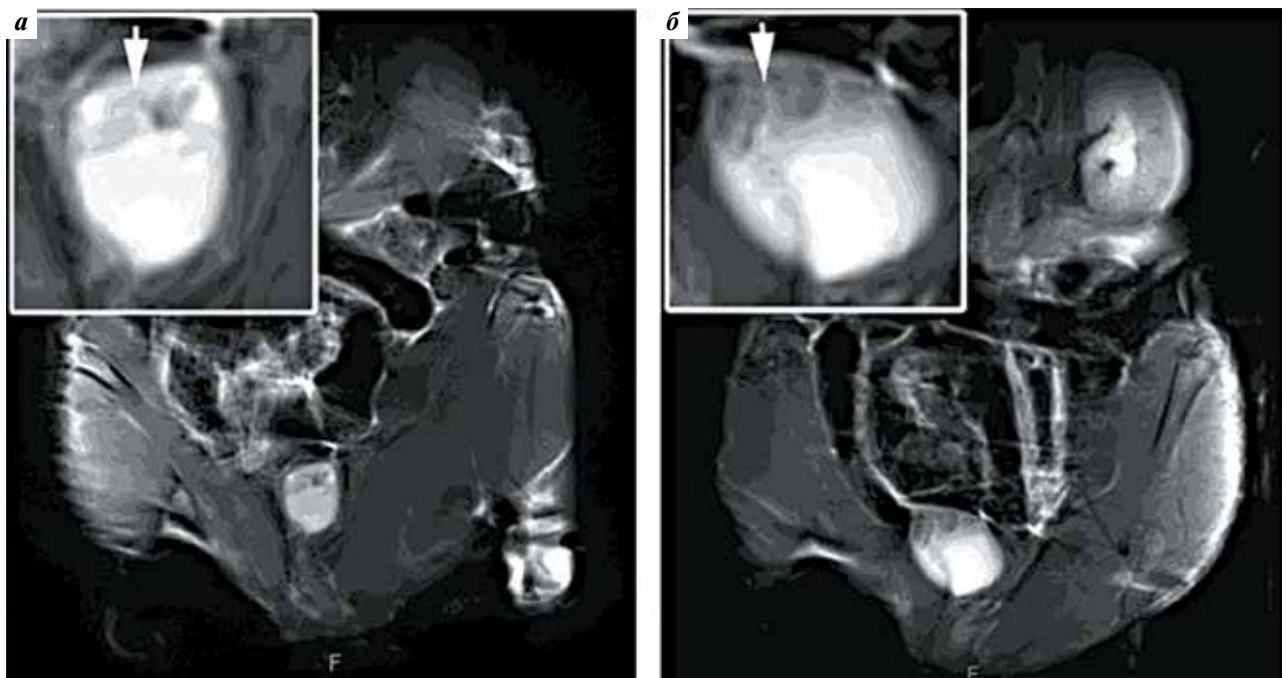


Рис. 3. МРТ-изображения нижней части тела мышей *nude* с ортотопическим ксенографтом рака мочевого пузыря человека EJ (а) и 5637 (б) на 20-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток, фронтальная проекция. На врезках — увеличенное изображение мочевого пузыря; расположение опухолей указано стрелками

роста в ткани опухоли 5637 обнаружены только минимальные фокусы дегенерации, в ткани опухоли EJ признаков некроза при гистологическом исследовании в этот срок не наблюдалось.

По результатам оценки интенсивности иммуногистохимической реакции с анти-РЭФР антителом клетки ксенографтов EJ и 5637 слабо различались по общему уровню экспрессии РЭФР. При этом в клетках опухоли EJ наряду с окрашиванием цитоплазмы наблюдалось преимущественное окрашивание поверхностной мембраны (рис. 2в), а в различных участках ткани опухолевого образования картина иммуногистохимического окрашивания в целом была сходной. В клетках опухоли 5637 преобладала цитоплазматическая локализация РЭФР (рис. 2г), мембранное окрашивание можно было наблюдать в клетках некоторых структур, располагающихся по периферии опухолевого узла.

Ортотопические ксенографты рака мочевого пузыря человека EJ и 5637 у мышей *nude*

Отработку условий ортотопической трансплантации клеток РМП человека выполняли, варьируя количество клеток, вводимых в мочевой пузырь мышей.

Введение 1×10^6 клеток EJ или 5637 удовлетворительно переносилось животными. Однако на 20-е сутки после процедуры инстилляции признаки опухолевого роста в стенке мочевого пузыря были обнаружены только у 2 из 4 мышей в каждой группе и только по результатам гистологического исследования.

При введении мышам 5×10^6 клеток EJ или 5637 в течение 14 сут после воздействия наблюдалась гибель животных. При вскрытии павших мышей установлено, что причиной гибели в обеих группах стало нарушение функции почек, которое развивалось как следствие перекрытия мочеточников опухолью, прорастающей стенку органа или заполняющей полость мочевого пузыря.

Оптимальным признано внутривезикулярное введение клеток EJ или 5637 в количестве 3×10^6 на мышь. По совокупным результатам независимо проведенных экспериментов выживаемость мышей, которым прививали клетки EJ, на 24-е сутки после воздействия составила 92 % (11 из 12 животных), выживаемость мышей, которым прививали клетки 5637 — 83 % (10 из 12 животных). На данный срок при вскрытии мышей в мочевом пузыре обнаруживали утолщение складок, экзофитные выросты различного числа и размера либо полное заполнение опухолью полости органа.

Анализ результатов исследования методом магнитно-резонансной томографии, полученных у мышей на 20-й день после инстилляции опухолевых клеток, показал возможность прижизненного мониторинга роста ксенографтов. МРТ-изображения, представленные на рис. 3, демонстрируют пристеночные образования, выступающие в полость мочевого пузыря мышей, соответствующие растущей опухоли. Отмечено, что ксенографты, как правило, локализовались в области верхушки мочевого пузыря,

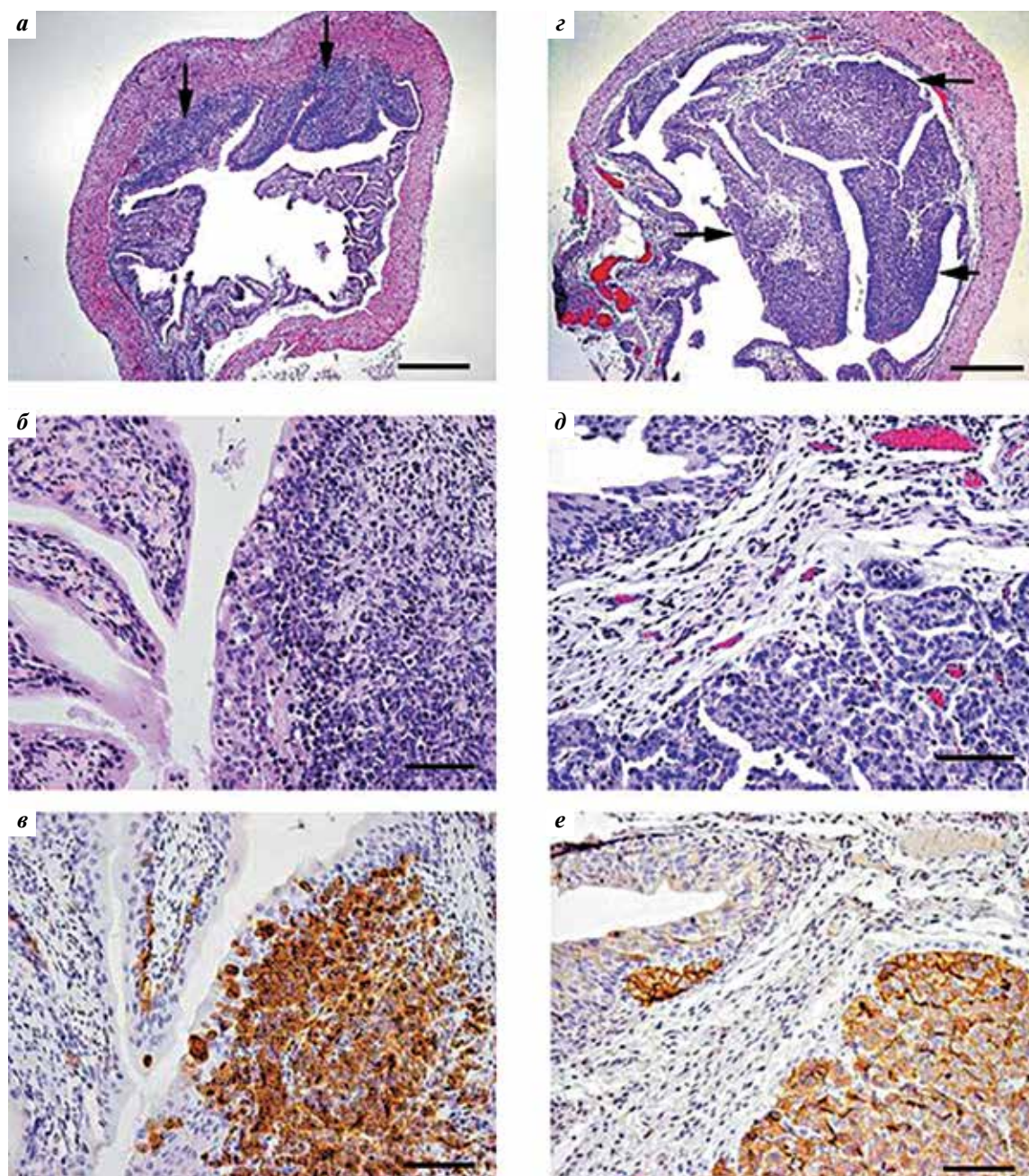


Рис. 4. Гистологические препараты мочевого пузыря мышей nude с ортотопическим ксенографтом рака мочевого пузыря человека EJ (а–в) и 5637 (г–е); 24-й день после процедуры трансплантации опухолевых клеток. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином: а, г – общий вид опухолевых образований, растущих в слизистой оболочке мочевого пузыря (указаны стрелками), Г&Э (увеличение $\times 50$; отметка шкалы – 500 мкм); б, д – морфологическая картина роста солидного ксенографта под слоем уротелия, Г&Э (увеличение $\times 200$); в, е – серийные срезы тех же участков ткани, окрашенных иммунопероксидазной реакцией с анти-РЭФР антителом D38B1, докрасивание гематоксилином (увеличение $\times 200$; отметка шкалы – 200 мкм)

что обусловлено положением тела наркотизированного животного во время процедуры.

Гистологическое исследование подтвердило наличие опухолевого роста в мочевом пузыре у всех выживших животных. Репрезентативные микрофотографии парафиновых срезов мочевого пузыря животных-опухоленосителей представлены на рис. 4а, г.

У большинства животных рост опухолей EJ и 5637, независимо от их размера, был ограничен слизистой оболочкой, т. е. уровень поражения стенки мочевого пузыря опухолью соответствовал стадии T1. Однако у 3 из 12 мышей с ксенографтами EJ на поздний срок наблюдения выявлены признаки начала инвазии опухоли в мышечный слой стенки мочевого пузыря.

По результатам иммуногистохимического окрашивания тканей характер экспрессии РЭФР в клетках ортотопических ксенографтов EJ и 5637 в целом был сходен с тем, что наблюдалось при исследовании подкожных опухолевых образований (рис. 4в, е). При этом отмечено, что в клетках ортотопического ксенографта EJ выраженность цитоплазматического компонента окрашивания была существенно выше, чем в клетках подкожно растущих опухолей. Как следствие этого, общая интенсивность окрашивания ортотопических ксенографтов EJ во всех исследованных случаях была существенно выше, чем интенсивность окрашивания ортотопических ксенографтов 5637.

Для того чтобы проследить динамику формирования и роста имплантированных опухолевых клеток в стенке мочевого пузыря и оценить оптимальное время начала потенциального лечения, на модели ксенографта EJ проведено гистологическое исследование мочевого пузыря на различные сроки после процедуры внутривезикулярной инстиляции клеток (4, 7, 10 и 14-е сутки). Метод иммуногистохимического

окрашивания использован для оценки характера экспрессии РЭФР и распределения сосудов в образцах удаленных тканей.

Было установлено, что регенерация уротелия у мышей *nude* после его химического повреждения происходит сравнительно быстро. На фоне полной реэпителизации покрова мочевого пузыря на 4–7-й день после внутривезикулярного введения клеток EJ РЭФР-положительные (РЭФР+) клетки, как правило, располагались под уротелием (рис. 5а). Возможно, что выживанию опухолевых клеток, проникших под базальную мембрану, способствует хорошо развитая сеть CD34⁺ кровеносных капилляров, которая в стенке интактного мочевого пузыря протекает непосредственно под базальной мембраной (рис. 6а).

В дальнейшем, до 14-го дня наблюдения, в стенке мочевого пузыря можно было проследить распространение опухолевых клеток под слоем эпителия в собственной пластинке слизистой оболочки (рис. 5б). Увеличение количества пролиферирующих клеток приводило к утолщению складок слизистой оболочки,

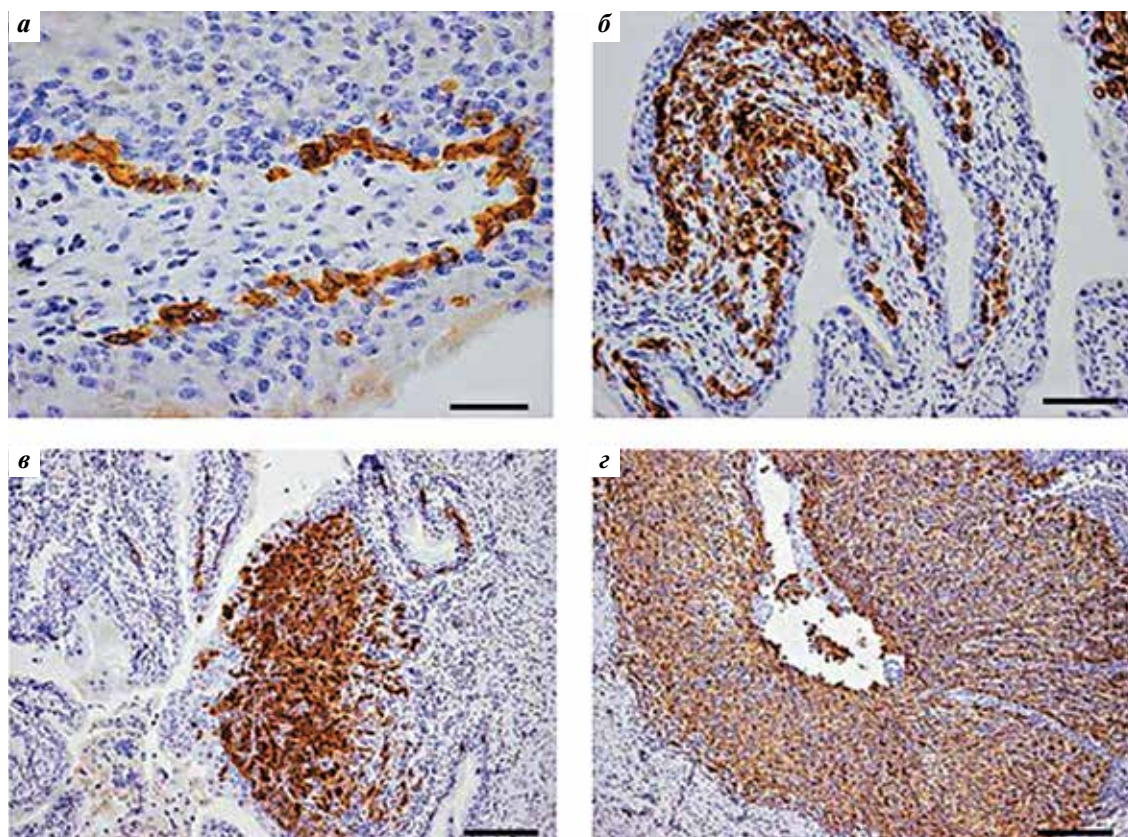


Рис. 5. Гистологические препараты мочевого пузыря мышей *nude* с ортотопическим ксенографтом рака мочевого пузыря человека EJ, демонстрирующие различные этапы формирования опухоли. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином и окрашенных иммунопероксидазной реакцией с анти-РЭФР антителом D38B1 (докрашивание гематоксилином): а — РЭФР+ депозиты опухолевых клеток в подэпителиальном слое собственной пластинки слизистой оболочки мочевого пузыря (7-й день после имплантации опухолевых клеток; увеличение $\times 400$, отметка шкалы — 50 мкм); б, в — пролиферация опухолевых клеток в толще подслизистого слоя (10-й день; увеличение $\times 200$ и $\times 100$ соответственно; отметка шкалы — 100 и 200 мкм соответственно); г — полость мочевого пузыря заполнена опухолью (24-й день; увеличение $\times 100$, отметка шкалы — 200 мкм)

формированию экзофитных выростов (рис. 5в), которые со временем сливались в единый массив, заполняющий полость органа (рис. 5г).

Оптимальным сроком начала терапевтического воздействия у животных-опухоленосителей с ксенографтами EJ или 5637, с учетом динамики роста опухолевых образований, может считаться интервал до 7 дней после процедуры инстилляции опухолевых клеток.

Количество и линейная протяженность депозитов опухолевых клеток варьировали у индивидуальных животных. При множественных фокусах имплантации рост опухолевых зачатков в разных участках слизистой оболочки мочевого пузыря был неодинаковым. Можно предположить, что вариативность числа опухолевых зачатков и скорость роста ксенографтов у животных-опухоленосителей определяются количеством опухолевых клеток, успешно осуществивших имплантацию в данном участке поврежденной слизистой оболочки.

Исследование распределения микрососудов в опухолевой ткани показало, что в ткани ксенографта клетки эндотелия мыши образуют насыщенную капиллярную сеть, которая пронизывает всю толщу опухоли (рис. 6б). Таким образом, ортотопическая модель опухоли EJ наглядно демонстрирует способность ксеногенных клеток привлекать ресурсы организма-хозяина для формирования адекватного кровоснабжения растущей опухолевой массы.

На протяжении всего времени роста, до поздних его этапов, когда опухоли достигали значительных размеров, опухолевые клетки ксенографтов EJ и 5637, в отличие от естественно образующихся опухолей мочевого пузыря, не контактировали непосредственно с содержимым мочевого пузыря мышей и были отделены от полости органа слоем регенерировавшего уротелия. Необходимо отметить, что при внутрипузырном введении противоопухолевых лекарственных средств это обстоятельство может существенно ограничивать доступ активного компонента лекарства к опухолевым клеткам, особенно при воздействии на ранние сроки после инокуляции опухоли.

Особого внимания заслуживают различия внутриклеточной локализации РЭФР в клетках опухолей EJ и 5637, выявленные при иммуногистохимическом окрашивании тканей ксенографтов. По данным клинико-морфологических исследований, при некоторых злокачественных новообразованиях — раке поджелудочной железы, раке почки, немелкоклеточном раке легкого — тип субклеточного распределения РЭФР в опухоли может служить независимым фактором клинического прогноза [29–32]. По существующим представлениям преимущественная внутриклеточная локализация РЭФР может определяться активностью процессов интернализации рецептора,

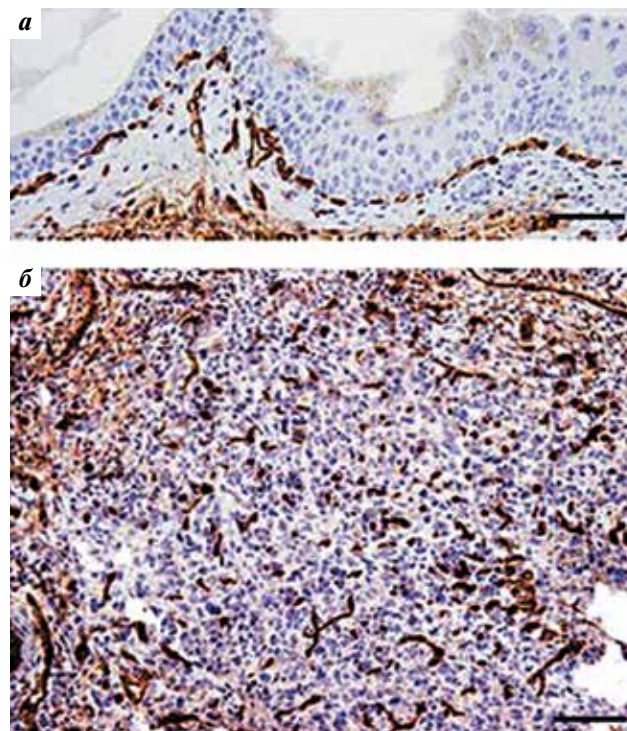


Рис. 6. Расположение кровеносных микрососудов в стенке мочевого пузыря intactного животного (а) и в ткани ортотопического ксенографта рака мочевого пузыря человека EJ (б) у мышей *nude*. Микрофотографии парафиновых срезов тканей, окрашенных иммунопероксидазной реакцией с антителом к CD34 (докрашивание гематоксилином; увеличение $\times 200$; отметка шкалы — 100 мкм): а — в нормальном мочевом пузыре CD34⁺ клетки эндотелия располагаются в подэпителиальном слое; б — в ткани ксенографта клетки эндотелия мыши образуют разветвленную сосудистую сеть

которая инициируется взаимодействием с лигандами, может зависеть от организации внутриклеточного транспорта комплекса рецептор — лиганд, а также от специфики взаимодействия внутриклеточных сигнальных путей [33]. Совокупность этих процессов не только способна определять биологические особенности роста опухоли, но и может влиять на реализацию механизмов лечебного воздействия. Так, например, ожидаемыми являются результаты клинического исследования, показавшего, что у больных с распространенным немелкоклеточным раком легкого лечебный эффект химиотерапии в сочетании с цетуксимабом более выражен в случаях с высоким уровнем экспрессии РЭФР на поверхности опухолевых клеток [34].

Заключение

С использованием клеточных линий EJ и 5637 нами получены ксенографты РМП человека у мышей *nude*, которые характеризуются хорошей воспроизводимостью роста и высоким уровнем экспрессии РЭФР. Хорошее кровоснабжение ткани подкожных и ортотопических ксенографтов РМП указывает на

потенциально высокую доступность опухолевых клеток для системно вводимых лекарственных средств. Рост ортотопических вариантов ксенографтов в подслизистом слое мочевого пузыря накладывает определенные ограничения на их релевантность как моделей для изучения цитотоксических лекарственных средств, для которых предполагается внутривезикулярный путь введения. Особенности локализации РЭФР в клетках ксенографтов EJ и 5637, выявленные в дан-

ной работе, могут служить критерием при выборе экспериментальной модели, а также дополнительным фактором анализа при интерпретации результатов экспериментального воздействия. Ксенографты EJ и 5637 могут быть полезны для разработки новых способов эффективного лечения РМП человека, в том числе, при экспериментальном изучении биотерапевтических воздействий, использующих РЭФР в качестве мишени.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с. [Malignant tumors in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Ed. A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: Hertsen MORI, branch of NMRRС МН RF. 2017. 250 p. (In Russ.)].
2. Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends — an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25:16–27. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578. PMID: 26667886.
3. Алексеев Б.Я., Андреева Ю.Ю., Новикова И.В. Факторы прогноза выживаемости у больных немусечно-инвазивным раком мочевого пузыря. *Онкоурология* 2013;9(1):34–42. DOI: <http://dx.doi.org/10.17650/1726-776-2013-9-1-34-42>. [Alekseev B.Ya., Andreeva Yu.Yu., Novikova I.V. Factors predicting survival in patients with non-muscle invasive bladder cancer. *Onkourologiya = Oncourology* 2013;9(1):34–42 (In Russ.)].
4. Chou R., Selph S., Buckley D.I. et al. Intravesical therapy for the treatment of nonmuscle invasive bladder cancer: A systematic review and meta-analysis. *J Urol* 2017;197(5):1189–99. DOI: 10.1016/j.juro.2016.12.090. PMID: 28027868.
5. Комяков Б.К., Гулиев Б.Г., Сергеев А.В. и др. Выживаемость больных раком мочевого пузыря после радикальной цистэктомии. *Онкоурология* 2016;12(1):29–35. DOI: <http://dx.doi.org/10.17650/1726-9776-2016-12-1-29-35>. [Komyakov B.K., Guliev B.G., Sergeev A.V. Survival of patients with bladder cancer after radical cystectomy. *Onkourologiya =*
6. Oncourology 2016;12(1):29–35 (In Russ.)].
7. Lobo N., Mount C., Omar K. et al. Landmarks in the treatment of muscle-invasive bladder cancer. *Nat Rev Urol* 2017;14(9):565–74. DOI: 10.1038/nrurol.2017.82. PMID: 28675174.
8. Sanli O., Dobruch J., Knowles M.A. et al. Bladder cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17022. DOI: 10.1038/nrdp.2017.22. PMID: 28406148.
9. Ghosh M., Brancato S.J., Agarwal P.K., Apolo A.B. Targeted therapies in urothelial carcinoma. *Curr Opin Oncol* 2014;26(3):305–20. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000064. PMID: 24685646.
10. Weintraub M.D., Vourganti S., Li Q. et al. Targeting the epidermal growth factor receptor in bladder cancer. *J Carcinogene Mutagene* 2013;4:143. DOI: 10.4172/2157–2518.1000143.
11. Mooso B.A., Vinnal R.L., Mudryj M. et al. The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence. *J Urol* 2015;193(1):19–29. DOI: 10.1016/j.juro.2014.07.121. PMID: 25158272.
12. Chaux A., Cohen J.S., Schultz L. et al. High epidermal growth factor receptor immunohistochemical expression in urothelial carcinoma of the bladder is not associated with EGFR mutations in exons 19 and 21: a study using formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *Hum. Pathol* 2012;43(10):1590–5. DOI: 10.1016/j.humpath.2011.11.016. PMID: 22406363.
13. Carlsson J., Wester K., De La Torre M. et al. EGFR-expression in primary urinary bladder cancer and corresponding metastases and the relation to HER2-expression. On the possibility to target these receptors with radionuclides. *Radiol Oncol* 2015;49(1):50–8. DOI: 0.2478/raon-2014–0015. PMID: 25810701.
14. Hussain M., Daignault S., Agarwal N. et al. A randomized phase 2 trial of gemcitabine/cisplatin with or without cetuximab in patients with advanced urothelial carcinoma. *Cancer* 2014;120(17):2684–93. DOI: 10.1002/cncr.28767. PMID: 24802654.
15. Miller K., Morant R., Stenzl A. et al. A phase II study of the Central European Society of Anticancer-Drug Research (CESAR) Group: Results of an open-label study of gemcitabine plus cisplatin with or without concomitant or sequential gefitinib in patients with advanced or metastatic transitional cell carcinoma of the urothelium. *Urol Int* 2016;96(1):5–13. DOI: 10.1159/000381589. PMID: 26068576.
16. Powles T., Huddart R.A., Elliott T. et al. Phase III, double-blind, randomized trial that compared maintenance lapatinib versus placebo after first-line chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 1/2-positive metastatic bladder cancer. *J Clin Oncol* 2017;35(1):48–55. DOI: 10.1200/JCO.2015.66.3468. PMID: 28034079.
17. Pfost B., Seidl C., Autenrieth M. et al. Intravesical alpha-radioimmunotherapy with 213Bi-anti-EGFR-mAb defeats human bladder carcinoma in xenografted nude mice. *J Nucl Med* 2009;50(10):1700–8. DOI: 10.2967/jnumed.109.065961. PMID: 19793735.
18. Yang X., Kessler E., Su L.J. et al. Diphtheria toxin-epidermal growth factor fusion protein DAB389EGF for the treatment of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(1):148–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1258. PMID: 23172881.
19. Grivas P.D., Day K.C., Karatsinides A. et al. Evaluation of the antitumor activity of dacomitinib in models of human

- bladder cancer. *Mol Med* 2013;19:367–76. DOI: 10.2119/molmed.2013.00108. PMID: 24166682.
19. Tsai Y.C., Ho P.Y., Tzen K.Y. et al. Synergistic blockade of EGFR and HER2 by new-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor enhances radiation effect in bladder cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2015;14(3):810–20. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0951. PMID: 25589492.
 20. Railkar R., Krane L.S., Li Q.Q. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted photoimmunotherapy (PIT) for the treatment of EGFR expressing bladder cancer. *Mol Cancer Ther* 2017;16(10):2201–14. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0924. PMID: 28619755.
 21. Arantes-Rodrigues R., Colaço A., Pinto-Leite R. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models as tools to investigate the efficacy of anti-neoplastic drugs on urinary bladder cancer. *Anticancer Res* 2013;33(4):1273–96. PMID: 23564765.
 22. Dominguez-Escrig J.L., Kelly J.D., Neal D.E. et al. Evaluation of the therapeutic potential of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor gefitinib in preclinical models of bladder cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(14):4874–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0034. PMID: 15269164.
 23. Mansure J.J., Nassim R., Chevalier S. et al. A novel mechanism of PPAR gamma induction via EGFR signalling constitutes rational for combination therapy in bladder cancer. *PLoS One* 2013;8(2):e55997. DOI: 10.1371/journal.pone.0055997. PMID: 23409107.
 24. Bhuvanewari R., Gan Y.Y., Soo K.C., Olivo M. Targeting EGFR with photodynamic therapy in combination with Erbitux enhances *in vivo* bladder tumor response. *Mol Cancer* 2009;8:94. DOI: 10.1186/1476-4598-8-94. PMID: 19878607.
 25. Wu M.L., Li H., Yu L.J. et al. Short-term resveratrol exposure causes *in vitro* and *in vivo* growth inhibition and apoptosis of bladder cancer cells. *PLoS One* 2014;9(2):e89806. DOI: 10.1371/journal.pone.0089806. PMID: 24587049.
 26. Fazel J., Rötzer S., Seidl C. et al. Fractionated intravesical radio-immunotherapy with (213) Bi-anti-EGFR-MAb is effective without toxic side-effects in a nude mouse model of advanced human bladder carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2015;16(10):1526–34. DOI: 10.1080/15384047.2015.1071735. PMID: 26177233.
 27. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. М.: Профиль-2С, 2010. 358 с. [Guidelines for laboratory animals and alternative models in biomedical research. Ed. N.N. Karkishchenko, S.V. Grachev. Moscow: Profil-2S Ltd, 2010. 358 p. (In Russ.)].
 28. Chan E., Patel A., Heston W., Larchian W. Mouse orthotopic models for bladder cancer research. *BJU Int* 2009;104(9):1286–91. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08577.x. PMID: 19388981.
 29. Einama T., Ueda S., Tsuda H. et al. Membranous and cytoplasmic expression of epidermal growth factor receptor in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Exp Ther Med* 2012;3:931–36. DOI: 10.3892/etm.2012.518. PMID: 22969995.
 30. Ueda S., Ogata S., Tsuda H. et al. The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 2004;29:e1–8. PMID: 15211117.
 31. Kankaya D., Kiremitci S., Tulunay O., Baltaci S. Prognostic impact of epidermal growth factor receptor on clear cell renal cell carcinoma: Does it change with different expression patterns? *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2016;59:35–40. DOI: 10.4103/0377-4929.178219. PMID: 26960632.
 32. Kallio J.P., Hirvikoski P., Helin H. et al. Membranous location of EGFR immunostaining is associated with good prognosis in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003;89:1266–9. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601241. PMID: 14520458.
 33. Tomas A., Futter C.E., Eden E.R. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. *Trends Cell Biol* 2014;24(1):26–34. DOI: 10.1016/j.tcb.2013.11.002. PMID: 24295852.
 34. Pirker R., Pereira J.R., von Pawel J. et al. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet Oncology*. 2012;13:33–42. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70318-7. PMID: 22056021.

ЭКСПРЕССИЯ ОСНОВНЫХ ГЕНОВ ВНЕШНЕГО ПУТИ АПОПТОЗА У БОЛЬНЫХ С ВПЕРВЫЕ ВЫЯВЛЕННЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ В СРАВНЕНИИ С КЛИНИЧЕСКИМИ ДАННЫМИ

С.Г. Захаров¹, А.К. Голенков¹, А.В. Мисюрин², Е.В. Катаева¹, А.А. Рудакова², М.А. Барышникова², Т.А. Митина¹, Е.В. Трифонова¹, Л.Л. Высоцкая¹, Ю.Б. Черных¹, Е.Ф. Клинушкина¹, К.А. Белоусов¹, Ю.П. Финашутина², В.А. Мисюрин²

¹ГБУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского; Россия, 129110 Москва, ул. Щепкина, 61/2, корпус 1;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Сергей Геннадьевич Захаров hematologymoniki@mail.ru

Введение. Приведенные данные фундаментальных исследований процессов апоптоза при В-клеточном хроническом лимфолейкозе (В-ХЛЛ) свидетельствуют о сложности и многообразии механизмов, влияющих на кинетику нормальных клеток и опухолевых лимфоцитов при данном заболевании. Важным является изучение выраженности клинических проявлений болезни в зависимости от экспрессии изучаемых генов, модулирующих апоптоз.

Цель работы – сравнить активность генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок PRAME с клиническими проявлениями болезни у первичных больных В-ХЛЛ.

Материалы и методы. У 23 больных с впервые выявленным В-ХЛЛ был определен уровень экспрессии проапоптотических генов FAS, TRAIL, TNFR2, DR4/5 и DR3, а также генов HSP27, XIAP, блокирующих апоптоз. Кроме того, была изучена экспрессия генов TP53 и P21 и раково-тестикулярного гена PRAME.

Результаты. Согласно данным многофакторного регрессионного анализа, наибольшее влияние на клиническую характеристику болезни оказал уровень экспрессии гена FAS в дебюте заболевания. В связи с этим больные были разделены на группы с нормальным (I группа) и низким уровнем гена (II группа). Низкий уровень экспрессии FAS (Me 387 %) был ассоциирован со II стадией заболевания ($p = 0,03$), большим количеством лимфоцитов ($p = 0,001$), меньшим количеством эритроцитов ($p = 0,08$) и меньшим уровнем экспрессии генов TNFR2 ($p = 0,08$), высоким уровнем экспрессии XIAP, HSP27 и P21. В целом антиапоптотический потенциал у больных II группы был выше, что сопровождалось более выраженными клиническими проявлениями болезни.

Заключение. Повышенный антиапоптотический потенциал опухолевых лимфоцитов при впервые выявленном В-ХЛЛ сопровождается большей массой опухоли и более выраженными клинико-гематологическими проявлениями болезни.

Ключевые слова: гены внешнего пути апоптоза, модуляторы апоптоза, хронический лимфолейкоз

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-41-46

EXPRESSION OF THE APOPTOSIS-RELATED GENES IN PATIENTS WITH NEWLY DIAGNOSED CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA IN CLINICAL DATA CONTEXT

S.G. Zakharov¹, A.K. Golenkov¹, A.V. Misyurin², E.V. Kataeva¹, A.A. Rudakova², M.A. Baryshnikova², T.A. Mitina¹, E.V. Trifonova¹, L.L. Vysotskaya¹, Yu.B. Chernykh¹, E.F. Klinushkina¹, K.A. Belousov¹, Yu.P. Finashutina², V.A. Misyurin²

¹MONIKI; bldg. 1, 61/2 Shchepkina St., Moscow 129110, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. The given data of fundamental studies of apoptosis processes in B-cell lymphocytic leukemia (B-CLL) testifies about the complexity and variety of mechanisms affecting the kinetics of normal cells and tumor lymphocytes in this disease. It is important to study the severity of clinical manifestations of the disease depending on the expression of the genes that modulate apoptosis.

The purpose of the study is to compare the activity of genes encoding apoptosis modulators, the cell cycle and cancer-testicular PRAME protein with clinical manifestations of the disease in primary patients with B-CLL.

Materials and methods. The level of expression of the proapoptotic genes FAS, TRAIL, TNFR2, DR4/5 and DR3, as well as the HSP27, XIAP genes, blocking apoptosis was determined in 23 patients with newly diagnosed chronic B-CLL. In addition, expression of genes TP53 and P21 and cancer-testis gene PRAME are tested.

Results. According to the multivariate regression analysis, the FAS gene expression in the onset of the disease had the greatest impact on the clinical characteristics of the disease. In this connection, the patients were divided into groups with normal (group) and low gene

level (group II). A low level of FAS expression (Me 387 %) was associated with stage II disease ($p = 0.03$), a large number of lymphocytes ($p = 0.001$), fewer erythrocytes ($p = 0.08$), and a lower level of TNFR2 gene expression ($p = 0.08$), high level of expression of XIAP, HSP27, P21. Overall, the anti-apoptotic potential in Group II patients was higher, which was accompanied by more pronounced clinical manifestations of the disease.

Conclusions. The increased anti-apoptotic potential of tumor lymphocytes in newly diagnosed B-CLL is accompanied by a larger tumor mass and greater clinical and hematological manifestation of the disease.

Key words: genes of the external apoptotic pathway, modulators of apoptosis, chronic lymphocytic leukemia

Ведение

В-клеточный хронический лимфолейкоз (В-ХЛЛ) относится к лимфопролиферативным заболеваниям и характеризуется вовлечением в патологический процесс костного мозга, крови, лимфатических узлов, печени и селезенки.

Опухолевые клетки при В-ХЛЛ имеют aberrantный иммунофенотип ($CD19^+/CD5^+/CD23^+/CD20^{low^+}/CD22^{low^+}$) и характеризуются низкой пролиферативной активностью. Многие авторы подтвердили снижение интенсивности апоптоза при В-ХЛЛ на основании иммунофенотипического анализа FAS-рецептора на поверхности опухолевых клеток [1, 2], а также при изучении экспрессии белков семейства BCL2, каспазы-3 [3] и цитокинов семейства TNF [4].

Опубликованные фундаментальные исследования по данной проблеме [5–9] позволяют охарактеризовать несколько рецепторзависимых (внешних) сигнальных путей апоптоза, которые могут быть моделью для изучения в опухолевых клетках при В-ХЛЛ.

Взаимодействие FAS-лиганда и FAS-рецептора с последующей активацией каспаз через внутриклеточный адаптер и дальнейшая инициация апоптоза через каспазу-8 и каспазу-3 является основным механизмом активности апоптоза.

Второй внешний путь активации апоптоза осуществляется за счет взаимодействия TNF и TNF-рецептора (TNFR1-2). Взаимодействие лиганд – рецептор сопровождается изменением конформации внутриклеточных адаптерных белков и передачи активирующего сигнала каспазе-8 и к каспазе-3, после чего осуществляется апоптоз. TNF-, TL1A- и TRAIL-зависимые системы, в отличие от FAS-, способны также подавлять апоптоз путем активации сигнального пути NF- κ B.

Взаимодействие TRAIL с его рецепторами семейства DR (DR4/5) может вызывать как активацию апоптоза, так и его торможение за счет активации NF- κ B.

К внешнему сигнальному пути активации апоптоза относится взаимодействие рецептора DR3 с лигандом TL1A, который по структуре не имеет принципиальных отличий от других лигандов семейства TNF. Важно подчеркнуть, что система TL1a-DR3 контролирует как апоптотический, так и антиапоптотический сигнальные пути [10, 11].

Кроме рецепторов внешнего пути апоптоза существует множество других факторов, имеющих значение в выживании опухолевой клетки. Прежде всего это белок p53, «страж генома», распознающий повреждения и запускающий программу по их репарации или самоустраниению клетки. Во время исправления повреждений p53 активирует белок p21, ингибирующий циклинзависимую киназу 1A и предотвращающий деление клетки. Следует отметить, что увеличение уровня экспрессии генов *TP53* и *P21* при В-ХЛЛ связано с прогрессированием [12]. При этом взаимодействие *TP53* и *P21* с генами внешнего пути апоптоза при В-ХЛЛ пока никем не проверялось.

Другими факторами, потенциально значимыми в патогенезе В-ХЛЛ, могут быть гены *HSP27* и *XIAP*. Белок Hsp27 представляет собой шаперон, защищающий другие белки клетки от тепловой денатурации. Экспрессия Hsp27 позволяет опухолевой клетке проявлять большую устойчивость к стрессу. Вследствие этого прогноз онкологического заболевания ухудшается [13]. Белок XIAP представляет собой ингибитор каспаз 3, 7 и 9. Это один из значимых маркеров неблагоприятного прогноза при онкологических и онкогематологических заболеваниях [14]. Особенности экспрессии XIAP при В-ХЛЛ остаются установленными.

Наконец, раково-тестикулярный белок PRAME также может быть значимым неблагоприятным признаком при В-ХЛЛ. Известно только, что активность данного маркера наблюдается чаще при более продвинутых стадиях заболевания [15]. Особое внимание следует уделить тому факту, что ген *PRAME* находится в локусе гена λ -цепи иммуноглобулина, что может нарушать его синтез при L-клональности В-ХЛЛ, что улучшает прогноз болезни [16]. Приведенные данные фундаментальных исследований процессов апоптоза при В-ХЛЛ свидетельствуют о сложности и многообразии механизмов, влияющих на кинетику нормальных клеток и опухолевых лимфоцитов при данном заболевании. Исходя из проведенного анализа важно также сравнение экспрессии генов рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза у здоровых людей и больных со впервые выявленным В-ХЛЛ, а также генов, блокирующих апоптоз. Важным является изучение выраженности клинических проявлений

болезни в зависимости от экспрессии изучаемых генов, модулирующих апоптоз.

Цель работы — сравнить активность генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок PRAME с клиническими проявлениями болезни у первичных больных В-ХЛЛ.

Материалы и методы

Изучение экспрессии проапоптотических и антиапоптотических генов и клинической характеристики у 23 больных с впервые выявленным В-ХЛЛ проведено в рамках проспективного клинического исследования. Был проведен исходный анализ экспрессии генов *FAS*, *TRAIL*, *TNFR2*, *DR4/5*, *DR3*, а также *HSP27*, *XIAP*, *TP53*, *P21* и *PRAME*. Контрольную группу составили 14 здоровых людей.

Среди исследуемых больных было 16 мужчин и 7 женщин в возрасте от 47 до 77 лет (средний возраст 64 года). Стадию болезни оценивали по Rai [17]. В I стадии были 4 больных, во II стадии — 12, в III стадии — 1, в IV стадии — 6. Установление диагноза выполняли в соответствии с критериями, предложенными Международной рабочей группой по хроническому лимфолейкозу (IWCLL, 2008) [17].

Для проведения топографической характеристики распространенности опухолевого процесса использовали метод ультразвукового исследования с исследованием 6 зон: области шеи, подмышечной области, средостения, паховой области, брюшной полости и забрюшинного пространства, размеров печени и селезенки. Внутригрудное поражение оценивали методом компьютерной томографии.

Для сравнительного анализа вводили понятия балльной оценки, где 1 зону поражения с обеих сторон принимали за 2 балла, с одной стороны — за 1 балл. Для оценки распространенности вычисляли сумму баллов. Поражение печени и селезенки оценивали баллами, где 0 — отсутствие поражения, 1 — размеры печени и селезенки меньше 5 см из-под края реберной дуги, 2 — размеры более 5 см.

Выделение общей рибонуклеиновой кислоты из клеток крови и синтез комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты. Перед выделением рибонуклеиновой кислоты (РНК) 5 мл крови смешивали с 45 мл 0,9 % раствора NH_4Cl и инкубировали в течение 10 мин. После этого проводили центрифугирование в течение 10 мин при 600g для осаждения лейкоцитов. Удаляли супернатант и клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 600g. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК по классическому протоколу [18]. Клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4М тиоционата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия,

0,5 % N-лаурил-саркозината натрия и 0,1М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 8000g и охлаждении до +4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000g, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при 37 °С, растворяли в 20 мкл деионизованной воды и измеряли концентрацию раствора. Для синтеза комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) брали 2 мкг матричной РНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления матричной РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизованной воды.

Количественная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Количественную полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени проводили с использованием двукратной реакционной смеси (40 мМ трис- HCl , 100 мМ KCl , 4 мМ MgCl_2 , 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ β -меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, по 250 нМ прямого и обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с помощью программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *HSP27*, *XIAP*, *TP53*, *P21* и *PRAME*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. В каждом образце был исследован уровень экспрессии анализируемых генов. Данный эксперимент проводили на приборе DTlite («ДНК-технология», Россия). Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при 94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при 94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при 60 °С. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Перед секвенированием ампликон, полученный в результате ПЦР с праймерами, разработанными для анализа экспрессии генов, был обработан наборами BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) и BigDye® X Terminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ данных. Для поиска связи уровня экспрессии изучаемых генов и клинических характеристик больных применялся многофакторный регрессионный анализ. Поскольку непрерывные данные имели ненормальное распределение, для статистического анализа использовали непараметрические критерии. Для исследования связи уровня экспрессии генов с качественными и количественными параметрами использовали критерии χ^2 и U -критерий Манна–Уитни соответственно. Для анализа величины изменения таких признаков, как количество лимфоцитов, размер лимфатических узлов, печени и селезенки, а также уровня экспрессии исследованных генов использовали критерий Уилкоксона. Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Количественные данные представлены в виде медианы значения и граничными значениями, охваченными доверительным интервалом 0,95.

Результаты

Для многофакторного регрессионного анализа в качестве независимых переменных были включены данные по уровню экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, *PRAME*, *TP53*, *P21*, *HSP27* и *XIAP*, а в качестве зависимой переменной – уровень лимфоцитов и другие клинические параметры. При сопоставлении активности генов *FAS*, *DR4/5* и *PRAME* у больных и у здоровых людей было установлено их значимое различие (табл. 1).

Поскольку у больных наблюдался большой разброс уровня экспрессии гена *FAS*, для дальнейшего исследования выборка была разделена на группы. В группу 1 были включены больные, имеющие уровень экспрессии гена *FAS*, близкий к уровню, наблюдаемому у здоровых доноров, обозначенный нами как нормальный уровень экспрессии. В группу 2 были включены все остальные больные. В качестве нижней границы нормального уровня экспрессии *FAS* использовался 25-й перцентиль, наблюдаемый у здоровых доноров.

При анализе показателей экспрессии генов в 2 группах больных в зависимости от значений гена *FAS*

Таблица 1. Уровень экспрессии генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок *PRAME* у 23 больных с впервые выявленным В-клеточным хроническим лимфолейкозом и 14 здоровых людей

Ген	Уровень экспрессии гена (Ме), %		p -значение (U -критерий)
	у здоровых	у больных	
<i>DR3</i>	41 (3,9–124)	166 (0,3–862)	0,1272
<i>DR4/5</i>	335 (171–951)	744 (341–1215)	0,0009
<i>FAS</i>	7052 (3430–12980)	857 (112–12980)	0,0012
<i>TNFR2</i>	5138 (1535–15010)	2343 (559–11140)	0,0890
<i>TRAIL</i>	7151 (2186–12360)	6702 (434–19670)	0,5469
<i>PRAME</i>	0	0,05 (0–0,21)	0,0163
<i>TP53</i>	1252 (453–2728)	1648 (210–9177)	0,9025
<i>P21</i>	2293 (757–7301)	1870 (16–4817)	0,3165
<i>HSP27</i>	1904 (578–6869)	4750 (16–96880)	0,2223
<i>XIAP</i>	1334,5 (279–5610)	1997 (41–6765)	0,3436

по некоторым результатам были выявлены статистически значимые различия (табл. 2).

Таблица 2. Сопоставление активности генов, кодирующих модуляторы апоптоза, клеточного цикла и раково-тестикулярный белок *PRAME* у 23 больных с впервые выявленным В-клеточным хроническим лимфолейкозом в зависимости от интенсивности экспрессии гена *FAS*

Параметр	Показатель у больных		p -значение (U -критерий)
	с нормальным уровнем экспрессии <i>FAS</i> , $n = 7$ (группа 1)	с низким уровнем экспрессии <i>FAS</i> , $n = 16$ (группа 2)	
<i>DR3</i>	21 (0,3–178)	322 (1,2–1075)	0,0372
<i>DR4/5</i>	752 (341–1603)	811 (428–1215)	0,6816
<i>FAS</i>	10540 (4817–16200)	387 (113–1025)	0,0009
<i>TNFR2</i>	8988 (1622–74960)	1759 (559–5050)	0,0187
<i>TRAIL</i>	10180 (2111–34250)	2593 (436–15310)	0,0335
<i>PRAME</i>	0,065 (0,0–1)	0 (0–0,01)	0,1912
<i>TP53</i>	1107,5 (528–7934)	2196,5 (210–9177)	0,8366
<i>P21</i>	444 (363–1318)	2719 (16–22130)	0,0372
<i>HSP27</i>	301 (16–668)	6966 (650–17130)	0,0372
<i>XIAP</i>	453 (41–479)	2409,5 (100–5642)	0,0063

Экспрессия генов *DR3*, *P21*, *HSP27*, *XIAP* была статистически значимо выше в группе с низким уровнем экспрессии *FAS*. Экспрессия генов *TNFR2* и *TRAIL* в этой же группе была статистически значимо ниже, чем в группе с нормальным уровнем экспрессии гена *FAS*. Таким образом, в группе 2 была

Таблица 3. Клиническая характеристика 23 больных с впервые выявленным В-клеточным хроническим лимфолейкозом, имеющих различный уровень экспрессии генов *FAS*

Параметр	Показатель у больных		<i>p</i> -значение (<i>U</i> -критерий)*; χ^2 **
	с нормальным уровнем экспрессии генов <i>FAS</i> , <i>n</i> = 7	с низким уровнем экспрессии генов <i>FAS</i> , <i>n</i> = 16	
Возраст, лет	67 (63–75)	62,5 (47–78)	0,1845*
Мужчины, %	86	69	0,3939**
Степень поражения лимфатических узлов, баллы	6 (6–10)	7 (2–12)	0,4423*
Степень поражения печени, баллы	0 (0–1)	1 (0–1)	0,0399*
Степень поражения селезенки, баллы	1 (0–2)	1 (0–2)	0,1508*
Количество лимфоцитов, 10^9 /л	6,05 (2,96–15)	69,7 (5,51–216)	0,0011*
Концентрация гемоглобина, г/л	137,8 (122–149)	122 (74–167)	0,0883*
Количество эритроцитов, 10^{12} /л	4,39 (4,2–4,97)	3,88 (2,27–5,43)	0,0884*
Количество клеток с иммунофенотипом CD19 ⁺ /CD5 ⁺ , % от всех ядерных клеток	54,2 (0,9–82,4)	64 (6,7–94,6)	0,866*
Экспрессия CD38, % от общего числа клеток	3,92 (0,7–7,5)	7,25 (0,8–89,3)	0,7459*
I–II стадия заболевания, %	100	56	0,0359**

противоположная динамика значений генов *DR3*, *P21*, *HSP27* и *XIAP* относительно гена *FAS* и совпадающая динамика значений генов *TNFR2* и *TRAIL*. Следующим этапом исследования было изучение экспрессии генов, модулирующих апоптоз в сравнении с клиническими данными (табл. 3).

В результате установлено, что в группе больных с низким уровнем экспрессии гена *FAS* было статистически значимо большее поражение печени, большее количество лимфоцитов крови ($p = 0,001$), близкое к значимому снижение Hb и количества эритроцитов. Число больных I и II стадии болезни было статистически значимо ниже в группе с низкой экспрессией гена *FAS*.

Обсуждение

Проведенное исследование было посвящено изучению экспрессии генов внешних путей апоптоза, а также генов, блокирующих апоптоз при впервые выявленном В-ХЛЛ. Была изучена экспрессия генов, обеспечивающих чувствительность к внешнему пути апоптоза *DR3*, *DR4/5*, *FAS*, *TNFR2*, *TRAIL*, а также генов-модуляторов апоптоза *TP53*, *P21*, *HSP27* и *XIAP*, и раково-тестикулярного гена *PRAME*, клиническое значение которых при В-ХЛЛ в настоящее время недостаточно хорошо изучено. Следует подчеркнуть, что предпринятый подход в изучении

процессов апоптоза при В-ХЛЛ с позиции функциональной характеристики основных генов внешнего пути представляется достаточно новым и важным.

Построение регрессионной модели позволило установить наиболее значимые факторы, влияющие на клинические параметры первичных больных. Это были гены *FAS* и *XIAP*.

На основании активности гена *FAS* были выделены 2 группы больных с нормальной (1-я группа) и низкой (2-я группа) его активностью. При сравнительном анализе отмечается статистически значимое снижение активности проапоптотических генов во 2-й группе больных. Это относится к генам *FAS*, *TNFR2* и *TRAIL* с одновременным повышением экспрессии антиапоптотического гена *XIAP*. Установленное сочетание активности свидетельствует о повышенном генетическом потенциале, направленном на блокирование апоптоза в этой группе больных. В рамках этой концепции следует рассматривать повышение экспрессии гена *P21*, блокирующего пролиферацию ($p = 0,03$) и повышение экспрессии *HSP27*, снижающего активность апоптоза ($p = 0,03$). При этом затруднена оценка достоверного повышения экспрессии гена *DR3* во 2-й группе больных в связи с его вариабельным влиянием на процессы апоптоза. Экспрессия гена *PRAME* в исследуемой группе больных В-ХЛЛ была диагностически незначима.

Заключение

Сравнительный анализ экспрессии генов, модулирующих апоптоз, в 2 группах больных, разделенных по уровню экспрессии гена *FAS*, показал более выраженный антиапоптотический потенциал в группе с низкой активностью этого гена. Проведенный сравнительный клинико-генетический анализ позволил выявить более выраженные проявления болезни во 2-й группе больных с большим антиапоптотическим потенциалом опухолевых лимфоци-

тов. Это касается большей инфильтрации печени ($p = 0,03$), лимфоцитоза ($p = 0,001$), сниженного уровня Hb ($p = 0,08$) и количества эритроцитов ($p = 0,08$), а также продвинутой стадии болезни ($p = 0,03$). В целом проведенная работа показала, что повышенный антиапоптотический потенциал опухолевых лимфоцитов при впервые выявленном В-ХЛЛ сопровождается большей массой опухоли и большими клинико-гематологическими проявлениями болезни.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышников А. Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака. Бюллетень Сибирского отделения Российской академии медицинских наук 2004;24(2):59–63. [Baryshnikov A. Yu. Principles and practice of vaccinotherapy for cancer. Byulleten Sibirskogo otdeleniya Rossiyskoy akademii medicinskih nauk = Bulletin of the Siberian Division of Russian Medical Sciences Academy 2004;24(2):59–63. (In Russ.)].
2. Барышников А. Ю., Шишкин Ю. В. *FAS/APO-1* антиген — молекула, опосредующая апоптоз. Гематология и трансфузиология 1995;6:35–8. [Baryshnikov A. Yu., Shishkin Yu. V. *FAS/APO-1* antigen — apoptose condensing molecula. Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology 1995;6:35–8 (In Russ.)].
3. Kitada S., Andersen J., Akar S. et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with *in vitro* and *in vivo* chemoresponses. Blood 1998;91(9):3379–89.
4. Jablonska E., Kiersnowska-Rogowska B., Rogowski F. et al. TNF family molecules in the serum of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). Neoplasma 2008;55(1):51–4. DOI: 10.1080/10428190500158789.
5. Aggarwal B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nature Rev. Immunol. 2003; 3(9):745–56. DOI: 10.1038/nri1184.
6. Chakrabandhu K., Huault S., Garmy N. The extracellular glycosphingolipid-binding motif of Fas defines its internalization route, mode and outcome of signals upon activation by ligand. Cell Death Differ. 2008;15(12):1824–37. DOI: 10.1038/cdd.2008.115.
7. Ea C. K., Deng L., Xia Z. P. et al. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. Mol. Cell. 2006;22(2):245–57. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.026.
8. Falschlehner C., Ganten T. M., Koschny R. TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. Adv. Exp. Med. Biol. 2009;647:195–206. DOI: 10.1007/978-0-387-89520-8_14.
9. LeBlanc H. N., Ashkenazi A. Apo2L/ TRAIL and its death and decoy receptors. Cell Death Differ. 2003;10(1):66–75. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401187.
10. Meylan F., Richard A. C., Siegel R. M. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. Immunol Rev. 2011;244(1):188–96. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01068.x.
11. Wen L., Zhuang L., Luo X., Wei P. TL1A-induced NF- κ B activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells. J. Biol. Chem. 2003;278(40):39251–8. DOI: 10.1074/jbc.M305833200.
12. Halina A., Artur P., Barbara M. K. et al. Alterations in TP53, cyclin D2, c-Myc, p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 expression associated with progression in B-CLL. Folia Histochem Cytobiol. 2010;48(4):534–41. DOI: 10.2478/v10042-010-0048-5.
13. Sarto C., Binz P. A., Mocarelli P. Heat shock proteins in human cancer. Electrophoresis 2000;21(6):1218–26. DOI: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1218::AID-ELPS1218>3.0.CO;2-H.
14. Deveraux Q. L., Reed J. C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. Genes Dev. 1999;13(3):239–52.
15. Paydas S., Tanriverdi K., Yavuz S., Seydaoglu G. PRAME mRNA levels in cases with chronic leukemia: Clinical importance and review of the literature. Leuk Res. 2007;31(3):365–9. DOI: 10.1016/j.leukres.2006.06.022.
16. Gunn S. R., Bolla A. R., Barron L. L. et al. Array CGH analysis of chronic lymphocytic leukemia reveals frequent cryptic monoallelic and biallelic deletions of chromosome 22q11 that include the PRAME gene. Leuk Res. 2009;33(9):1276–81. DOI: 10.1016/j.leukres.2008.10.010.
17. Hallek M., Cheson B. D., Catovsky D. et al. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute — Working Group 1996 guidelines. Blood 2008;111(12):5446–56. DOI: 10.1182/blood-2007-06-093906.
18. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty something years on. Nat Protoc. 2006;1(2):581–5. DOI: 10.1038/nprot.2006.83.

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА СЕРИИ ИКО В ТРЕХЦВЕТНОМ АНАЛИЗЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Е. Н. Захарова, Т. Н. Заботина, О. В. Короткова, М. Е. Копырулина, И. В. Паниченко,
В. Т. Циклаури, И. А. Задеренко, Д. Ю. Блохин, П. К. Иванов

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Николаевна Захарова zakharovaen@yandex.ru

Введение. Клинические исследования показали, что у большинства онкологических больных наблюдаются нарушения иммунологической реактивности. Мониторинг состояния иммунной системы больных с солидными опухолями включает субпопуляционный анализ иммунокомпетентных клеток (ИКК), основанный на изучении экспрессии поверхностных антигенов и внутриклеточных структур, и анализ функциональной активности ИКК. В настоящее время для субпопуляционного анализа лимфоцитов человека используют двух-, трех- и даже четырехцветные реакции иммунофлуоресценции (РИФ), позволяющие одновременно определять в одном образце несколько различных антигенов. Для этого используют сбалансированные смеси («коктейли») иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ) различной антигенной специфичности, несущих разную флуоресцентную метку. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России путем конъюгирования моноклональных антител (МКА) серии ИКО и флуоресцентных красителей — флуоресцеина в форме изотиоцианатного эфира (FITC), моносукцинимидного эфира Alexa-488, цианиновых производных Imd306, Imd506 и растительного белка группы фикобилипротеинов фикоэритрина (PE) получены и охарактеризованы лабораторные образцы ИФЗ. Исследования этих конъюгатов показали их пригодность для одно- и двухцветного анализа субпопуляций лимфоцитов периферической крови человека методом проточной цитометрии.

Цель исследования — оценить возможность совместного использования нескольких ИФЗ на основе различных МКА серии ИКО и красителей FITC, Imd306, Imd506 и PE для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов здоровых людей и пациентов с онкологическими заболеваниями методом проточной цитометрии.

Материалы и методы. В работе использовали панель ИФЗ, включающую зонды CD3-FITC, CD4-PE, CD8-Imd506, CD4-Imd306, полученные конъюгированием МКА серии ИКО разной специфичности и флуорофоров FITC, PE, Imd306 и Imd506 соответственно. Специфическую активность зондов оценивали в монохромных, двух- и трехцветных РИФ методом проточной цитометрии. Для оптимизации состава смесей ИФЗ и условий постановки РИФ в качестве исследуемого биологического материала использовали образцы венозной крови практически здоровых доноров. Клиническую апробацию полученных «коктейлей» проводили на 2 группах пациентов с онкологическими заболеваниями до и после хирургического лечения. Первая группа включала 64 больных раком слизистой оболочки полости рта. Вторая группа — 35 больных раком яичников.

Результаты. Показано, что для трехцветного анализа лимфоцитов человека методом проточной цитометрии рекомендуется использовать наборы меченых МКА: CD3-FITC (10 мкг/мл) + CD4-Imd306 с концентрацией 5–10 мкг/мл; CD3-FITC + CD4-PE с концентрацией 20 мкг/мл и CD3-FITC + CD8-Imd506 с концентрацией 10 мкг/мл. Указана конечная концентрация иммуноглобулина в растворе ИФЗ. Показано, что еще до начала лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта в структуре Т-клеток статистически достоверно снижено содержание CD3⁺CD4⁺, а общий уровень CD8⁺ лимфоцитов достоверно превышает показатели донорской группы. Анализ линейных маркеров, характеризующих основную структуру лимфоидных клеток у первичных больных раком яичников, позволил выявить статистически значимое снижение по сравнению с показателями у доноров общего количества CD3⁺ Т-лимфоцитов. Не выявлено влияния проведенного хирургического лечения на показатели субпопуляционной структуры лимфоидных клеток.

Заключение. Комбинации флуоресцентных зондов CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 и CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 могут использоваться для трехцветного анализа методом проточной цитометрии субпопуляций лимфоцитов как практически здоровых доноров, так и онкологических больных. Сравнительные исследования специфической активности комбинаций ИФЗ на основе МКА серии ИКО и референтных коммерческих тест-систем (BD Biosciences) на лимфоцитах здоровых доноров и онкологических больных (рак яичников, рак слизистой оболочки полости рта) показали сопоставимые результаты. Применение полученных зондов позволило выявить нарушения субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови у больных раком яичников и раком слизистой оболочки полости рта, в частности CD3⁺/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺.

Ключевые слова: моноклональные антитела, иммунофенотипирование, проточная цитометрия, трехцветный анализ, иммунофлуоресцентные зонды

MONOCLONAL ANTIBODIES OF IKO SERIES IN THE THREE-COLOR ANALYSIS OF SUB-POPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD T-LYMPHOCYTES OF ONCOLOGICAL PATIENTS

E.N. Zakharova, T.N. Zabolina, O.V. Korotkova, M.E. Kopyrulina, I.V. Panichenko, V.T. Tsiklauri, I.A. Zaderenko, D. Yu. Blokhin, P.K. Ivanov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Clinical studies have shown that the most oncological patients have impaired immunological reactivity. Monitoring of the immune system status of patients with solid tumors includes a subpopulation analysis of immunocompetent cells. It is based on the study of expression of surface antigens and intracellular structures, and an analysis of the functional activity of immunocompetent cells. Today two, three, and even four-color reagents are used for subpopulation analysis of lymphocytes. Fluorescent conjugate with monoclonal antibodies (MAB) of the IKO series and fluorescent dyes Imd-306, Imd-506 (cyanine) and phycoerythrin (a group of phycoobiliproteins) was received and characterized in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. These conjugates have proved themselves in one and two-color analysis of subpopulations of peripheral blood lymphocytes by flow cytometry.

The purpose of this study is to assess the possibility of sharing several immunofluorescent probes (IFP) on the basis of different Mab series of IKO and dyes FITC, Imd306, Imd506 and PE for three-color analysis of lymphocyte subpopulations of donors and patients with oncological diseases by flow cytometry method.

Materials and methods. A panel of immunofluorescent probes (IFP) CD3FITC, CD4PE, CD8-Imd506, CD4-Imd306 was used in the work. Probes are obtained with MAB (IKO series) and fluorophores FITC, PE, Imd-306, Imd-506. The specific activity of the probes was evaluated in the immunofluorescence reaction by flow cytometry. Donor's peripheral blood was used to optimize the conditions of the immunofluorescence reaction. Clinical approbation of the obtained sets was carried out on 2 groups of patients with oncological diseases before and after surgical treatment. The first group included 64 patients with cancer of the oral mucosa. The second group consists of 35 patients with ovarian cancer.

Results. We have shown that for the three-color analysis of human lymphocytes by flow cytometry, it is recommended to use sets of labeled MAB: CD3-FITC (10 µg/ml) + CD4-Imd306 at a concentration of 5–10 µg/ml; CD3-FITC + CD4-PE at a concentration of 20 µg/ml and CD3-FITC + CD8 Imd506 at a concentration of 10 µg/ml. The final concentration of immunoglobulin in the solution of IPS is indicated. It was shown that even before the beginning of treatment in patients with cancer of the oral mucosa the subpopulation CD3⁺ CD4⁺ content was significantly lowered in the structure of T cells, and the total level of CD8⁺ lymphocytes significantly exceeds the parameters of the donor group. Analysis of linear CD markers of lymphoid cells in patients with ovarian cancer revealed a significant decrease in the total number of CD3⁺ T-lymphocytes in comparison with donors. There was no evidence of the effect of surgical treatment on the subpopulation structure of lymphoid cells.

Conclusion. Combinations of fluorescent probes CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 and CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 can be used for trichromatic analysis by flow cytometry of the lymphocyte subpopulations of both healthy donors and cancer patients. Comparative studies of the specific activity of combinations of IFP based on Mab IKO series and reference commercial test systems (BD Biosciences) on lymphocytes of healthy donors and oncological patients (ovarian cancer, oral mucosa cancer) showed comparable results. The application of the obtained probes made it possible to reveal violations of the subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes in patients with ovarian cancer and cancer of the oral mucosa, in particular, CD3⁺/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺.

Key words: monoclonal antibodies, flow cytometry, immunofluorescent probes, MAB conjugates, three-color analysis

Введение

Среди иммунологических факторов в противоопухолевой защите доминирующая роль отводится клеточному иммунному ответу. Наиболее активными клетками в разрушении опухоли являются Т-лимфоциты и НК-клетки, оказывающие свое прямое (в результате индукции апоптоза или путем выделения гранзима В и перфорина) или опосредованное продукцией цитокинов действие на клетки-мишени [1], а также макрофаги и дендритные клетки. Клинические исследования показали, что у большинства онкологических больных присутствуют нарушения иммунологической реактивности [2–11]. Мониторинг состояния иммунной системы больных с солидными опухолями включает субпопуляционный анализ иммунокомпетентных клеток (ИКК), основанный на изучении экспрессии поверхностных антигенов

и внутриклеточных структур, и анализ функциональной активности ИКК. Иммунофенотипирование лимфоцитов проводится методом проточной цитометрии с использованием антител к дифференцировочным антигенам лейкоцитов. Если до недавнего времени такого рода исследования проводились в режиме монохроматического анализа, то сегодня для субпопуляционного анализа лимфоцитов используют двух-, трех- и даже четырехцветные реакции. Такой подход позволяет проводить исследование клеточного звена иммунитета в норме и при патологии на современном уровне, оценивать содержание и функциональную активность различных клеточных субпопуляций (клеток эффекторного звена, регуляторных клеток), проводить дифференциальную диагностику патологических состояний. Для выполнения таких анализов применяются смеси нескольких

иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ). Каждый из них обладает собственной антигенной специфичностью и индивидуальными спектральными характеристиками. Флуоресцентные зонды для иммунофенотипирования лейкоцитов человека получают конъюгированием специфических моноклональных антител (МКА) к поверхностным и внутриклеточным антигенам с флуоресцентными красителями. Выбор пригодных для цитометрического анализа флуорофоров напрямую связан с конструкцией цитометра, в первую очередь с длиной волны возбуждающего флуоресценцию светового пучка, а также со спектральными диапазонами каналов регистрации флуоресцентного сигнала.

В нашей стране исследования в области гибридной технологии привели к созданию собственных панелей МКА [12–14]. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина (ранее Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина) были получены и охарактеризованы МКА серии ИКО [15–17], на основе которых в дальнейшем получены конъюгаты с флуорофорами в форме изотиоцианатного эфира (FITC), растительного белка группы фикобилипротеинов фикоэритрина (PE), цианиновых производных Imd306, Imd506, моносукцинимидного эфира Alexa-488 [18–21]. Показано, что ИФЗ на основе МКА серии ИКО по специфической активности не уступают коммерческим аналогам в одно- и двухцветном анализе субпопуляций лимфоцитов человека.

Цель данного исследования — оценить возможность совместного использования нескольких ИФЗ на основе различных МКА серии ИКО и красителей FITC, Imd306, Imd506 и PE для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов здоровых лиц и пациентов с онкологическими заболеваниями методом точной цитометрии.

Материалы и методы

В работе использовали панель ИФЗ CD3-FITC, CD4-PE, CD8-Imd506, CD4-Imd306. Зонды получены на основе соответствующих МКА серии ИКО и флуорофоров FITC, PE, Imd306, Imd506 [18]. Характеристика этих ИФЗ представлена в табл. 1.

В качестве референтного контроля применяли прямо меченные МКА производства BD Biosciences (США): CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE.

Фосфатно-солевой буфер (PBS) (ООО «ПанЭко», Россия) готовили по инструкции производителя, pH готового раствора 7,4.

Эритроциты, содержащиеся в образцах крови, разрушали с использованием лизирующего раствора FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США).

Доноры и больные

Для оптимизации состава смесей ИФЗ и условий постановки реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в качестве исследуемого биологического материала использовали образцы венозной крови практически здоровых доноров. Кровь забирали из локтевой вены натошак, в качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту. Клиническую апробацию полученных «коктейлей» проводили на 2 группах пациентов с онкологическими заболеваниями до и после хирургического лечения: 1-я группа включала 64 больных раком слизистой оболочки полости рта, 2-я — 35 больных раком яичников.

Прямая реакция иммунофлуоресценции

В прямой РИФ клетки крови здоровых доноров инкубировали с конъюгатами МКА в течение 20 мин при 18–25 °С в темноте. Эритроциты лизировали раствором FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). Не связавшиеся с клетками МКА удаляли двукратной отмывкой PBS (pH 7,4) и фиксировали образцы PBS с содержанием 0,4 % формальдегида.

Таблица 1. Характеристика иммунофлуоресцентных зондов на основе моноклональных антител серии ИКО

Антиген	CD3	CD4		CD8
МКА серии ИКО	ИКО 90	ИКО 86		ИКО 31
Распознаваемые клетки/структуры	Т-клетки	Субпопуляции Т-клеток		Субпопуляции Т-клеток
Аналог фирмы BD Biosciences	Leu4	Leu3a		Leu2b
Флуорофор	FITC	Imd306	PE	Imd506
Длина волны возбуждающего света, нм	488	488	488	635
Максимум испускания флуорофора, нм	520	563	573	659
Производитель флуорофора	Sigma (США)	ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия	Sigma (США)	ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия

Метод проточной цитометрии

В работе использовали проточный двухлучевой цитометр FACSCalibur (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest. Флуоресценцию учитывали в спектральных диапазонах 512–547 нм (FL1 для FITC), 575–595 нм (FL2 для PE, Imd306) и 650–670 нм (FL4 для Imd506). Для анализа клеточных популяций учитывали также показатели прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания, на основании которых выполняли гейтирование — программное «выделение» субпопуляции лимфоцитов и дискриминацию иных субпопуляций. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов. Обработку файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8, находящегося в свободном доступе в сети Интернет.

Статистическая обработка данных

Использовали программное обеспечение Sigma Plot 11.0 для Windows. Достоверность различий в исследовании оценивали по t-критерию Стьюдента и непараметрическим критериям Вилкоксона—Манна—Уитни и Фишера в зависимости от характера распределения значений выборки. Различия считали достоверными при $p < 0,05$. Для определения достоверности корреляционной связи между данными, полученными с применением эталонных реагентов и экспериментальных флуоресцентных зондов, рассчитывали ранговый коэффициент корреляции Спирмена. Все результаты представлены в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки.

Результаты

В отличие от монохромной РИФ, при постановке реакции для многоцветного анализа в реакционной смеси с клетками крови одновременно присутствуют 2 и более флуоресцентных зонда, в связи с чем должно учитываться их возможное взаимное влияние на конечные результаты анализа. Так, выявляемые разными зондами антигенные эпитопы могут располагаться на клеточной поверхности в непосредственной близости друг к другу таким образом, что связывание одного зонда со «своим» антигеном создаст стерическое препятствие для связывания с клеткой другого зонда, в результате чего полученный результат анализа может оказаться не равным сумме отдельных монохромных реакций.

Для определения рабочего титра растворов полученных ИФЗ использовали метод титрования антител, предложенный С.С. Stewart [22]. Метод основан на дробном разведении раствора ИФЗ с определением предельного значения фактора разведения, при котором в прямой РИФ еще сохраняется максимальная интенсивность флуоресценции антигенпозитивных клеток.

Ранее нами показано, что для двухцветного анализа лимфоцитов человека методом проточной цитометрии рекомендуется использовать наборы меченых МКА: CD3-FITC (10 мкг/мл) + CD4-Imd306 с концентрацией 5–10 мкг/мл; CD3-FITC + CD4-PE с концентрацией 20 мкг/мл и CD3-FITC + CD8-Imd506 с концентрацией 10 мкг/мл. Указана конечная концентрация иммуноглобулина в растворе ИФЗ.

Для оценки возможности совместного применения различных зондов в одной трехцветной РИФ используется простой методический прием: в 4 пробирки вносят образец исследуемой крови, после чего в 1-ю пробирку добавляют раствор 1-го ИФЗ (например, CD3-FITC) в оптимальной конечной концентрации, во 2-ю пробирку — раствор 2-го ИФЗ (например, CD4-Imd306 или CD4-PE), в 3-ю — раствор 3-го ИФЗ (CD8-Imd506), а в 4-ю — смесь всех 3 зондов в той же конечной концентрации каждого.

После выполнения прямой РИФ все 4 образца анализируют на проточном цитометре. По результатам анализа строят гистограммы распределения зарегистрированных событий по 1-му каналу флуоресценции (FL1) для содержимого пробирки № 1 и 4 (CD3-FITC), по 2-му каналу (FL2) — для пробирок № 2 и 4 (CD4-Imd306 или CD4-PE), по 4-му каналу (FL4) — для содержимого пробирок № 3 и 4 (CD8-Imd506). Гистограммы, построенные по результатам монохромного анализа (пробирки № 1–3), должны с точностью совпадать с соответствующими гистограммами трехцветного анализа (пробирка № 4). Если на гистограммах по результатам анализа содержимого пробирки № 4 положение пика специфической флуоресценции смещается влево относительно того же пика для пробирок № 1 и/или № 2, 3, в реакционной смеси для трехцветной РИФ следует увеличить конечную концентрацию соответствующего зонда до достижения требуемого соответствия. Если это не приводит к положительному результату, данная смесь зондов не может использоваться для трехцветного окрашивания в одной реакции.

Возможность использования полученных ИФЗ в трехцветном анализе продемонстрирована ниже: на рис. 1а представлена 3D-диаграмма распределения лимфоцитов крови здорового донора при трехцветном анализе с использованием «коктейля» зондов CD3-FITC (FL1) с конечной концентрацией 10 мкг/мл, CD4-PE (FL2) с концентрацией 20 мкг/мл, CD8-Imd506 (FL4) с концентрацией 10 мкг/мл. На рис. 1б — 3D-диаграмма распределения лимфоцитов того же образца крови при трехцветном анализе с использованием «коктейля» зондов CD3-FITC (FL1) с конечной концентрацией 10 мкг/мл, CD4-Imd306 (FL2) с концентрацией 10 мкг/мл, CD8-Imd506 (FL4) с концентрацией 10 мкг/мл.

В обеих комбинациях используется одна пара зондов CD3-FITC и CD8-Imd506, а 3-й компонент

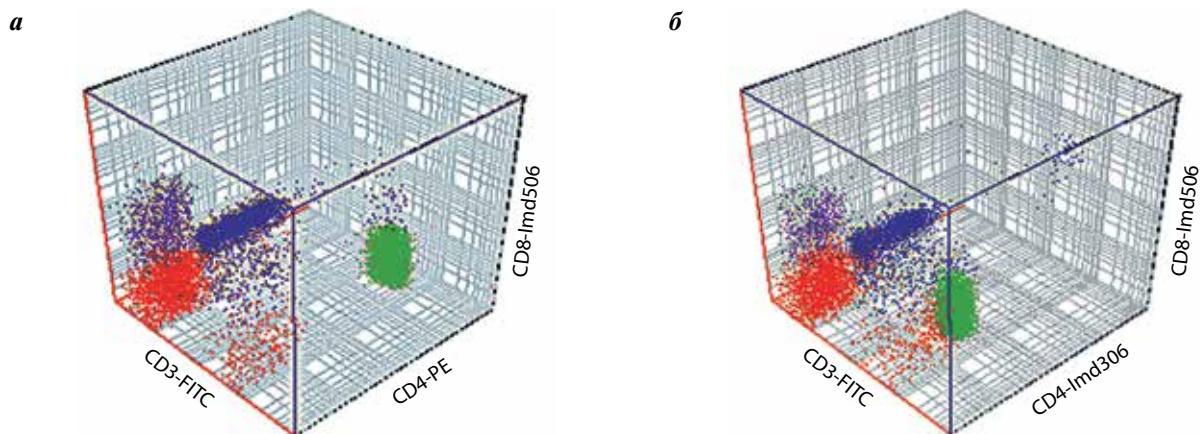


Рис. 1. Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием комбинации CD3-FITC / CD4-PE / CD8-Imd506 (а). Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови того же донора с использованием комбинации CD3-FITC / CD4-Imd306 / CD8-Imd506 (б)

Таблица 2. Анализ лимфоцитов периферической крови здоровых доноров с применением референтных реагентов (BD Biosciences) и иммунофлуоресцентных зондов на основе моноклональных антител серии ИКО, процент антигенпозитивных клеток в образце ($n = 39$, $M \pm m$)

Маркер	BD Biosciences	CD3-FITC / CD4-PE / CD8-Imd506	CD3-FITC / CD4-Imd306 / CD8-Imd506
CD3 ⁺	74,0 ± 1,5	75,0 ± 2,9	74,7 ± 2,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,0 ± 1,6	43,9 ± 1,1	44,1 ± 1,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	27,0 ± 1,1	28,1 ± 1,7	26,7 ± 1,4
CD3 ⁻ CD8 ⁺	7,5 ± 0,6	7,8 ± 1,1	6,9 ± 1,4
CD8 ⁺	34,5 ± 1,4	35,1 ± 1,2	34,4 ± 1,1
Коэффициент корреляции Спирмена (R)	—	0,975	0,889
<i>p</i>		<0,05	<0,05

обеих смесей различен: CD4-Imd306 (10 мкг/мл) в 1-й смеси или CD4-PE (20 мкг/мл) — во 2-й. Работоспособность каждого из этих ИФЗ «в составе смеси» определяется по степени совпадения гистограмм, полученных в монохромном или в многоцветном анализе клеточных популяций. На рис. 2а представлены совмещенные гистограммы по каналу FL1 для монохромного (голубое заполнение) и многоцветного (черный контур) анализа, на рис. 2б — аналогичные совмещенные гистограммы по каналу FL4.

Гистограммы практически идентичны, что указывает на отсутствие негативного влияния каждого из этих ИФЗ на связывание зондов со своими антигенами-мишенями при их одновременном и совместном использовании в испытанных концентрациях.

Аналогичным образом проанализирована пригодность для работы «в составе смеси» 3-го

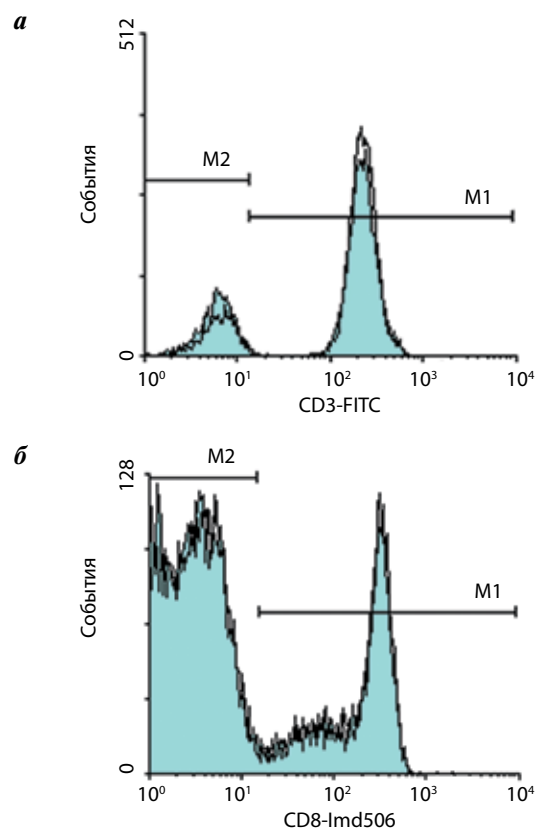


Рис. 2. Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD3-FITC (10 мкг/мл) (а). Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD8-Imd506 (10 мкг/мл) (б). Голубым заполнением выделены гистограммы, полученные при монохромном анализе, черным контуром — при многоцветном анализе

компонента испытанных смесей ИФЗ: CD4-PE (20 мкг/мл) или CD4-Imd306 (10 мкг/мл). На рис. 3 представлены совмещенные гистограммы по каналу FL2 для монохромного (голубое заполнение)

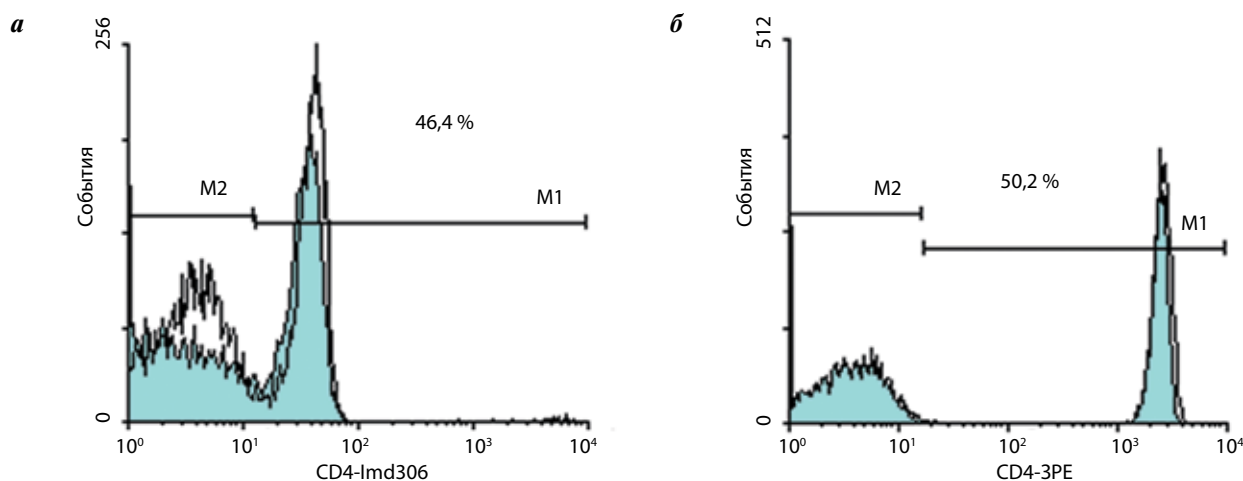


Рис. 3. Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием конъюгата CD4-Imd306 (10 мкг/мл) (а). Одно- и многоцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови того же донора с использованием конъюгата CD4-PE (20 мкг/мл) (б). Голубым заполнением выделены гистограммы, полученные при монохромном анализе, черным контуром — при многоцветном анализе

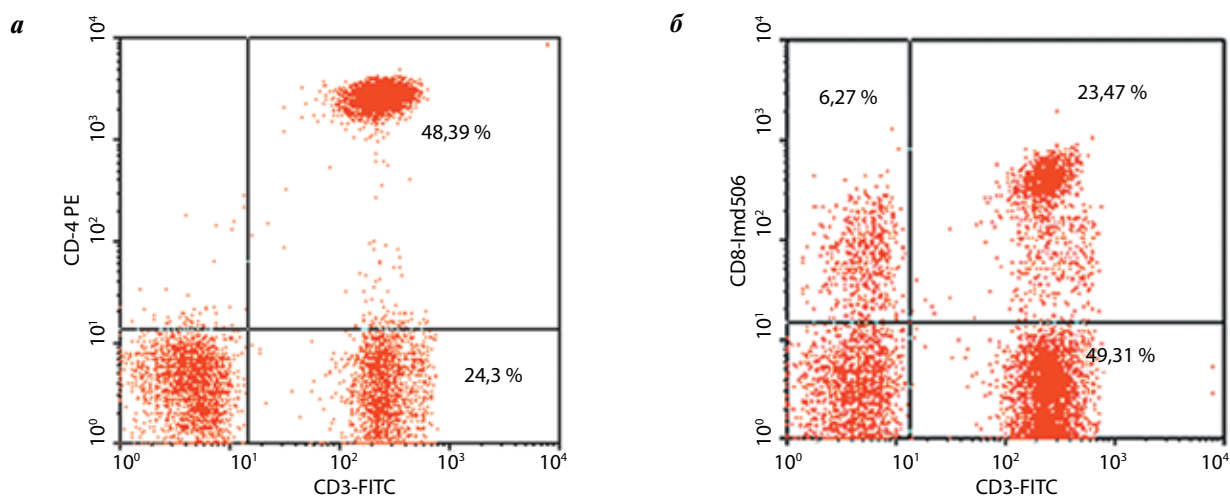


Рис. 4. Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ CD3-FITC (FL1) + CD4-PE (FL2) + CD8-Imd506 (FL4): а — двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD4-PE (FL2); б — двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD8-Imd506 (FL4)

и многоцветного (черный контур) анализа с использованием ИФЗ CD4-Imd306 (рис. 3а) или ИФЗ CD4-PE (рис. 3б). В обоих случаях гистограммы также практически идентичны, что свидетельствует об одинаковой работоспособности ИФЗ в испытанных концентрациях как по отдельности друг от друга (монохромная реакция), так и в составе смеси.

Результаты, представленные на рис. 1 и 3, показывают, что для ИФЗ, в котором в качестве метки использован флуорофор PE, характерна значительно более высокая интенсивность флуоресцентного сигнала по каналу FL2, чем для ИФЗ с меткой Ind306, что выражается в максимальном разделении антиген-негативного («левый») и антиген-позитивного («правый») пиков гистограммы. В связи с этим выбор

CD4-PE для использования в многокомпонентных смесях ИФЗ для выполнения трехцветного анализа субпопуляций Т-лимфоцитов очевиден.

На рис. 4 представлены двумерные дот-плот диаграммы распределения лимфоцитов крови донора при их трехцветном анализе с использованием зондов CD3-FITC (FL1) + CD4-PE (FL2) + CD8-Imd506 (FL4). На рис. 4а четко выделяются субпопуляции Т-клеток с даблпозитивным фенотипом CD3⁺CD4⁺ (48,4 % — верхний правый квадрант) и прочих Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁻ (24,3 % — нижний правый квадрант); суммарное содержание Т-лимфоцитов в популяции, таким образом, составляет 72,7 %. На диаграмме рис. 4б субпопуляция цитотоксических даблпозитивных Т-лимфоцитов CD3⁺CD8⁺ составляет 23,5 %

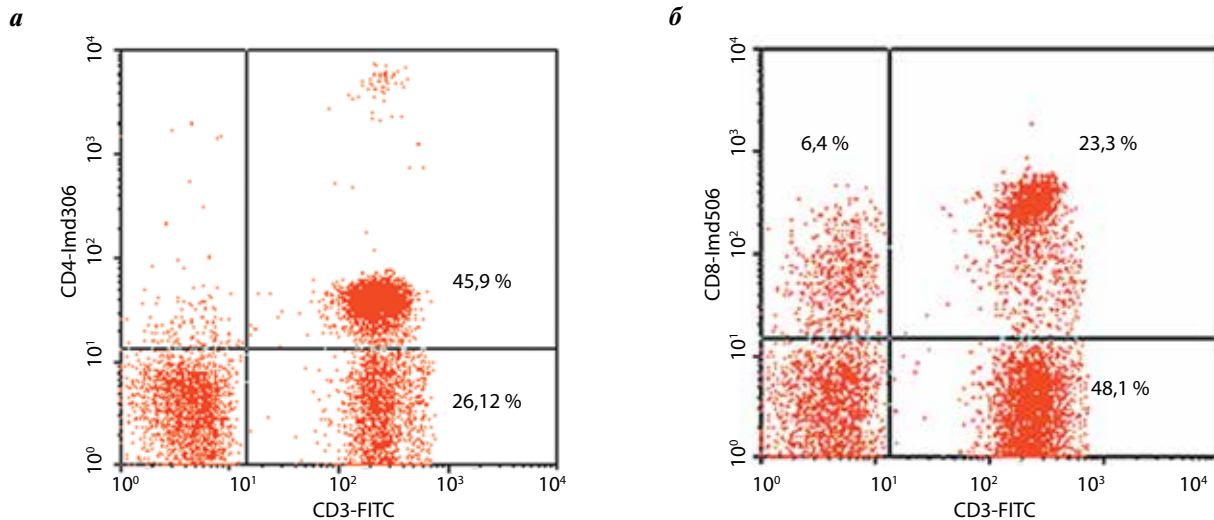


Рис. 5. Трехцветный анализ субпопуляций лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ CD3-FITC (FL1) + CD4-Imd306 (FL2) + CD8-Imd506 (FL4): а – двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD4-Imd306 (FL2); б – двумерная дот-плот диаграмма CD3-FITC (FL1) vs CD8-Imd506 (FL4)

(верхний правый квадрант), в то время как популяция прочих Т-лимфоцитов насчитывает 49,3 % клеток в выбранном гейте (правый нижний квадрант), что в сумме также приводит к результату 72,8 % Т-лимфоцитов в составе всей клеточной популяции. Одновременно обнаруживается минорная субпопуляция лимфоцитов CD3⁺CD8⁺, которая составляет около 6,3 % от всех клеток выбранного гейта (верхний левый квадрант рис. 4б).

Практически идентичные результаты получены при анализе того же образца крови с применением комбинации ИФЗ CD3-FITC (FL1)/CD4-Imd306 (FL2)/CD8-Imd506 (FL4) (рис. 5).

Контрольные значения, полученные при анализе того же образца крови донора с применением коммерческих препаратов сравнения, составили: CD3⁺CD4⁺ – 47,7 %; CD3⁺CD8⁺ – 24,6 %, CD3⁺CD8⁺ – 5,9 %, что соответствует результату анализа, выполненного с использованием отечественной панели ИФЗ.

Таким образом, обе испытанные комбинации ИФЗ – CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 и CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 могут использоваться для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов человека методом проточной цитометрии. Из 2 наборов предпочтительным выбором является комбинация зондов, содержащая CD4-PE.

Далее проводили сравнительный анализ специфической активности флуоресцентных зондов на основе МКА серии ИКО и референтных реагентов CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE (BD Biosciences, США). В качестве исследуемого материала использовали периферическую кровь здоровых людей в возрасте от 25 до 59 лет (18 женщин, 21 мужчины) (см. табл. 2).

Испытание полученных наборов ИФЗ на основе МКА серии ИКО в анализе лимфоцитов здоровых доноров показало их высокую специфичность и эффективность, не уступающую зарубежным аналогам, конкретно – конъюгатам производства BD Biosciences, США.

Клиническая апробация наборов

Клиническая апробация полученных наборов проводилась в 2 группах больных онкологическими заболеваниями: 1-я группа включала 64 больных раком слизистой оболочки полости рта до и после хирургического лечения, 2-я – 35 больных раком яичников до и после хирургического лечения.

1-я группа. В работе использованы материалы клинических наблюдений 64 первичных больных раком слизистой оболочки полости рта, находившихся на обследовании и лечении в отделении опухолей головы и шеи ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с 2009 по 2012 г. Диагноз плоскоклеточного рака был установлен первично, без проведения в предоперационном периоде химиолучевой терапии, и подтвержден гистологически. В исследование включены больные с II–IV стадией заболевания, примерно в равном соотношении по полу, в возрасте от 20 до 88 лет. Наибольшая частота этого заболевания наблюдалась у пациентов в возрастном диапазоне от 50 до 59 лет. Всем больным на 1-м этапе было проведено хирургическое лечение. В табл. 3 представлены результаты иммунологического обследования до и после хирургического лечения (через 10–14 дней после операции) по сравнению с группой здоровых лиц. Показано, что еще до начала лечения у больных раком слизистой оболочки полости рта в структуре Т-клеток статистически

Таблица 3. Определение субпопуляций лимфоцитов периферической крови онкологических больных до и после хирургического лечения (процент антигенположительных клеток) $M \pm t$

Маркер до лечения/ после лечения	Рак слизистой оболочки полости рта, <i>n</i> = 64	Рак яичников, <i>n</i> = 35		
	Использованные для анализа реагенты			
	CD3-FITC/CD4-PE или CD8-PE (референтные реагенты BD)	CD3-FITC/CD4-PE/ CD8-Imd506 (испытуемая смесь)**	CD3-FITC/CD4-PE или CD8-PE (референтные реагенты BD)	CD3-FITC/CD4-PE/ CD8-Imd506 (испытуемая смесь)**
CD3 ⁺	67,8 ± 1,7*	67,5 ± 1,5*	62,5 ± 16,5*	60,7 ± 13,2*
	65,0 ± 1,5*	66,2 ± 1,3*	61,8 ± 14,4*	62,1 ± 12,8*
CD3 ⁺ / CD4 ⁺	38,0 ± 1,0*	38,1 ± 0,9*	32,0 ± 2,4*	31,7 ± 1,1*
	35,4 ± 1,3*	35,7 ± 1,3*	34,5 ± 2,8*	32,7 ± 2,3*
CD3 ⁺ / CD8 ⁺	26,4 ± 1,0	26 ± 1,2	23,7 ± 2,2*	22,9 ± 0,8*
	25,2 ± 1,0	25,5 ± 0,7	21,5 ± 1,7*	20,9 ± 0,8*
CD3 ⁻ /CD8 ⁺	13,0 ± 1,0*	12,9 ± 0,9*	11,9±1,3*	10,9 ± 1,1*
	13 ± 0,9*	12,5 ± 1,3*	11,6 ± 1,2*	11,9 ± 0,5*
CD8 ⁺	39,4 ± 1,1*	38,7 ± 1,0*	35,6 ± 1,7	36,1 ± 0,5
	38,3 ± 1,0*	38,2 ± 1,2*	33,1 ± 1,7	33,1 ± 0,7

*Статистически значимые различия по сравнению с показателями доноров ($p < 0,05$).

**Статистически значимая корреляционная связь между полученными флуоресцентными зондами и эталонными реагентами ($p < 0,05$).

достоверно снижено содержание CD3⁺CD4⁺, а общий уровень CD8⁺ лимфоцитов достоверно превышает показатели донорской группы. Не выявлено влияния проведенного хирургического лечения на показатели субпопуляционной структуры лимфоидных клеток.

Группа 2. В исследование включены 35 первичных больных раком яичников, госпитализированных в гинекологическое отделение НИИ клинической онкологии ФБГУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для выполнения планового хирургического лечения. Средний возраст по группе составил 53,9 года. В зависимости от гистологической структуры опухоли больные распределились следующим образом: серозный рак – 62,1 %, муцинозный рак – 13,8 %, эндометриоидный рак – 20,7 %, светлоклеточный рак – 3,4 %.

Иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови проводили до хирургического лечения и через 2 нед после него. Анализ линейных маркеров, характеризующих основную структуру лимфоидных клеток у первичных больных раком яичников, позволил выявить статистически значимое снижение по сравнению с показателями у доноров общего количества CD3⁺ Т-лимфоцитов. Проведенное хирургическое лечение также не влияло на динамику распределения этих показателей, что,

возможно, связано с коротким послеоперационным периодом наблюдения. В то же время разброс минимальных и максимальных значений ($M \pm \delta$) в Т-клеточном (до лечения 62,5 ± 16,5 %, после лечения – 61,8 ± 14,4 %) звене иммунитета свидетельствует о неоднородности анализируемых больных по уровню основных популяций иммунокомпетентных клеток [6].

Заключение

Комбинации флуоресцентных зондов CD3-FITC/CD4-Imd306/CD8-Imd506 и CD3-FITC/CD4-PE/CD8-Imd506 могут использоваться для трехцветного анализа субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии как практически здоровых доноров, так и онкологических больных.

Сравнительные исследования специфической активности комбинаций ИФЗ на основе МКА серии ИКО и референтных коммерческих тест-систем (BD Biosciences) на лимфоцитах здоровых доноров и онкологических больных (рак яичников, рак слизистой оболочки полости рта) показали сопоставимые результаты.

Применение полученных зондов позволило выявить нарушения субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови у больных раком яичников и раком слизистой оболочки полости рта, в частности CD3⁻/CD8⁺, CD3⁺/CD4⁺, CD3⁺.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

1. Галактионов В.Г. Иммунология: учебник. М.: Издательство МГУ, 1998:480 с. [Galaktionov V.G. Immunology: a textbook. Moscow: Publishing house of Moscow state University, 1998. 480 p. (In Russ.)].
2. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы: дис. ... д-ра мед. наук: 14.01.12. М., 2003:311 с. [Artamonova E.V. The role of immunophenotyping of tumor cells in the diagnosis and prognosis of breast cancer: dis. ... doctor of medicine: 14.01.12. Moscow, 2003. 311 p. (In Russ.)].
3. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Кадагидзе З.Г. Изучение субпопуляции CD16+ лимфоцитов у онкологических больных на фоне вакцинотерапии. Медицинская иммунология 2006;8(2–3):334. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Kadagidze Z.G. the Study of subpopulations of CD16+ lymphocytes in oncological patients on the background of vaccine therapy. Medical immunology 2006;8(2–3):334 (In Russ.)].
4. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Демидов Л.В. Иммунофенотип лимфоцитов больных меланомой на фоне вакцинотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2005;4(1):8. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Demidov L.V. Immunophenotype of lymphocytes of patients with melanoma against the background of vaccine therapy. The Russian biotherapeutic journal 2005;4(1):8 (In Russ.)].
5. Заботина Т.Н., Очеева Н.Ю., Короткова О.В. и др. Оценка функциональной активности клеток гранулоцитарно-макрофагального звена иммунитета больных раком слизистой оболочки полости рта. Мат-лы VI съезда онкологов и радиологов стран СНГ: тез. докл. Душанбе, 2010. С. 67–8. [Zabolina T.N., Ocheeva N.Yu., Korotkova O.V. et al. Evaluation of the functional activity of cells of the granulocyte-macrophage link of immunity in patients with cancer of the mucous membrane of the oral cavity. Materials of the VI Congress of oncologists and radiologists of CIS countries: thes. of rep. Dushanbe, 2010. P. 67–8 (In Russ.)].
6. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А. и др. Субпопуляционная структура лимфоцитов у больных раком яичников. Вестн. РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2010;21(1):46–51. [Zabolina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A. et al. Subpopulation structure of lymphocytes in patients with ovarian cancer. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 2010;21(1):46–51 (In Russ.)].
7. Кадагидзе З.Г., Славина Е.Г., Заботина Т.Н. и др. Иммунологический профиль лимфоцитов крови у онкологических больных. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):38. [Kadagidze Z.G., Slavina E.G., Zabolina T.N. et al. Immunological profile of blood lymphocytes in cancer patients. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(2):38 (In Russ.)].
8. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественной меланомой и раком молочной железы. Иммунология 2014;35(2):64–7. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabolina T.N. et al. Basic subpopulations of regulatory lymphocytes in patients with malignant melanoma and breast cancer. Immunologiya = Immunology 2014;35(2):64–7 (In Russ.)].
9. Коровушкина К.А., Бабаев А.А., Котельникова Т.В. и др. Оценка состояния иммунитета при опухолях тела матки. Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского 2010;2–2:653–8. [Korovushkina K.A., Babaev A.A., Kotel'nikova T.V. et al. Assessment of immunity in tumors of the uterine body. Vestnik Nizhegorodskogo Universiteta im. N.I. Lobachevskogo = Bulletin of N.I. Lobachevsky Nizhny Novgorod University. 2010;2–2:653–8 (In Russ.)].
10. Короткова О.В., Заботина Т.Н., Скотаренко Л.В. и др. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ. Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):95. [Korotkova O.V., Zabolina T.N., Skotarenko L.V. et al. Subpopulations of lymphocytes in the peripheral blood of patients with breast cancer. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2011;10(3):95 (In Russ.)].
11. Скотаренко Л.В., Воронников И.К., Кадагидзе З.Г., Шамилов Ф.А. Особенности Т-клеточного иммунитета при раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2011;4:24–7. [Skotarenko L.V., Voronnikov I.K., Kadagidze Z.G., Shamilov F.A. Features of T-cell immunity in breast cancer. Opukholi Zhenskoy Reproktivnoy Sistemy = Tumors of the female reproductive system 2011;4:24–7 (In Russ.)].
12. Дубинкин И.В., Подгорная Т.В., Донсков С.И. Моноклональные реагенты анти-А и анти-В с новыми свойствами. Трансфузиология 2009;10(1–2):28. [Dubinkin I.V., Podgornaya T.V., Donskov S.I. Monoclonal reagents anti-A and anti-B with new properties. Transfuziologiya = Transfusion medicine 2009;10(1–2):28 (In Russ.)].
13. Дубинкин И.В., Горшкова Т.В., Каландаров Р.С., Донсков С.И. Получение и испытание моноклональных анти DVI-антител. Трансфузиология 2009;10(1–2):27–28. [Dubinkin I.V., Gorshkova T.V., Kalandarov R.S., Donskov S.I. Obtaining and testing of monoclonal anti-DVI-antibodies. Transfuziologiya = Transfusion medicine 2009;10(1–2):27–8 (In Russ.)].
14. Филатов А.В., Бачурин П.С., Маркова Н.А., Сурнакова Н.Е. Панель моноклональных антител к антигенам человеческих лимфоцитов. Экспериментальная онкология 1989;11(2):29. [Filatov A.V., Bachurin P.S., Markova N.A., Churakova N.E. A panel of monoclonal antibodies to antigens of human lymphocytes. Eksperimental'naya Onkologiya = Experimental Oncology 1989;11(2):29 (In Russ.)].
15. Барышников А.Ю., Фролова Е.А., Ленева Н.В. и др. Моноклональные антитела ICO-105 к рецептору интерлейкина-2(антиген CD25). Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 1993;4(4):7–12. [Baryshnikov A.Yu., Frolova E.A., Leneva N.V. et al. Monoclonal antibodies ICO-105 to the interleukin-2 receptor (antigen CD25). Vestnik RONC im. N.N. Blokhina = Bulletin of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 1993;4(4):7–12 (In Russ.)].
16. Королева А.М., Барышников А.Ю., Виха Г.В. и др. Характеристика моноклональных антител ICO-116 к антигену CD16 естественных киллеров. Биотехнология 1993;(11–12):61. [Queen A.M., Baryshnikov A.Yu., Vikha G.V. et al. Characteristics of monoclonal antibodies ICO-116 to the CD16 antigen on natural killer cells. Biotechnologiya = Biotechnology 1993;(11–12):61 (In Russ.)].

17. Барышников А.Ю., Блохина Н.Г., Кадагидзе З.Г. Моноклональные антитела ИКО-1 против константной части IA-подобных антигенов. Экспериментальная онкология 1984;6:123. [Baryshnikov A.Yu., Blokhina N.G., Kadagidze Z.G. ICO-1 Monoclonal antibodies against the constant part of IA-like antigens. Eksperimental'naya Onkologiya = Experimental Oncology 1984;6:123 (In Russ.)].
18. Захарова Е.Н., Заботина Т.Н., Чудинов А.В. и др. Двухцветный анализ клеточных популяций методом проточной цитометрии с использованием цианинового красителя IMD-306. Мат-лы Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты»: тез. докл. М., 2007. С. 66. [Zakharova E.N., Zabolina T.N., Chudinov A.V. et al. Two-color analysis of cell populations by flow cytometry method using cyanide dye IMD-306. Materials of the all-Russian scientific-practical conference "Domestic anticancer drugs": theses. of rep. Moscow, 2007. P. 66 (In Russ.)].
19. Захарова Е.Н., Иванов П.К., Заботина Т.Н. и др. Иммунофлуоресцентные зонды на основе моноклональных антител ИКО-31 и цианинового красителя IMD-506 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(4):27–32. [Zakharova E.N., Ivanov P.K., Zabolina T.N. et al. Immunofluorescent probes based on ICO-31 monoclonal antibodies and IMD-506 cyanide dye for the analysis of cellular populations by flow cytometry. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013; 12(4):27–32 (In Russ.)].
20. Захарова Е.Н., Иванов П.К., Заботина Т.Н. и др. Двухцветный анализ клеточных популяций методом проточной цитометрии с использованием МКА серии ИКО, конъюгированных с цианиновым красителем IMD-306. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):17–21. [Zakharova E.N., Ivanov P.K., Zabolina T.N. et al. Two-color analysis of cell populations by flow cytometry method using ICO series MCA conjugated with cyanine dye IMD-306. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(1):17–21 (In Russ.)].
21. Копырулина М.Е., Захарова Е.Н., Заботина Т.Н. и др. Технология создания и свойства иммунофлуоресцентных зондов с меткой Alexa-488 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):70–5. DOI: 10.17650/1726978420181717075. [Kaparulina M.E., Zakharova E.N., Zabolina T.N. et al. Technology development and properties of immunofluorescence probes labeled Alexa-488 for the analysis of cell populations by flow cytometry. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):70–5 (In Russ.)].
22. Stewart C.C., Stewart S.J. Four colour compensation. Cytometry 1999;38(4):161–75. PMID: 10440854.

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРАНОЗЫ В ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЕ

З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработан и изучен препарат из класса нитрозоалкилмочевины — араноза, который в настоящее время выпускается научно-производственным филиалом «Наукпрофи». Один из этапов стандартизации лекарственного средства — разработка методик количественного определения активного вещества в готовом лекарственном препарате.

Цель исследования — разработка и валидация методики количественного определения содержания аранозы в лекарственном препарате.

Материалы и методы. В данной работе использованы: «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г»; араноза, субстанция-порошок (филиал «Наукпрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский, сорбиновая кислота. Метод исследования — спектрофотометрия.

Результаты. Разработана методика спектрофотометрического количественного определения аранозы в лекарственном препарате «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г». Для подтверждения достоверности и точности полученных результатов проведена процедура валидации. Методика оценена по валидационным характеристикам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность.

Выводы. Разработанная методика обеспечена правильностью, сходимостью, прецизионностью, линейностью и может применяться в диапазоне 80–120 % от номинального значения содержания аранозы в препарате.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, араноза, количественное определение, спектрофотометрия, валидация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ARANOSA ASSAY IN THE DOSAGE FORM

Z.S. Shprakh, E.V. Ignateva, I.V. Yartseva

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Background. Aranosa, a drug of nitrosoalkylureas class, was developed and studied at N.N. Blokhin NMRCO, Russia, and at present it is produced by N.N. Blokhin NMRCO branch “Naukoprofi”. One of the stages of the drug standardization is the development of an assay technique for quantitative determination of active substance in the final drug dosage form.

Objective. Development and validation of an assay for quantitative determination of Aranosa in the dosage form.

Materials and methods. The study used “Aranosa, lyophilisate for solution for injection 0.5 g”; Aranosa, substance-powder (N.N. Blokhin NMRCO branch “Naukoprofi”); polyvinylpyrrolidone low-molecular medical; sorbic acid. Method: spectrophotometry.

Results. An assay was developed for quantitative spectrophotometric determination of Aranosa in the dosage form “Aranosa, lyophilisate for solution for injection 0.5 g”. Validation was performed to prove reliability and accuracy of the obtained results. The assay was evaluated by validation characteristics, such as specificity, linearity, trueness, precision.

Conclusions. The developed assay is provided with trueness, repeatability, precision, and linearity and can be used in the range of 80–120 % of nominal Aranosa content in the dosage form.

Key words: antitumor drugs, aranosa, quantitative determination, spectrophotometry, validation

Введение

Араноза — 3-(а-L-арабинопиранозил)-1-метил-1-нитрозомочевина — отечественный противоопухолевый препарат, разработанный и изученный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина»

Минздрава России. Араноза широко применяется в качестве противоопухолевого средства при меланоме кожи как в монотерапии, так и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами [1–3].

Основной показатель, подтверждающий возможность безопасного и эффективного использования лекарственного препарата (ЛП) в клинической практике, — его качество, т. е. соответствие требованиям фармакопейной статьи или иного нормативного документа [4]. В соответствии с руководством Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации ЛП для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) термин «качество» включает такие критерии, как подлинность, количественное определение и примеси [5]. Критерий «количественное определение» — один из наиболее важных для оценки качества как активной фармацевтической субстанции, так и готового ЛП при серийном производстве и обращении на фармацевтическом рынке. Соответствие данному критерию обеспечивает правильную дозировку активного вещества в ЛП и, следовательно, ожидаемый терапевтический эффект. Для количественного определения используют аналитические методики, основанные на физико-химических и биологических свойствах лекарственного средства (ЛС).

Для контроля качества субстанции желательно использовать прямые методы определения содержания активного вещества. Так, для прямого определения аранозы в субстанции в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России была разработана и валидирована методика, основанная на измерении объема азота, образующегося при обработке аранозы избытком разбавленной щелочи при комнатной температуре [6]. В то же время при определении содержания активного вещества в лекарственной форме (ЛФ) часто используют относительные методы анализа, поскольку в качестве стандартного образца можно использовать субстанцию, из которой приготовлена ЛФ. Для определения содержания аранозы в ЛФ была применена спектрофотометрия (СФМ) в УФ-области спектра, которая является простым и надежным методом контроля количественного содержания активного вещества и отличается высокой достоверностью, воспроизводимостью, точностью и простотой исполнения.

Экспериментальным доказательством того, что аналитическая методика пригодна для решения предполагаемых задач, служит ее валидация, которая проводится при внедрении новой методики при разработке ЛС, а также при изменении состава готового ЛС и условий его анализа [7–9].

Данная работа посвящена разработке и валидации методики количественного определения содержания действующего вещества в препарате «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г» методом прямой СФМ. Валидацию разработанной методики проводили по следующим кри-

териям: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 [7].

Материалы и методы

Препараты и реактивы

«Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г»; араноза, субстанция-порошок (филиал «Наукопрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); вспомогательные вещества — поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский м. м. 12600 (ПВП), сорбиновая кислота.

Приборы и аппаратура. Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США); весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия).

Методика количественного определения аранозы в лекарственной форме. Для приготовления испытуемого раствора содержащее 1 флакона растворяли в небольшом количестве воды, переносили в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили водой до метки. Затем 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки водой.

В качестве раствора стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции аранозы и вспомогательных веществ в воде, а в качестве раствора сравнения — раствор вспомогательных веществ в воде в соответствующих концентрациях.

Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили параллельно с измерением оптической плотности раствора СО относительно раствора сравнения в максимуме при длине волны (240 ± 2) нм.

Содержание аранозы в одном флаконе в граммах (X) вычисляли по формуле

$$X = \frac{A \times a \times C}{A_0 \times 100},$$

где A — оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 — оптическая плотность раствора СО аранозы; a — навеска СО аранозы, г; C — содержание аранозы в субстанции, %.

Результаты

Для количественного анализа лиофилизата аранозы применен метод СФМ [5]. В электронном спектре поглощения водных растворов субстанции аранозы в области от 200 до 300 нм наблюдается максимум при длине волны (240 ± 2) нм (рис. 1). Растворы вспомогательных веществ, входящие в состав ЛФ, имеют максимумы поглощения: ПВП — при 195 нм, сорбиновой кислоты — при 256 нм, т. е. максимум (240 ± 2) нм может быть использован в качестве аналитического.

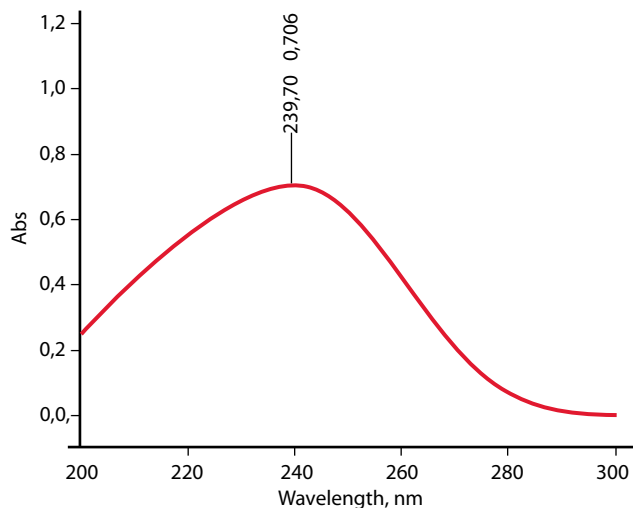


Рис. 1. УФ-спектр поглощения 0,002 % водного раствора субстанции аранозы

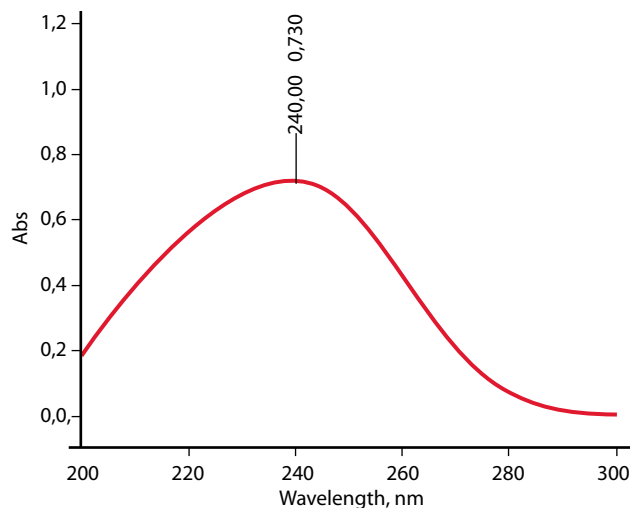


Рис. 2. УФ-спектр поглощения водного раствора лекарственной формы аранозы ($C = 0,02$ мг/мл)

Для оценки возможности применения метода СФМ исследована зависимость интенсивности поглощения аранозы в растворах от её концентрации. Установлено, что в диапазоне концентраций растворов от 0,01 до 0,04 мг/мл зависимость имеет линейный характер, т. е. соблюдается закон Бугера—Ламберта—Бера.

При изучении спектральных характеристик растворов ЛП и вспомогательных веществ, входящих в его состав, показано, что вспомогательные вещества не влияют на положение максимума поглощения действующего вещества (см. рис. 1, рис. 2). Рабочей концентрацией растворов аранозы выбрана концентрация 0,02 мг/мл, при которой оптическая плотность раствора составляет около 0,7 единиц оптической плотности. При этом концентрация сорбиновой кислоты в растворе ЛФ составляет 0,00016 мг/мл и ее поглощение не мешает определению основного действующего вещества. В то же время ПВП в рабочем растворе находится в концентрации 0,02 мг/мл и имеет небольшое собственное поглощение. В связи с этим в качестве раствора сравнения использовали раствор вспомогательных веществ в соотношениях, эквивалентных составу ЛФ.

Для снижения систематических и случайных ошибок в методику анализа введен способ расчета по СО — субстанции аранозы.

Валидация методики количественного определения

Валидацию разработанной методики количественного определения аранозы в препарате «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г» проводили на образцах препарата и модельных смесях, полученных в лабораторных условиях, в соответствии с установленными требованиями

ОФС.1.10012.15 и ОФС.1.1.0013.15 [7]. Исследовали следующие валидационные характеристики: специфичность, линейность, правильность, прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) [10].

Главное условие *специфичности* методики — способность однозначно определять анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут содержаться в образце, например вспомогательных веществ.

Ранее было показано, что присутствие в лиофилизате аранозы вспомогательных веществ не влияет на положение максимумов поглощения в электронных спектрах поглощения (см. рис. 1, 2). Небольшое собственное поглощение ПВП — около 0,06 единиц оптической плотности — компенсируется использованием в качестве раствора сравнения раствора вспомогательных веществ, т. е. разработанная методика специфична в отношении аранозы.

Валидационный параметр «линейность» проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (оптической плотности) для пяти проб с различным содержанием аранозы в пределах аналитической области методики — от 80 до 120 % от номинального содержания аранозы во флаконе. Регрессионный анализ полученных данных проводили методом наименьших квадратов с использованием линейной модели $y = bx + a$ (x — количество определяемого вещества, y — величина отклика, b — угловой коэффициент, a — свободный член) и рассчитывали коэффициент корреляции r по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x .

Полученные данные (табл. 1) показывают, что коэффициент корреляции r , равный 0,9980, отвечает необходимому условию $|r| \geq 0,99$, а результаты

количественного определения аранозы в препарате по разработанной методике хорошо описываются уравнением линейной зависимости $y = 1,3357x + 0,0195$. Подтверждением линейной зависимости исследуемых величин является также графическое изображение регрессионной прямой (рис. 3).

Таблица 1. Результаты определения параметров линейной зависимости количественного определения аранозы в модельной смеси

Процент от номинального содержания, %	Содержание аранозы в пробе, г	Оптическая плотность	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$
80	0,405	0,566	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 1,3357$; свободный член линейной зависимости $a = 0,0195$; коэффициент корреляции $r = 0,9980$; $y = 1,3357x + 0,0195$
90	0,453	0,624	
100	0,496	0,675	
110	0,547	0,745	
120	0,596	0,823	

Правильность аналитического метода характеризуется близость результатов испытаний, полученных данным методом, к истинному значению. Правильность валидируемой методики подтверждали анализом серии модельных смесей, включающих все компоненты ЛФ и известное количество определяемого вещества в пределах аналитической области — от 80 до 120 % от номинального содержания аранозы во флаконе. На каждом уровне проводили 3 определения. Как известно, приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. Результаты анализа оценивали путем сравнения полученных результа-

тов с ожидаемым значением величины (содержание аранозы в модельной смеси, г). Полученные данные приведены в табл. 2, 3.

Таблица 2. Результаты определения правильности методики количественного спектрофотометрического определения аранозы в препарате

Содержание аранозы в анализируемой пробе, г	Найдено	
	г	%
0,405	0,398	98,27
0,408	0,403	98,77
0,402	0,399	99,25
0,496	0,500	100,80
0,507	0,515	101,58
0,499	0,498	99,80
0,596	0,588	98,66
0,589	0,597	101,36
0,578	0,567	98,09

Как видно из данных, приведенных в табл. 3, относительная ошибка среднего результата ($\bar{\varepsilon} = 1,03$ %) не превышает 2 %; результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm x$), который составил $99,62 \pm 1,02$, и приближаются к истинному значению, а численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициент Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа обеих выборок, меньше табличного. Эти данные позволяют считать, что результаты, полученные данным методом, правильные и не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно значения среднего результата. Прецизионность методики спектрофотометрического анализа аранозы определяли, оценивая повторяемость (сходимость) результатов и внутрилабораторную прецизионность.

Сходимость методики оценивали по результатам анализов образцов в 2 сериях, различающихся по времени выпуска и серии субстанции, из которой была наработана ЛФ аранозы. Анализ проводили в одинаковых условиях с использованием одного и того же спектрофотометра, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени. Для взятых для анализа серий ЛФ выполнено по 7 параллельных определений и проведена статистическая обработка полученных результатов. Результаты представлены в табл. 4, 5.

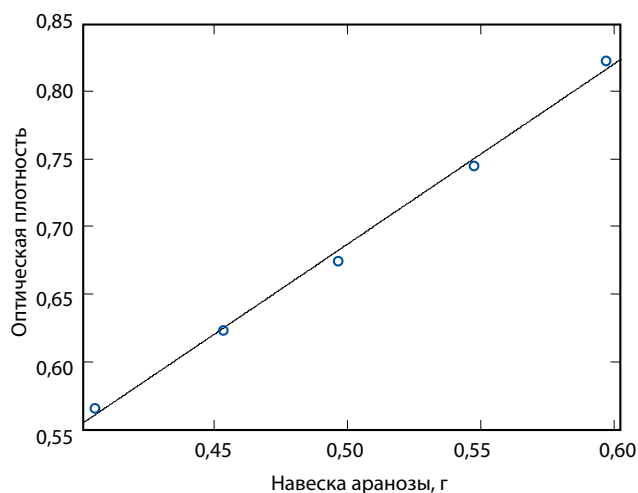


Рис. 3. Графическое изображение регрессионной прямой

Таблица 3. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении правильности методики

m	f	$\bar{x}$ %	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P , %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	$\bar{\varepsilon}$, %
9	8	99,62	1,7798	1,3341	0,4447	95	2,306	0,855	1,02	1,03

Таблица 4. Результаты определения сходимости аналитической методики количественного определения аранозы в препарате

Найдено аранозы во флаконе, г	
серия 1	серия 2
0,507	0,500
0,512	0,496
0,517	0,507
0,512	0,496
0,514	0,495
0,507	0,497
0,510	0,493

Среднее значение содержания аранозы ($\bar{x}$, г) в представленных сериях ЛФ равно 0,511 и 0,498 г, соответственно, и находится в пределах установленной нормы (0,450–0,550 г). Относительная ошибка среднего результата составила 0,66 и 0,86 %. При

доверительной вероятности $P = 95$ % для проанализированных образцов аранозы доверительный интервал результата отдельного определения ($\bar{x} \pm \Delta x$) составил $(0,511 \pm 0,003)$ г и $(0,498 \pm 0,004)$ г. Численное значение коэффициента Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа 2 выборок, меньше табличного значения (см. табл. 3). Таким образом, результаты, полученные данным методом, являются сходимыми и не отягощены систематической ошибкой.

При исследовании *внутрилабораторной* (промежуточной) *прецизионности* анализ производился двумя сотрудниками в разные дни. Было проанализировано по 6 образцов одной серии ЛФ аранозы. Результаты приведены в табл. 6, 7. При сравнении результатов, полученных 2 сотрудниками, видно, что различия между средними значениями результатов 1-го и 2-го сотрудников незначительны. Относительная ошибка среднего результата для 2 исследователей составила 0,79 и 0,80 % соответственно. Численное значение коэффициента Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа 2 выборок, меньше табличного значения. Следовательно, методика анализа воспроизводима.

Таблица 5. Метрологические характеристики среднего результата анализа

Серия	m	f	$\bar{x}$, г	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P , %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	$\bar{\varepsilon}$, %
1	7	6	0,511	0,0000132	0,00364	0,00138	95	2,447	1,974	0,003	0,66
2	7	6	0,498	0,0000212	0,00461	0,00174	95	2,447	1,312	0,004	0,86

Таблица 6. Результаты исследования промежуточной прецизионности методики количественного определения аранозы в лекарственной форме

Серия ЛФ	Найдено аранозы во флаконе, г	
	исследователь 1	исследователь 2
Серия 3	0,500	0,505
	0,506	0,503
	0,502	0,497
	0,498	0,501
	0,495	0,495
	0,502	0,498

Таблица 7. Метрологические характеристики среднего результата анализа при определении промежуточной прецизионности

Серия 3	<i>m</i>	<i>f</i>	$\bar{x}$, г	S^2	S	$S_{\bar{x}}$	P , %	$t(p, f)$ табл.	$t(p, f)$ выч.	Δx	$\bar{\varepsilon}$, %
Исполнитель 1	6	5	0,501	0,0000143	0,00378	0,00154	95	2,571	0,324	0,004	0,79
Исполнитель 2	6	5	0,500	0,0000146	0,00382	0,00156	95	2,571	0,107	0,004	0,80

Заключение

Разработана и валидирована методика спектрофотометрического количественного определения основного действующего вещества в ЛФ «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,5 г».

По результатам эксперимента установлено, что данная методика обеспечена приемлемой правильностью, сходимостью, прецизионностью, линейностью, как при нормальных рабочих концентрациях, так и в экстремальных точках диапазона концентраций.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Современный взгляд на лекарственное лечение диссеминированной меланомы кожи. Практическая онкология 2012;2(13):143–9. [Harkevich G.Yu., Demidov L.V. Modern view on the medicinal treatment of disseminated skin melanoma. Prakticheskaya Onkologiya = Practical oncology 2012;2(13):143–9 (In Russ.).]
- Харкевич Г.Ю., Орлова К.В., Тимофеев И.В., Демидов Л.В. Отечественный противоопухолевый препарат араноза в лечении пациентов с метастатической меланомой кожи – результаты проспективного рандомизированного исследования. Фарматека 2017;8:66–70. [Harkevich G.Yu., Orlova K.V., Timofeev I.V., Demidov L.V. National antitumor drug Aranosa in the treatment of patients with metastatic skin melanoma – the results of a prospective randomized study. Pharmateka = Pharmatec 2017;8:66–70 (In Russ.).]
- Шпрах З.С., Барышников А.Ю. Отечественные противоопухолевые препараты. В кн.: Рациональная фармакотерапия в онкологии. Под ред. М.И. Давыдова и В.А. Горбуновой. М.: ЛитТерра, 2012;95–101. [Shprakh Z.S., Baryshnikov A.Yu. National antitumor drugs. In: Rational pharmacotherapy in oncology. Eds. M.I. Davydov and V.A. Gorbunova. M.: LitTerra, 2012;95–101 (In Russ.).]
- Об обращении лекарственных средств с поправками и изменениями: Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ. [On circulation of medicinal products with amendments and changes: Federal Law of the Russian Federation of 12 April 2010 No. 61-FZ (In Russ.).] [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/101658>.
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances (Q6A). [Electronic resource]. Access mode: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>.
- Ярцева И.В., Игнатьева Е.В., Гатинская Л.Г. и др. Валидация метода количественного определения аранозы в субстанции. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». М., 2008. С. 56. [Yartceva I.V., Ignateva E.V., Gatinskaja L.G. et al. Validation of the method for quantitative determination of Aranose in a substance. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation “Domestic Antitumor Preparations”, Moscow, 2008. P. 56 (In Russ.).]
- Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII изд., Т. 1. М., 2015. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edn. Vol. 1. Moscow, 2015. (In Russ.).]
- ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2 (R1) [Electronic resource]. Electronical data. Geneva corp. 2005. – Access mode: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guide-lines.html>.
- Эрмер Й., Миллер Дж.Х. МакБ. Валидация методик в фармацевтическом анализе: примеры наилучшей практики. М.: ВИАЛЕК, 2013. 495 с. [Ermer J., Miller J.H. McB. Validation of methods in pharmaceutical analysis: examples of best practices. Moscow: VIALEK, 2013. 495 p. (In Russ.).]
- Шпрах З.С., Игнатьева Е.В., Ярцева И.В. Валидация метода количественного определения аранозы в лекарственной форме. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты». М., 2018. С. 85. [Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartceva I.V. Validation of the method of quantitative determination of Aranose in a dosage form. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation “National Antitumor Drugs”. Moscow, 2018. P. 85 (In Russ.).]

ПРЕДКЛИНИЧЕСКОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНАЛОГА ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ГОРМОНА ЦИФЕТРИЛИНА

О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, И.Б. Меркулова,
Т.В. Абрамова, В.М. Бухман, З.С. Шпрах

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Ивановна Коняева natkulba@mail.ru

Введение. Работа посвящена доклиническому токсикологическому исследованию на лабораторных животных цифетрилина (ЦФ) — лекарственного средства, аналога гипоталамического гормона соматостатина, отобранного по результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности.

Цель исследования — доклинические токсикологические исследования ЦФ — лекарственного средства, аналога гипоталамического гормона для лечения злокачественных гормонозависимых заболеваний.

Материалы и методы. Исследования проводились на 80 здоровых мышах гибридах (CBA × C57Bl/6J) F₁ — самцах и самках, 100 здоровых неинбредных беспородных крысах — самцах и самках, и 5 собаках породы английский бигль — самцах и самках. Доклинические токсикологические исследования проведены с использованием гранулята ЦФ, который содержал 57,3 мг ЦФ в 1 г гранулята. В качестве растворителя использовали 1 % крахмальный клейстер. В опытах по изучению острой токсичности ЦФ вводили перорально однократно: мышам в дозах 100, 200, 300 и 600 мг/кг, крысам в дозах 100, 200, 400 и 500 мг/кг. Срок наблюдения за животными составил 30 сут. В опытах по хронической токсичности препарат вводили перорально ежедневно 15-кратно: крысам — суммарные дозы 30 и 300 мг/кг; собакам — суммарные дозы 124,5 и 622,5 мг/кг. Срок наблюдения в исследованиях на крысах составил 45 сут, в исследованиях на собаках — 60 сут.

Результаты. В результате изучения острой токсичности на мышах и крысах — самках и самцах — при введении ЦФ в максимально возможной концентрации и максимально возможных объемах препарат не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на общее состояние животных, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных. При изучении хронической токсичности ЦФ на крысах и собаках при ежедневном пероральном применении в течение 15 дней во всех исследованных дозах также не наблюдалось гибели животных, препарат не вызывал каких-либо внешних проявлений токсичности. Лимитирующий вид токсичности не установлен, так как препарат вызывает незначительные морфофункциональные изменения различной степени обратимости практически во всех органах и системах организма крыс и собак. На основании полученных на экспериментальных животных данных о функциональных и морфологических изменениях в органах и тканях показано, что самки более чувствительны к препарату, чем самцы.

Заключение. С учетом функциональных и морфологических изменений во внутренних органах как крыс, так и собак изученные дозы ЦФ охарактеризованы как дозы, вызывающие слабые незначительные изменения — низкие токсические дозы. На основании анализа данных определена начальная (стартовая) безопасная доза для человека на I фазу клинических испытаний, которая проводится в настоящее время.

Ключевые слова: цифетрилин, доклиническая токсикология, мыши, крысы, собаки

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-63-70

PRE-CLINICAL TOXICOLOGICAL STUDY OF ANALOGUE OF HYPOTHALAMIC HORMONE TSIFETRILIN

O.I. Konyeva, N.Yu. Kulbachevskaya, N.P. Ermakova, V.A. Chaley, I.B. Merkulova,
T.V. Abramova, V.M. Buchman, Z.S. Shprakh

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. The work is devoted to preclinical toxicological research on laboratory animals tsifetrilin — a drug, an analogue of the hypothalamic hormone somatostatin, selected according to the results of studying hormonal, cytotoxic and antitumor activity.

The purpose was preclinical toxicological studies of the drug's tsifetrilin — an analogue of the hypothalamic hormone for the treatment of malignant hormone — dependent diseases.

Materials and methods. Studies were carried out on 80 healthy mice hybrids (CBA × C57Bl/6J) F₁ males and females, 100 non-inbred healthy mongrel male and female rats and 5 breed dogs English Beagle males and females. Preclinical toxicological studies were carried out using tsifetrilin granulate, which contained 57.3 mg of Citrate in 1 g of granulate. As a solvent, 1 % starch paste was used. In the experiments to study acute toxicity were administered orally once tsifetrilin: mice at doses of 100, 200, 300 and 600 mg/kg, to rats in doses

of 100, 200, 400 and 500 mg/kg. The period of observation of the animals was 30 days. In experiments on chronic toxicity, the drug was administered orally 15 times a day: rats — total doses of 30 and 300 mg/kg; dogs — total doses of 124.5 and 622.5 mg/kg. The observation period in studies in rats was 45 days, in studies on dogs — 60 days.

Results. As a result of the study of acute toxicity in mice and rats in females and males when tsifetrilin was administered at the maximum possible concentration and the maximum possible volumes, the drug did not cause death of animals, did not affect the general condition of the animals, caused no external toxicity, animals. In the study of chronic toxicity of tsifetrilin in rats and dogs with daily oral administration for 15 days, no death was observed in all the doses studied, and the drug did not cause any external toxicity. The limiting type of toxicity is not established, since the drug causes minor morphofunctional changes of varying degrees of reversibility in virtually all organs and systems of the body of rats and dogs. Based on the experimental data on functional and morphological changes in organs and tissues, it was shown that females are more sensitive to the preparation than males.

Conclusion. Taking into account the functional and morphological changes in the internal organs of both rats and dogs, the studied doses of tsifetrilin are characterized as doses that cause slight minor changes—low toxic doses. Based on the analysis of the data, the initial (starting) safe dose for a person in phase I of clinical trials, which is currently being conducted, is determined.

Key words: tsifetrilin, preclinical toxicology, mice, rats, dogs

Введение

Цифетрилин — пентапептид Вос-Cys (Thp) — Phe-D-Trp-Lys (Z) — Th-OMe — аналог гипоталамического гормона соматостатина, отобранный по результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности для доклинических исследований [1].

Одна из основных функций соматостатина в организме — ингибирование секреции гормона роста. Наряду с этим соматостатин обладает широким спектром биологического действия — угнетает выделение пролактина, инсулина, глюкагона, гормонов поджелудочной железы и желудочно-кишечного тракта, стимулирующих пролиферативные процессы в клетке. Показана высокая экспрессия рецепторов соматостатина на клетках злокачественных опухолей: гастриноме, глюкагономе, карциноидных опухолях, мелкоклеточном раке легкого и др. Отличительные особенности соединений этого класса — отсутствие токсичности и высокая избирательность действия. Недостатком является то, что они быстро метаболизируются под действием протеиназ. В настоящее время в клинической практике применяется зарубежный препарат, структурный аналог соматостатина — сандостатин (октреотид). Показаниями для применения сандостатина служат опухоли островкового аппарата поджелудочной железы, рак поджелудочной железы, карциноидные опухоли, медуллярный рак щитовидной железы, аденомы гипофиза [2, 3].

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на протяжении нескольких лет проводились исследования по поиску потенциальных противоопухолевых соединений в ряду аналогов гипоталамических гормонов, в частности аналогов соматостатина. Синтезировано около 40 аналогов соматостатина. По результатам изучения гормональной, цитотоксической и противоопухолевой активности отобрано 1 соединение — пентапептид, получивший

название «цифетрилин» (ЦФ), для доклинического изучения [4].

При изучении противоопухолевой активности установлено, что ЦФ обладает высокой активностью на перевиваемых опухолях (90 % максимальный эффект), ингибирует рост аденокарциномы простаты крыс R-3327-Н (максимальный эффект = 46–65 %), ДМБА-индуцированную опухоль молочной железы крыс (максимальный эффект = 79–90 %), рост перевиваемого рака молочной железы человека РМ-1 у бестимусных мышей на 47–63 % [5].

Полученные результаты противоопухолевой активности позволили рекомендовать ЦФ для доклинического токсикологического изучения, которое было проведено в лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, и частично представлены в виде тезисов на конференциях [6–8].

Цель настоящего исследования — доклинические токсикологические исследования ЦФ лекарственного средства — аналога гипоталамического гормона для лечения злокачественных гормонозависимых заболеваний.

Задачи исследования:

- 1) изучение острой токсичности ЦФ при его однократном пероральном введении мышам и крысам-самцам и самкам;
- 2) изучение хронической токсичности ЦФ на крысах и собаках.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с российскими и международными требованиями [9–14].

Работа проведена на 80 здоровых мышах гибридах (СВА × C57Bl/6J) F₁ — самцах и самках, 100 здоровых неинбредных беспородных крысах, самцах и самках — и 5 собаках породы английский бигль — самцах и самках. Животные получены из разведения «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава

России. Все животные были здоровы. Доклиническое токсикологическое исследование проведено на мышах, крысах и собаках с использованием гранулята ЦФ, который содержал 57,3 мг ЦФ в 1 г гранулята. В качестве растворителя использовали 1 % крахмальный клейстер.

В опытах по острой токсичности препарат вводили однократно перорально мышам в дозах 100, 200, 300 и 600 мг/кг, крысам в дозах 100, 200, 400 и 500 мг/кг. Дозу препарата 600 мг/кг при введении мышам и 400 и 500 мг/кг при введении крысам разделяли на 2 введения с интервалом 2–3 ч (максимально возможный объем и максимальная 20 % концентрация). Срок наблюдения за животными составил 30 сут.

В опытах по хронической токсичности препарат вводили перорально ежедневно 15-кратно. При выборе доз учитывали оптимальные режим применения препарата и рекомендованную эффективную терапевтическую разовую дозу (ЭТД) для мышей — 10 мг/кг 5-кратно (суммарная доза 50 мг/кг). В исследованиях по изучению хронической токсичности на крысах использовали суммарные дозы 300 и 30 мг/кг. Суммарная доза 300 мг/кг рассчитана исходя из максимально возможной введенной дозы мышам 600 мг/кг, полученной в опытах по острой токсичности, пересчитанная для крыс с использованием видового коэффициента и с учетом максимально возможного разового объема введения. Суммарная доза 30 мг/кг — 1/10 от максимальной дозы и, при пересчете на крыс, близкая к суммарной ЭТД. В качестве контроля использовали 2 группы животных: в 1-й группе применяли раствор «пустого» гранулята, вводившийся в режиме и объеме, соответствующих объему максимальной дозы препарата; 2-я группа — интактные животные. В каждой группе животных использовали по 10 крыс, включая интактный контроль, 5 крыс из каждой группы выводили из эксперимента на 1-е сутки, оставшихся 5 — на 45-е сутки после окончания курса введения.

В исследованиях по изучению хронической токсичности на собаках препарат вводили в виде гранулята с кормом ежедневно 15-кратно в одно и то же время (утром). Изучены 2 суммарные дозы — 124,5 мг/кг (при пересчете на собак — доза, близкая к суммарной ЭТД для мышей) и в 5 раз выше — суммарная доза 622,5 мг/кг. Собаки были разделены на 2 группы: 1-я, получавшая максимальную дозу препарата, состояла из 3 собак (2 самок и 1 самца); 2-я группа, получавшая меньшую дозу препарата, состояла из 2 собак (1 самки и 1 самца). Срок наблюдения за животными составил 60 сут.

Результаты

В результате изучения острой токсичности ЦФ при введении в максимально возможной 20 % концентрации и максимально возможных объемах каких-либо проявлений токсичности отмечено не было. Установлено, что превышение предполагаемой суммарной терапевтической дозы препарата для мышей (50 мг/кг — 10 мг/кг ежедневно 5-кратно) в 12 раз и у крыс в 10 раз не вызвало гибели животных. ЦФ во всех изученных дозах не влиял на общее состояние животных, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных. У мышей-самцов отмечено снижение массы тела во всех группах на 3–14-е сутки наблюдения с восстановлением к 21-м суткам. У мышей-самок отмечено снижение массы тела на 21-е сутки наблюдения в группе, получавшей препарат в дозе 600 мг/кг, с восстановлением к 30-м суткам (рис. 1).

У крыс-самцов отмечено колебание массы тела во всех группах на уровне колебания массы тела контрольных животных. У крыс-самок отмечено увеличение массы тела на 14–21-е сутки наблюдения в группе, получавшей препарат в дозе 500 мг/кг, с возвратом к уровню массы тела контрольных животных к 30-м суткам (рис. 2).

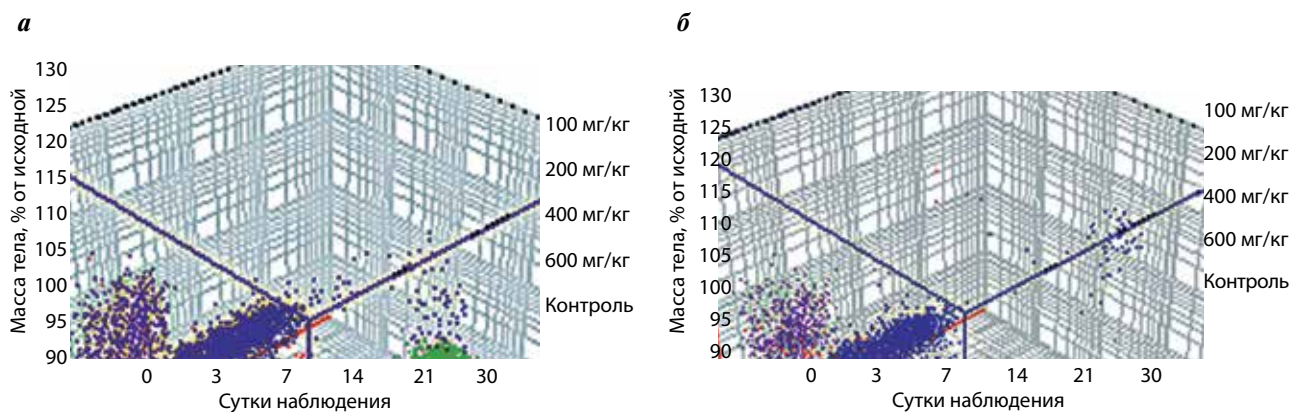


Рис. 1. Изменения массы тела мышей-гибридов (СВА × С57Вl/6J)F1 при изучении острой токсичности гранулята цифетрилина: а — у самцов; б — у самок

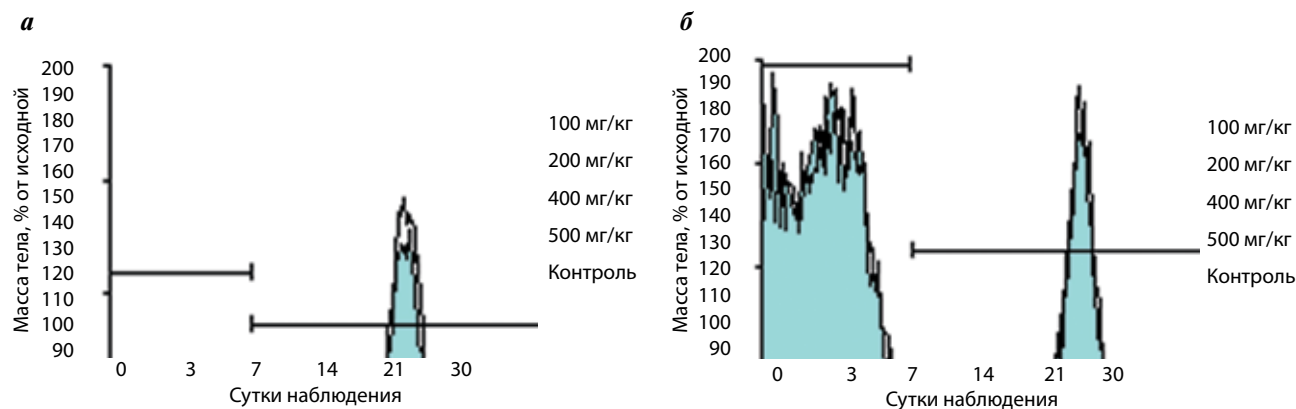


Рис. 2. Изменения массы тела неинбредных беспородных крыс при изучении острой токсичности гранулята цифетрилина: а — у самцов; б — у самок

При изучении хронической токсичности ЦФ на крысах и собаках при ежедневном пероральном применении в течение 15 дней во всех исследованных дозах не наблюдалось гибели животных, препарат не влиял на общее состояние животных, не вызывал внешних проявлений токсичности, не изменял поведенческие реакции животных. При ежедневном пероральном применении ЦФ на крысах и собаках в изученных дозах изменений показателей периферической крови отмечено не было.

Показано, что при ежедневном пероральном применении ЦФ у крыс в течение 15 дней во всех исследованных дозах функциональных изменений на электрокардиограмме не обнаружено, морфологически при применении препарата в суммарной дозе 300 мг/кг в миокарде большинства крыс обнаруживаются очаги гиперэозинофилии кардиомиоцитов, косвенно свидетельствующие об очагах ишемии, обратимость которых к 45-м суткам наблюдения была неполной. У собак ЦФ при ежедневном пероральном применении в течение 15 дней вызывал недозозависимые не обратимые к концу наблюдения (60 суток) как количественные, так и качественные изменения электрокардиограммы, более выраженные у самок — уменьшение числа сердечных сокращений, нарушение сердечного ритма, связанного с электрической проводимостью, и увеличение интервалов QT, инверсию зубцов Р и Т, свидетельствующих о трофических нарушениях сердечной мышцы. Морфологически ЦФ, введенный в суммарной дозе 622,5 мг/кг, вызывал очаговые дистрофические и деструктивные изменения в сердце, наблюдаемые на 1-е сутки после окончания введения препарата только у собаки-самки (рис. 3, 4).

Цифетрилин, независимо от примененной дозы, у собак вызывал небольшие колебания в сыворотке крови биомаркеров печени (белок, альбумин) на протяжении всего срока наблюдения и увеличение содержания мочевины на 60-е сутки наблюдения у 2 собак, получавших препарат в суммарной дозе 124,5 мг/кг (таблица).

Установлено, что при ежедневном пероральном применении ЦФ на крысах в суммарных дозах 300 и 30 мг/кг влияния препарата на функциональное состояние печени, почек, поджелудочной железы не отмечено. Морфологически: у собак имели место несильно выраженные очаговые дистрофические изменения в печени; в почках отмечены очаговые дистрофические, деструктивные и воспалительные изменения, более выраженные у самок и не обратимые к концу наблюдения (60-е сутки) (рис. 5, 6); у крыс, получавших препарат в суммарной дозе 300 мг/кг, наблюдаются обратимые к 45-м суткам опыта несильно выраженные деструктивные изменения в почках и в печени.

Ежедневное пероральное применение ЦФ в суммарной дозе 622,5 мг/кг на собаках морфологически вызывало деструктивно-дегенеративные изменения в яичниках собак-самок как на 1-е, так и на 60-е сутки (рис. 7, 8); а также торможение сперматогенеза

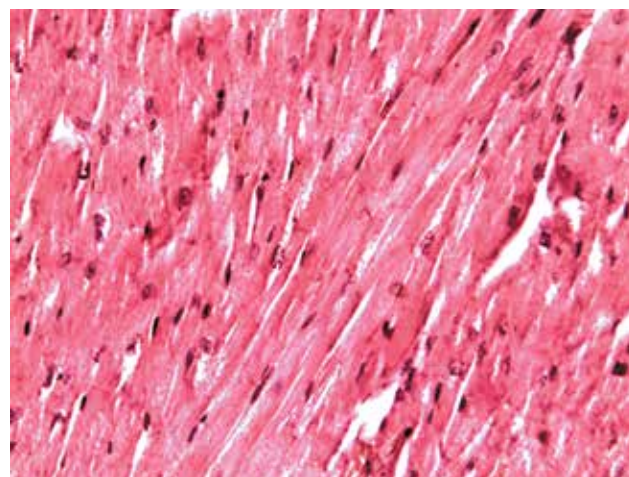


Рис. 3. Сердце собаки, цифетрилин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 1-е сутки. Миокард. Стенка левого желудочка с рыхлым расположением кардиомиоцитов. Гиперэозинофильные волокна. Некоторые кардиомиоциты с признаками зернистой дистрофии. Окраска гематоксилин-эозин, $\times 400$

Биохимические показатели сыворотки крови собак после ежедневного перорального введения цифетрилина в течение 15 дней

Номер собаки/ Σ доза (мг/кг)	Пол	Показатель/ норма	Сутки опыта									
			фон 1	фон 2	1	3	7	14	21	30	45	60
1 / 622,5	♂	Альбумин (г/л)/ 25–37	31,2	36,6	25,3	36,1	28,6	32,9	35,2	37,2	37,8	35,9
2 / 124,5	♀		37,3	29,6	29,3	36,7	30,9	35,4	41,3	40,6	40,1	37,3
3 / 124,5	♂		37,6	38,3	34,5	34,1	37,4	23,9	30,9	39,8	40,6	38,9
4* / 622,5	♀		34,6	24,4	38,9	—	—	—	—	—	—	—
5 / 622,5	♀		39,3	41,0	28,5	31,6	32,9	30,5	38,7	40,8	41,0	38,2
1 / 622,5	♂	Билирубин (мкмоль/л)/ 0–7,5	1,0	1,4	0,8	1,1	1,1	1,9	1,4	2,0	1,9	1,8
2 / 124,5	♀		2	1,3	1,1	2,1	1,3	1,5	1,8	3,3	2,6	1,6
3 / 124,5	♂		1,5	1,3	1,5	1,8	1,9	1,5	1,4	3,0	2,2	2,1
4* / 622,5	♀		1,5	0,8	1,6	—	—	—	—	—	—	—
5 / 622,5	♀		1,4	1,9	1,2	1,5	1,3	1,3	1,9	1,9	1,3	1,4
1 / 622,5	♂	Мочевина (ммоль/л)/ 4,3–8,5	5,0	2,5	5,5	5,9	4,5	5,0	4,2	6,8	5,5	6,7
2 / 124,5	♀		7,3	5,7	4,4	6,2	5,3	5,4	7,5	5,7	6,7	9,3
3 / 124,5	♂		8,6	7,9	7,0	5,8	5,4	5,8	4,5	7,9	6,2	9,5
4* / 622,5	♀		6,3	4,6	4,9	—	—	—	—	—	—	—
5 / 622,5	♀		5,2	7,0	4,2	4,8	5,2	4,0	4,4	7,0	6,2	6,6
1 / 622,5	♂	Белок (г/л)/ 54–77	55,1	62,9	41,3	59,8	46,9	53,9	56,1	60,7	60,1	57,3
2 / 124,5	♀		60,7	47,1	45,7	56,9	46,7	53,8	64,6	62,9	62,5	56,8
3 / 124,5	♂		61,7	61,9	55,5	54	61,3	38,6	48,2	63,8	66,3	63,0
4* / 622,5	♀		57,0	37,9	60,6	—	—	—	—	—	—	—
5 / 622,5	♀		59,7	64,3	44,6	49,2	51,4	47,9	61,5	63,8	64,2	59,9

*Собака усыплена на 1-е сутки после окончания введения цифетрилина.

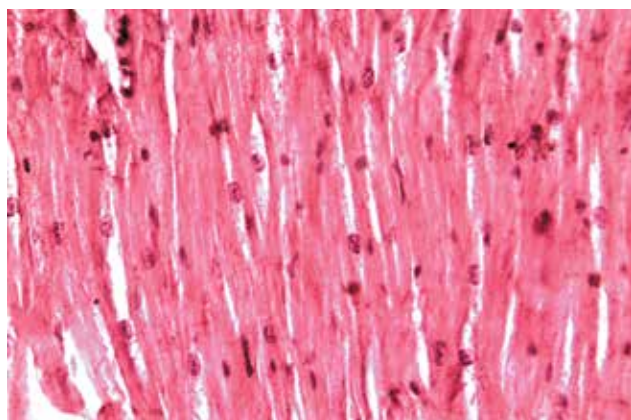


Рис. 4. Сердце собаки, цифетрин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 1-е сутки. Миокард. Стенка левого желудочка с рыхлым расположением кардиомиоцитов. Гиперэозинофильные волокна. Некоторые кардиомиоциты с признаками зернистой дистрофии. Окраска гематоксин-эозин, × 400

в семенниках у собаки-самца на 60-е сутки (рис. 9). Установлены морфологические изменения и морфологические особенности в ряде эндокринных органов собак (надпочечники, гипофиз, щитовидная железа), отражающие изменения функционального статуса и наиболее выраженные у собак-самок.

При ежедневном пероральном применении как ЦФ на крысах в суммарных дозах 300 и 30 мг/кг, так и «пустого» гранулята в течение 15 дней по сравнению с интактным контролем отмечены более выраженные признаки лимфоидной и ретикуло-плазмочитарной гиперплазии в лимфопролиферативных органах — селезенке и брыжеечных лимфатических узлах. У крыс, получавших препарат во всех исследованных дозах, морфологически отмечено обратимое увеличение коры надпочечников и вакуольная

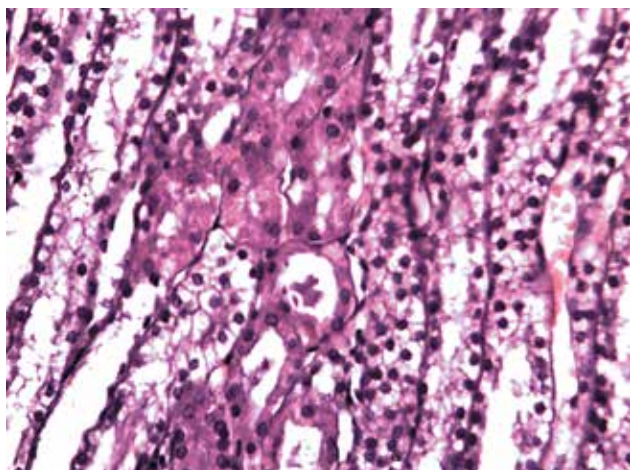


Рис. 5. Почка собаки, цифетрилин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 60-е сутки. В бертиньевых колонках в извитых (дистальных) и прямых канальцах (узкая часть петли Генле) — признаки дистрофии эпителиальных клеток, а в их просвете — скопления клеточного детрита. Окраска гематоксин-эозин, $\times 400$

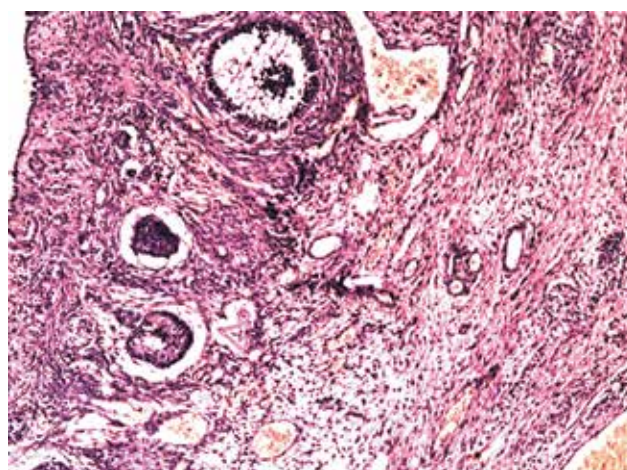


Рис. 8. Яичник собаки, цифетрилин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 60-е сутки. В корковом веществе видны отдельные атретические фолликулы. Окраска гематоксин-эозин, $\times 100$

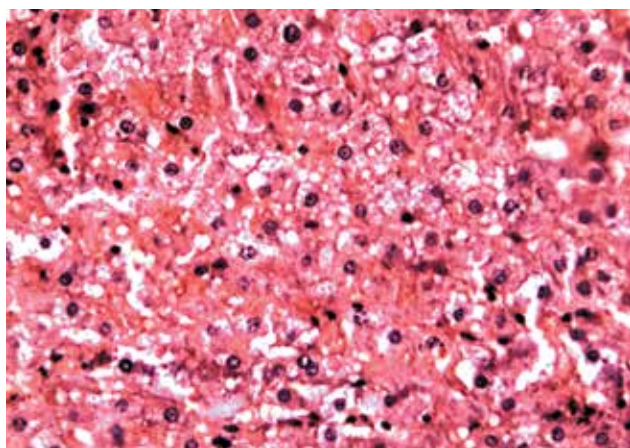


Рис. 6. Печень собаки, цифетрилин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 60-е сутки. Участок с вакуольной (жировой) дистрофией гепатоцитов. Окраска гематоксин-эозин, $\times 400$

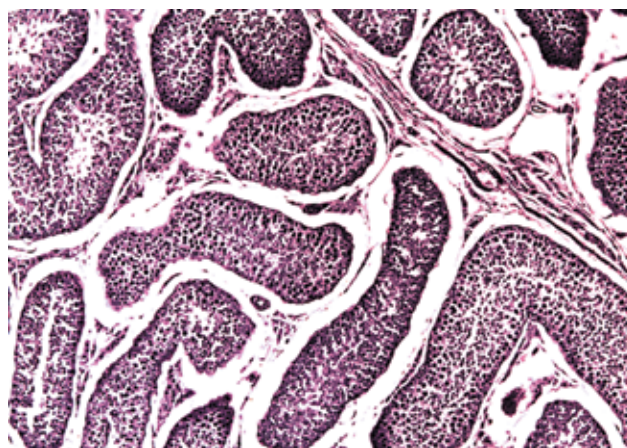


Рис. 9. Семенники собаки, цифетрилин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 60-е сутки. Общий вид. В срезах семенных канальцев — сперматогенный эпителий на разных стадиях сперматогенеза. Окраска гематоксин-эозин, $\times 100$

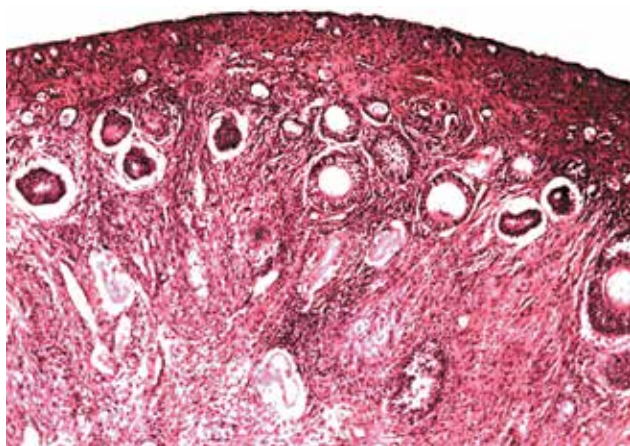


Рис. 7. Яичник собаки, цифетрилин в Σ дозе 622,5 мг/кг, 1-е сутки. Корковое вещество. Деструкция примордиальных и первичных фолликулов. Окраска гематоксин-эозин, $\times 100$

дистрофия секреторных (ацинарных) клеток концевых отделов поджелудочной железы.

Заключение

Таким образом, на основании данных, полученных в опытах по острой токсичности на мышах и крысах — самках и самцах и хронической токсичности при 15-кратном пероральном ежедневном введении крысам и собакам, ЦФ во всех изученных дозах не вызывал гибели животных и внешних проявлений интоксикации, не изменял поведенческие реакции животных в течение всего срока наблюдения. Животные охотно ели корм, сохраняли двигательную активность. В исследованиях по хронической токсичности на крысах и собаках четкой

дозовой зависимости не выявлено. С учетом функциональных и морфологических изменений во внутренних органах как крыс, так и собак изученные дозы ЦФ охарактеризованы как дозы, вызывающие слабые незначительные изменения, — низкие токсические дозы. Лимитирующий вид токсичности не установлен, так как препарат вызывает незначительные морфофункциональные изменения различной степени обратимости практически во всех органах и системах организма крыс и собак. На основании полученных на экспериментальных животных данных о функциональных и морфологических измене-

ниях в органах и тканях показано, что самки более чувствительны к препарату, чем самцы.

На основании анализа данных, полученных в опытах по острой и хронической токсичности ЦФ при 15-кратном пероральном ежедневном введении крысам и собакам, определена начальная (стартовая) безопасная доза для человека на I фазу клинических испытаний с последующей эскалацией доз по модифицированному методу Fibonacci [15]. В настоящее время лекарственная форма ЦФ (таблетки по 6 мг) находится на I фазе клинических испытаний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Смирнова Л.И., Устинкина С.В., Смирнова А.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевым действием. Патент РФ № 2254139. 2003. [Smirnova L.I., Ustinkina S.V., Smirnova A.P. et al. An agent with an antitumor effect. Patent of the Russian Federation No. 2254139. 2003 (In Russ.).]
2. Spada F., Valente M. Review of recent advances in medical treatment for neuroendocrine neoplasms: somatostatin analogs and chemotherapy. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment* 2016;2:313–20. DOI: <http://dx.doi.org/10.20517/2394-4722.2016.38>.
3. Моргунов Л.Ю. Октреотид в лечении нейроэндокринных опухолей: достигнут ли успех? Исследования и практика в медицине 2015;2(2):63–72. [Morgunov L.Yu. Octreotide in the treatment of neuroendocrine tumors: has success been achieved? *Issledovaniya i praktika v medicine* = Research and practice in medicine 2015;2(2):63–72 (In Russ.).] DOI: <http://dx.doi.org/10.17709/2409-2231-2015-2-2-63-72>.
4. Шпрах З.С., Ярцева И.В., Игнатьева Е.В. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. Химико-фармацевтический журнал 2014;48(3):19–22. [Shprakh Z.S., Yartseva I.V., Ignatieva E.V. et al. Synthesis and chemical-pharmaceutical characteristics of the somatostatin analog having antitumor activity. *Khimiko-pharmaceuticheskii zhurnal* = Chemical-Pharmaceutical Journal 2014;48(3):19–22 (In Russ.).]
5. Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых соединений среди аналогов гипоталамического гормона соматостатина. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(3):128–133. [Kubasova I.Yu., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Search potential antitumor compounds among analogues of the hypothalamic hormone somatostatin. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2006;5(3):128–33 (In Russ.).]
6. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Изучение «острой» токсичности цифтрелина на мышах и крысах. Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты (экспериментальная онкология)»: тез. докл. М., 2012. С. 28. [Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu., Ermakova N.P. et al. Study of the “acute” toxicity of digitetrelin in mice and rats. Materials of the XI All-Russian scientific and practical conference with international participation “Domestic antitumor drugs (experimental oncology)”: report abstract. Moscow, 2012. P. 28 (In Russ.).]
7. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Изучение «субхронической» токсичности Цифтрелина на крысах. Материалы Белорусско-российской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты»: тез. докл. М., 2013. С. 44. [Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu., Ermakova N.P. et al. A study of the “subchronic” toxicity of Tsiphetrelin in rats. Materials of the Belarusian-Russian scientific and practical conference with international participation “Domestic antitumor drugs”: report abstract. Moscow, 2013. P. 44 (In Russ.).]
8. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Предклиническое токсикологическое изучение Цифтрелина. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике»: тез. докл. М., 2014. С. 98. [Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu., Ermakova N.P. et al. Preclinical toxicological study of Tsiphetrelin. Materials of the All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation “Antitumor therapy: from experiment to clinic”: report abstract. M., 2014. P. 98 (In Russ.).]
9. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1–53. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and Ethical Aspects of Research on Biomodels and Laboratory Animals. *Kachestvennaya klinicheskaya praktika* = Qualitative clinical practice 2002:1–53 (In Russ.).]
10. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М., 2005. С. 170–204. [Methodological instructions for studying the general toxic effects of antitumor drugs. In: Guide to experimental (pre-clinical) study of new pharmacological substances / under the general ed. Corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences prof. R.U. Khabriev.

- 2nd revised and additional edition. Moscow, 2005. P. 170–204 (In Russ.)).
11. Михайлова Л. М., Сыркин А. Б., Гарин А. М. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под общ. ред. д. м. н. А. Н. Миронова. М., 2012. 944 с. [Mikhailova L. M., Syrkin A. B., Garin A. M. et al. A guide to preclinical drug research / under the general ed. Dr. med. A. N. Mironov. M., 2012. 944 p. (In Russ.)].
12. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 53434–2009) «Принципы надлежащей лабораторной практики». М., «Стандартинформ», 2010. [National Standard of the Russian Federation (GOST 53434–2009) “Principles of Good Laboratory Practice”. Moscow: Standardinform, 2010. (In Russ.)].
13. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (Минздравсоцразвития России) от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил лабораторной практики». [Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation (Ministry of Health and Social Development of Russia) from 01 April 2016 No. 199n “On approval of the Rules of Laboratory Practice” (In Russ.)].
14. Гуськова Т. А. Токсикология лекарственных средств. 2-е изд., доп. М., 2008. С. 196. [Gus’kova T. A. Toxicology of medicines (second edition supplemented). M., 2008. P. 196. (In Russ.)].
15. Collins J. M., Zaharko D. S., Didrich R. L., Chabner B. A. Potential roles for preclinical pharmacology in phase I clinical trials. *Cancer Treat. Rep.* 1986;70(1):73–80.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ *IN VIVO* ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ В РЯДУ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА (РАЗВЕРНУТОЕ СООБЩЕНИЕ)

И.С. Голубева, О.В. Горюнова, Н.П. Яворская

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Введение. Наличие в молекуле индокарбазола остатка активного метаболита (аминокислоты) изменяет физико-химические и пролекарственные свойства аминокислотных производных гликозидов индокарбазола (АПГИК). Компьютерным методом была ранее предсказана низкая вероятность их цитотоксической активности *in vitro*, что было подтверждено в МТТ-тесте на 5 линиях опухолевых клеток. Тем же компьютерным методом была спрогнозирована значимая вероятность противоопухолевой активности АПГИК *in vivo*, что требует экспериментальной проверки.

Цель исследования — оценка противоопухолевой активности АПГИК и выбор наиболее эффективных соединений.

Материалы и методы. Исследование противоопухолевой активности АПГИК проводили на опухолевой модели мышей — раке шейки матки РШМ5. Соединения вводили мышам СВА/Лас внутривентрально 5-кратно ежедневно с интервалом 24 ч. Наблюдение за животными продолжали до их гибели. Противоопухолевый эффект препаратов оценивали по торможению роста опухоли, увеличению продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными животными.

Результаты. Оттитрована оптимальная доза для данного ряда соединений, равная 100 мг/кг. Оценена противоопухолевая активность этих соединений на модели РШМ5.

Выводы. На основе полученных данных предполагается расширенное исследование *in vivo* противоопухолевых свойств отобранных 5 лидерных соединений АПГИК.

Ключевые слова: индокарбазолы, гликозиды и глюкозиды индокарбазолов, аминокислотные производные, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-71-77

COMPARATIVE *IN VIVO* STUDYING OF POTENTIAL ANTINEOPLASTIC PROPERTIES AMONG OF AMINO-ACID DERIVATIVE GLYCOSIDES OF THE INDOLOCARBAZOLE (DETAILED REPORT)

I.S. Golubeva, O.V. Goryunova, N.P. Yavorskaya

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. The existence of the active metabolite (amino acid) residue in the of an indolocarbazole molecule changes physical-chemical and pro-medicinal properties of aminoacid derivatives glycosides of indolocarbazole. The computer method has earlier foretold low probability of their cytotoxic activity *in vitro* that was confirmed in the MTT-test on 5 lines of tumor cells. The same computer method predicted significant probability of antineoplastic activity of aminoacid derivatives glycosides of indolocarbazole *in vivo* that demands the experimental check.

Purpose of the study — assessment of aminoacid derivatives glycosides of indolocarbazole as potential antitumor medications.

Materials and methods. The research of antineoplastic activity of aminoacid derivatives glycosides of indolocarbazole was performed on mice tumoral models — cervical cancer CC5. Abdominal injections were made to CBA/Lac mice 5 times a day with 24 h interval. Observation of animals was continued till their death. The antineoplastic effect of medicines was estimated according to tumor growth inhibition, increase in life expectancy of experiential mice in comparison with control animals.

Results. The optimum dose for this number of compounds, equal to 100 mg/kg is titrated. The antineoplastic activity of aminoacid derivatives glycosides of indolocarbazole on the model CC5 is estimated.

Conclusions. On the basis of the obtained data the expanded research of antineoplastic properties of the selected 5 aminoacid derivatives glycosides of indolocarbazole is supposed to perform *in vivo*.

Key words: indolocarbazoles, glycosides and glucosides of indolocarbazoles, amino-acid derivatives, antineoplastic activity

Введение

Конференция Всемирной организации здравоохранения осенью 2017 г. была посвящена борьбе с неинфекционными, в том числе онкологическими, заболеваниями как важнейшей проблеме здравоохранения в мире [1]. В докладе от 1 ноября 2017 г. министр здравоохранения Российской Федерации В.И. Скворцова доложила о разработке в России инновационных таргетно действующих иммунопрепаратов в области онкологии. Эти весьма затратные изыскания необходимы для создания персонально действующих лекарств с учетом гетерогенности опухолевых клеток и их множественной лекарственной устойчивости по отношению к известным препаратам. В то же время актуальны и значительно менее затратны исследования, посвященные поиску противоопухолевых низкомолекулярных иммунопрепаратов и опирающиеся на возможность компьютерного прогнозирования их биологической активности. В работе [2] авторы провели оценку перспективности создания производных N-гликозидов индолакарбазола, содержащего в гетероциклическом ядре аминокислотные остатки, как потенциальных противоопухолевых средств. В настоящее время за рубежом проходят II–III фазы клинических испытаний N-гликозилированных производных индола[2,3-а]пироло[3,4-с]карбазола [3], в которых гетероциклическая часть препарата обуславливает его противоопухолевые свойства, а заместители, в том числе углеводный остаток, модулируют растворимость и пути фармакокинетического продвижения лекарства в организме. Добавление в структуру молекулы индола[2,3-а]пироло[3,4-с]карбазола остатков аминокислот или пептидов [4–6] способно значительно видоизменить фармакокинетические свойства таких производных индолакарбазолов, что определяется биологической активностью введенных компонентов, участвующих в важнейших процессах энергообмена в клетке. Аминокислотные производные гликозидов индолакарбазола (АПГИК) были синтезированы в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии) и предоставлены для исследований [7]. Ранее показано [2], что в соответствии с данным *in silico* прогнозом (информационно-компьютерные технологии для доэкспериментального скрининга и прогнозирования различных свойств и биологической активности по структурным формулам соединений) с использованием программы PASS [8, 9] соединения АПГИК не обнаружили цитотоксическую активность *in vitro*: показатель цитотоксической активности $IC_{50} > 10$ мкМ был подтвержден в МТТ-тесте на 5 линиях опухолевых клеток. При этом производные АПГИК проявили значимую противоопухолевую активность *in vivo* в опытах на мышах с перевиваемой

опухолью рака шейки матки РШМ5 [10], чему соответствовали данные прогноза о значимой вероятности противоопухолевой активности АПГИК (57–74 %) [2]. Помимо этого, предсказанные *in silico* их биологические свойства, в том числе вероятность 60 % наличия иммуностимулирующего действия у ряда соединений АПГИК, лягут в дальнейшем в основу изучения механизма их противоопухолевой активности.

Цель исследования – анализ результатов сравнительного изучения противоопухолевых свойств соединений АПГИК *in vivo* в опытах на мышах с перевиваемой опухолью РШМ5 и выделение среди них веществ, наиболее перспективных для дальнейшего расширенного изучения.

Материалы и методы

Опыты проводили на мышах-самках в возрасте 1,5–2 мес с начальной массой тела 19–23 г, гибридах 1-го поколения F1 (DBA/2 × C57Bl/6j) (B6D2F1) с меланомой B16 и раком молочной железы Ca755, линии DBA₂ с лимфолейкозом P388, линии CBA/Lac с раком шейки матки РШМ5. Животных получали из филиала «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» и содержали в экспериментально-биологической лаборатории (виварий) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в соответствии с санитарными правилами по содержанию лабораторных животных [11]: на брикетированном корме и постоянном доступе к воде, в помещении с естественным освещением, контролируемой температурой 18–22 °С и влажностью воздуха 65 %. Клетки из полипропилена, подстил – опилки.

Противоопухолевую активность *in vivo* гликозидов АПГИК определяли по методике, принятой в НМИЦ онкологии для экспериментов с использованием асцитных и солидных моделей опухолевого роста мышей [12, 13].

Штаммы перевиваемых опухолей получали из банка опухолевых штаммов НМИЦ онкологии и поддерживали *in vivo* в лаборатории экспериментальной химиотерапии на линейных животных. В опытах использовали 2–10-й пассажи штаммов *in vivo*.

Перед лечением мышей распределяли по группам. Число животных в контрольной группе составляло 10, в опытных группах – по 5–7.

Солідные опухоли перевивали половозрелым мышам массой тела 18–23 г в возрасте 1,5–2 мес. Инокуляцию опухолевых клеток проводили подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1:10 (5×10^6 клеток). Лейкозные клетки перевивали самкам гибридам BDF₁ внутрибрюшинно по 10^6 клеток на мышь в 0,4 мл питательной среды 199. Лечение мышей с асцитной опухолью начинали через 24

ч, а мышей с солидными опухолями — через 48 ч после перевивки опухолей. Препараты вводили внутривенно ежедневно в течение 5 дней с интервалом 24 ч. Навески соединений растворяли в диметилсульфоксиде и разводили физиологическим раствором до 10 % концентрации для получения готовых препаратов с концентрацией 5 мг/мл. Растворы препаратов готовили *ex tempore*. Наблюдение за животными проводили до их гибели.

Исходя из подобия строения аминокислот, использованных в синтезе производных индолокарбазола, соединения сравнивали, объединяя в группы с I по VII, и проводили в одном опыте лечение соединениями отдельно взятой группы.

I группа

L-треониновое производное N-глюкозида индолопирролокарбазола;

L-треониновое производное N-рибозида индолопирролокарбазола;

D-треониновое производное N-глюкозида индолопирролокарбазола;

N-глюкозид индолопирролокарбазола.

Далее изучаемые соединения разделили по группам — N-глюкозиды индолопирролокарбазола для следующих аминокислот:

II группа

L-треонин

L-серин

L-тирозин

L-тирозин (метиловый эфир)

III группа

L-аланин

L-валин

IV группа

глицин

β -аланин

ГАМК

V группа

L-аргинин (нитропроизводное)

L-лизин (Кбз-производное)

L-глутаминовая кислота

VI группа

L-триптофан

L-фенилаланин

VII группа

L-метионин

L-метионина сульфоксид.

Оценку результатов лечения проводили по показателям торможения роста опухолей (ТРО) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ).

ТРО вычисляли по формуле

$$\text{ТРО (\%)} = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где V_k и V_o — средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах соответственно, который

для каждой солидной опухоли определяли как произведение размеров 3 перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили каждые 4 дня после окончания лечения.

УПЖ леченых животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле

$$\text{УПЖ (\%)} = (\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k) / \text{СПЖ}_k \times 100,$$

где СПЖ_o и СПЖ_k — средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных соответственно. Показатели эффективности изучаемого препарата определяли в сравнении с контрольными группами.

Активными в противоопухолевом отношении считали дозы препаратов, вызывающие ТРО ≥ 50 % продолжительностью не менее 8–12 дней после окончания лечения или УПЖ животных ≥ 25 %.

Токсичность препаратов в использованных режимах и дозах оценивали по срокам гибели леченых животных в сравнении с гибелью животных в контрольной группе. Трупы животных утилизировали в соответствии с санитарными правилами НМИЦ онкологии.

Для выполнения экспериментов составляли группы численностью, достаточной для проведения статистического анализа и расчета показателей достоверности. Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (SEM). Различия между контрольными и экспериментальными группами считали достоверными при 95 % уровне значимости ($p \leq 0,05$). Статистическую обработку данных выполняли с помощью программы Statistica for Windows 5.5.

Результаты

Значимый прогноз (57–74 %) вероятности противоопухолевой активности АПГИК был дан на основе их исследования *in silico* [2]. Для сравнительного изучения соединений АПГИК *in vivo* при подборе условий эксперимента был выбран глюкозид L-треонина. Титрование доз обычно проводят в опытах на мышах с лимфоидным лейкозом Р388. Однако выбранный глюкозид не показал активности на лимфолейкозе Р388. На меланоме В16 получили только непосредственный эффект 80 % ТРО. На аденокарциноме молочной железы Са755 в дозе 120 мг/кг с ежедневным 5-кратным введением с интервалом 24 ч соединение выявило непосредственный эффект 73 % ТРО, сохранявшийся до 12-го дня наблюдения после окончания лечения (табл. 1). Несмотря на то что на модели Са755 были получены противоопухолевые эффекты, она неудобна для экспериментов, так как имеет выраженную сезонную зависимость.

Далее глюкозид L-треонина изучали на модели рака шейки матки РШМ5. В исследованиях на этой модели он показал высокую противоопухолевую активность: после окончания лечения 93 % ТРО, с сохранением на уровне 63 % ТРО до 18-го дня наблюдения, а в отдельных опытах — до 21–29-го дня, с УПЖ мышей до 25 %, что укладывалось в принятые критерии потенциальной противоопухолевой активности препарата.

Таблица 1. Противоопухолевое действие глюкозида L-треонина на мышах с опухолями В16 и Ca755

Доза, мг/кг × 5/24 ч	ТРО, % в день после окончания лечения				УПЖ, %	Гибель животных
	1-й	4-й	8-й	12-й		
В16						
100	80	41	30	27	12	0/6
Ca755						
120	73	72	27	59	—	0/7

При поиске новых активных в противоопухолевом отношении соединений в ряду производных АПГИК противоопухолевое действие оценивали по показателям ТРО и УПЖ, полученным в результате лечения мышей с опухолью РШМ5 по методике, принятой для глюкозида треонина: растворы препаратов в дозе 100 мг/кг вводили внутривенно 5-кратно ежедневно через 24 ч. В каждом опыте глюкозид треонина использовали как стандарт сравнения. Результаты изучения противоопухолевого действия производных АПГИК на мышах с опухолью РШМ5 представлены в табл. 2.

В группе I сравнивали L-треониновые производные глюкозида и рибозида карбазола. Результаты показали преимущество глюкозидного производного L-треонина перед рибозидным: ТРО 93–61 % до 21-го дня наблюдения с УПЖ 25 % или 70–50 % до 8-го дня наблюдения после окончания лечения с УПЖ 23 % соответственно. Далее сравнивали L- и D-треониновые глюкозиды, где по результатам исследования L-изомер превосходил по активности D-изомер.

Сравнительное изучение противоопухолевой активности глюкозидов группы II с наличием гидроксильной группы в боковой цепи аминокислоты показало, что при лечении глюкозидом серинового производного непосредственный противоопухолевый эффект после окончания лечения 61 % ТРО сохранялся на этом уровне до 22-го дня наблюдения, на 25-й день ТРО был равен 48 %, УПЖ — 19 %. Глюкозиды L-тирозина и его метилового эфира сохраняли ТРО в пределах 80–56 % до 8–12-го дня наблюдения без УПЖ. Гибели леченых животных в группах не было.

Глюкозиды группы III содержали алкильный заместитель в остатке аминокислоты. Глюкозид производного L-аланина, так же как и L-тирозина

(II группа), сохранял противоопухолевое действие до 12-го дня наблюдения, без УПЖ. Для производного L-валина доза 100 мг/кг в использованных условиях оказалась токсичной (гибель 3 мышей из 7), а доза 75 мг/кг вызывала минимальный противоопухолевый эффект: не выше 59 % ТРО только до 12-го дня наблюдения, без УПЖ, с гибелью 1 мыши в группе.

Глюкозиды группы IV имели открытую карбоксильную группу, разнотеленную от ароматического ядра карбазола. У производного глицина ТРО изменялся волнообразно, но не превышал 55 % на 21-й день наблюдения после окончания лечения. Наличие в молекуле глюкозида остатка β-аланина вызывало умеренный противоопухолевый эффект 62–59 % ТРО, который сохранялся до 22-го дня. У производного γ-аминомасляной кислоты ТРО изменялся с 80 до 49 % (16-й день наблюдения). У 2 соединений (производных глицина и γ-аминомасляной кислоты) наблюдалась гибель 1 мыши без УПЖ.

Глюкозиды группы V несли в остатке аминокислоты протонакцепторный или протондонорный фрагмент. Производные нитро-L-аргинина, карбобензоксид-L-лизина (Кбз-L-лизина) и L-глутаминовой кислоты обладали невысокой противоопухолевой активностью: непосредственно после окончания лечения в пределах 50–65 % ТРО, которая, однако, сохранялась у всех групп мышей в процессе наблюдения на уровне ТРО 57–61 % до 16-го дня и 48–54 % на 25-й день, а противоопухолевая активность производного лизина, изменяясь волнообразно, достигала 65 % ТРО на 29-й день. УПЖ наблюдался для всех соединений, но не достигал принятого критерия 25 %.

Глюкозиды группы VI содержали ароматический фрагмент в боковой цепи аминокислоты. На модели опухолевого роста РШМ5 в стандартных дозах и режиме производное L-триптофана вызывало гибель 2 животных из 6 при минимальных показателях активности: ТРО <56 % до 8-го дня наблюдения. Глюкозид, содержащий остаток L-фенилаланина, при той же гибели мышей проявлял умеренную активность до 29-го дня наблюдения — 54 % ТРО, без УПЖ. При снижении дозы до 75 мг/кг противоопухолевый эффект составлял 72–49 % ТРО только до 16-го дня, уменьшаясь как по величине, так и по продолжительности, но без гибели животных.

Глюкозиды группы VII имели содержащий серу фрагмент в боковой цепи аминокислоты. Глюкозид, имеющий остаток L-метионина, в дозе 100 мг/кг вызывал противоопухолевый эффект 71–52 % ТРО, сохраняющийся до 21-го дня, без УПЖ, с гибелью 1 мыши в группе, а производное сульфоксида L-метионина не проявило противоопухолевой активности в принятых критериях.

Изученный в 1 опыте с препаратами VII группы глюкозид индолопиролокарбазола, не имевший

Таблица 2. Противоопухолевое действие N-гликозидов аминокислотных производных гликозидов индолакарбазола на мышей с опухолью РШМ 5

Аминокислотный остаток	Доза, мг/кг × × 5/24 ч	ТРО, % в день после окончания лечения								УПЖ, %	Гибель животных	Вероятность эффекта**
		1-й	4-й	8-й	12-й	16-й	21-й	25-й	29-й			
I группа												
L-треонин	100	93	80	66	77	49	61	—	—	25	0/5	72
D-треонин*	75	74	68	65	52	36	—	—	—	—	1/7	72
L-треонин рибозид	100	70	58	50	40	7	—	—	—	23	0/5	72
II группа												
L-треонин	100	93	79	80	82	63	60	59	52	25	0/7	72
L-серин	100	61	69	64	60	49	61	48	—	19	0/6	72
L-тирозин	100	79	79	69	44	37	—	—	—	—	0/7	72
L-тирозина метиловый эфир	100	78	80	67	56	40	28	25	14	18	0/6	72
III группа												
L-аланин	100	80	74	59	57	44	43	—	—	—	0/6	74
L-валин	100	75	67	74	58	53	55	57	30	—	3/7	75
	75	46	50	55	59	46	28	24	16	—	1/7	
IV группа												
Глицин	100	45	41	59	51	44	55	—	—	—	1/7	72
β-аланин	100	62	58	64	61	46	59	—	—	—	0/7	69
γ-аминомасляная кислота	100	81	79	82	63	49	34	33	—	—	1/7	70
V группа												
Нитро-L-аргинин	100	60	56	54	50	61	56	54	41	17	0/6	57
Кбз-L-лизин	100	40	44	46	64	59	51	47	65	20	0/7	62
Глутаминовая кислота	80	50	64	64	58	57	—	48	—	14	0/7	74
VI группа												
L-триптофан	100	50	52	56	39	42	23	33	—	—	2/6	68
L-фенилаланин	100	81	74	81	62	65	63	64	54	—	2/6	73
	75	46	72	63	64	49	41	—	—	—	0/7	
VII группа												
L-метионин	100	71	66	72	67	41	52	—	—	—	1/6	64
L-метионина сульфоксид	100	28	42	35	28	40	23	30	—	—	1/6	63
—NH— (без аминокислотного остатка)	100	86	53	26	43	29	17	—	—	—	0/6	81

* Внутривенное введение. ** Вероятность противоопухолевой активности, рассчитанная методами *in silico* [2].

аминокислотного остатка при пирольном атоме азота карбазола, проявляет непосредственный эффект 86 % ТРО, который к 4-му дню снижается до 53 % и далее, без УПЖ.

Таким образом, проведенные эксперименты подтвердили результаты прогноза *in silico* [2] о высокой вероятности противоопухолевой активности соединений АПГИК (см. табл. 2). В то же время лечение

препаратами, включенными в группы III, IV, VI и VII, сопровождалось гибелью животных либо умеренными значениями ТРО. При отсутствии остатка аминокислоты в молекуле глюкозид индолопирролокарбазола, невзирая на предсказанную вероятность 81 % противоопухолевого эффекта, проявил значимый процент ТРО только до 4-го дня после лечения.

Путем анализа полученных результатов для дальнейшего расширенного изучения были выбраны 5 глюкозидов карбазола: производные L-треонина, L-серина, нитро-L-аргинина, Кбз-L-лизина и L-глутаминовой кислоты.

Заключение

Использование возможностей компьютерного анализа для вероятностной оценки противоопухолевых свойств соединений на основе их виртуальной структуры — важнейший в настоящее время этап

направленного поиска лекарств. В работе, являющейся продолжением изучения аминокислотных производных гликозидов индолопирролокарбазола АПГИК [2, 7, 10] в качестве потенциальных противоопухолевых средств, были удачно использованы прогностические возможности компьютерной программы PASS [8, 9]. Была подтверждена спрогнозированная *in silico* значимая противоопухолевая активность АПГИК в опытах *in vivo* на мышах с опухолью рака шейки матки РШМ5 с отбором 5 лидерных соединений для углубленного изучения. Важно отметить, что по результатам определения цитотоксической активности *in vitro* в экспериментах на 5 видах опухолевых клеток ($IC_{50} > 10$ мкМ) соединения АПГИК должны были быть отбракованы в соответствии с принятыми в настоящее время критериями отбора соединений на дальнейшее изучение, но подтвердили перспективность углубленного исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Информационный бюллетень портала ONCOLOGY.ru от 10 ноября 2017 г. Новости онкологии. [ONCOLOGY.ru Portal newsletter from November 10, 2017 onwards. Oncology news (In Russ.)].
2. Апрышко Г.Н., Жукова О.С., Фетисова Л.В. и др. Изучение свойств потенциальных противоопухолевых аминокислотных производных гликозидов индолокарбазолов *in silico* и *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):46–54. DOI: 17650/1726-9784-2017-16-4-46-54. [Apryshko G.N., Zhukova O.S., Fetisova L.V. et al. *In silico* and *in vitro* research of potential antineoplastic amino acid derivatives of indolocarbazole glycosides properties. Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(4):46–54 (In Russ.)].
3. Butler M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. Nat. Prod. Rep 2005;22(2):162–95. DOI: 10.1039/b402985m. PMID: 15806196.
4. Trostmann U., Hartenstein J., Barth H. et al. Patent Ger. Offen DE 4243321 A1. June 23, 1994.
5. Trostmann U., Schaechtele C., Hartenstein J. et al. Patent USA 5750555. May 12, 1998.
6. Горюнова О.В., Захарчук Г.М., Жукова О.С. и др. N6-Дипептидные производные N12-рибозил-индоло [2,3-а] карбазола. Биоорганическая химия 2014;40(1):12–9. DOI: 10.7868/S0132342314010047. [Goryunova O.V., Zakharchuk G.M., Zhukova O.S. et al. N6-Dipeptide Derivatives of N12-Ribosyl indolo [2,3-a] carbazole. Bioorganicheskaya Khimiya = Bioorganic chemistry 2014;40(1):12–9. (In Russ.)].
7. Мельник С.Я. Синтез и изучение гликозидов, производных бисиндола и родственных индоло [2,3-а] карбазолов. Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. М., 2003. С. 281–294. [Mel'nik S.Ya. Synthesis and study of glycosides, bisindole derivatives and related indolo [2,3-a] karbazolov. Experimental oncology at the turn of the century. Eds. M.I. Davydova, A.Yu. Baryshnikova. Moscow, 2003. P. 281–294 (In Russ.)].
8. Filimonov D.A., Poroikov V.V. Probabilistic approach in activity prediction. In: Chemoinformatics approaches to virtual screening. Eds. A. Varnek, A. Tropsha. Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008. P. 182–216.
9. Филимонов Д.А., Лагунин А.А., Глоризова Т.А. и др. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS Online. Химия гетероциклических соединений 2014;3:483–99. [Filimonov D.A., Lagunin A.A., Glorizova T.A. et al. Prediction of biological activity spectra of organic compounds using a Web resource PASS Online. Himiya geterociklicheskih soedinenii = Chemistry of heterocyclic compounds 2014;3:483–99 (In Russ.)].
10. Голубева И.С., Яворская Н.П., Горюнова О.В. Изучение *in vivo* потенциальных противоопухолевых свойств аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):85–8. DOI: 17650/1726-9784-2017-16-4-85-88. [Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Goryunova O.V. Research *in vivo* the qualities of potential antitumor amino-acid derivatives of glycosides of indolocarbazole. Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(4):85–8 (In Russ.)].
11. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1–53. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhanyan R.V. Didactic and ethical aspects of carrying out researches on biomodels and on laboratory animals. Kachestvennaya klinicheskaya praktika = High-quality clinical practice 2002;1–53 (In Russ.)].
12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой актив-

ности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657. [Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidance on pre-clinical

study of antitumor activity of drugs. In: Guide to conduct preclinical studies of drugs. Part 1. Eds. A.N. Mironov, N.D. Bunyatyan et al. Moscow: Grif i K, 2012. P. 642–657 (In Russ.)].

13. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Ред. З.П. Софьина,

А.Б. Сыркин (СССР), А. Голдин, А. Кляйн (США). М.: Медицина, 1980. С. 71–112. [Experimental evaluation of anticancer agents in the Soviet Union and the United States. Eds. Z.P. Sofina, A.B. Syrkin (USSR), A. Goldin, A. Klein (USA). Moscow: Meditsina, 1980. P. 71–112 (In Russ.)].

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУНОАДГЕЗИВНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МУЛЬТИФИТОАДАПТОГЕНОМ В ПРОФИЛАКТИКЕ СПОНТАННЫХ ГЕПАТОКАРЦИНОМ

Е.В. Бочаров¹, О.А. Бочарова¹, Р.В. Карпова¹, В.Г. Кучеряну², И.В. Казеев¹,
Е.С. Иноземцева¹, Ю.М. Соловьев¹, З.С. Шпрах¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;
Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Регина Васильевна Карпова planta39@rambler.ru

Цель исследования. Изучение значимости коррекции экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, а также сывороточного уровня цитокинов интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) при профилактическом воздействии мультифитоадаптогена (МФА) в жидкой форме для снижения уровня спонтанных гепатокарцином и увеличения продолжительности жизни высококорковых мышей СВА.

Материалы и методы. Объект исследования — мыши-самцы высококорковой инбредной линии СВА (сублиния СВА/LacY). Опытные животные получали 10 % раствор МФА с питьевой водой в течение 1-го месяца постнатального онтогенеза, включая завершающий период дифференцировки ткани печени (профилактическое воздействие). В работе использовано 439 мышей. МФА — стандартизованный препарат, включает компоненты 40 растительных экстрактов, в том числе адаптогенов женьшеня, элеутерококка, родиолы розовой, а также соединения фенольной природы (флавоноиды, тритерпеновые гликозиды и др). Обладает антимутагенными, антиоксидантными, иммуномодулирующими свойствами. В возрасте 4, 8, 22 мес определяли экспрессию CD11a и CD11b антигенов на клетках периферической крови в реакции непрямой иммунофлуоресценции, сывороточный уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 иммуноферментным методом, анализировали морфологию ткани печени мышей СВА. Частоту возникновения и объем опухолей определяли в возрасте 8 и 22 мес. В позднем онтогенезе оценивали двигательную активность, соматический статус животных (массу тела, состояние шерстного покрова). Среднюю продолжительность жизни животных и медиану выживаемости определяли методом Каплана—Майера. Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0.

Результаты. При спонтанном гепатоканцерогенезе у мышей было выявлено снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови параллельно с возрастанием сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, высокой частотой возникновения опухолей (100 %), увеличением их количества и размеров, а также средней продолжительностью жизни, не достигающей 2 лет. Выраженной инфильтрации лейкоцитами опухолей при этом не наблюдали. Профилактическое воздействие МФА в жидкой форме в течение 1-го месяца постнатального онтогенеза, захватывая завершающий период дифференцировки ткани, предрасположенной к возникновению опухолей, приводит к долговременному усилению экспрессии молекул гетеротипической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и клеток-мишеней. Последнее может способствовать повышению активности противоопухолевых реакций иммунитета при наблюдаемой нами инфильтрации спонтанных гепатокарцином лимфоцитами, а также деструкции опухолевой ткани. В результате получено снижение частоты возникновения, количества и размеров наследственных опухолей, а также повышение выживаемости и качества жизни животных.

Заключение. Усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови, снижение сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, сопровождающееся признаками лимфоцитарной инфильтрации и деструкции опухолевых узлов, при профилактическом воздействии МФА может иметь значение для подавления возникновения опухолей, повышения продолжительности и качества жизни высококорковых животных.

Ключевые слова: профилактика рака, гепатокарциномы, лейкоцитарные интегрины, опухоль-инфильтрирующие лимфоциты, фитоадаптогены

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-78-87

IMMUNOADHESIVE REGULATION USING MULTIPHYTOADAPTOGENE FOR SPONTANEOUS HEPATOCARCINOMAS PREVENTION

E. V. Bocharov¹, O. A. Bocharova¹, R. V. Karpova¹, V. G. Kucheryanu², I. V. Kazeev¹, E. S. Inozemceva¹, Y. N. Soloviev¹, Z. S. Shprakh¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²Institute of General Pathology and Patophysiology; 8 Baltiyskaya St., 125315 Moscow, Russia

The purpose of this investigation was to evaluate the efficacy of correcting the LFA-1 and Mac-1 leukocyte integrins expression on peripheral blood cells as well as IL-6 and IL-10 serum levels using liquid form multiphytoadaptogene preventive application for hepatocarcinomas incidence suppression and life-span increase of CBA inbred mice.

Materials and methods. The study was carried out on 439 males of inbred CBA mouse strain (subline CBA/LacY). The experimental mice received 10 % liquid form multiphytoadaptogene complex (MPAC) solution in drinking water during the first month of life including the final time period of liver differentiation (preventive administration). MPAC is the standardized herbal formula composed of 40 plant extracts components including adaptogenes *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea*, as well as compounds with phenolic structure (flavonoids, triterpene glycosides, etc). Anti-mutagenic, anti-oxidant, immunomodifying activities of MPAC were demonstrated. The CD11a and CD11b antigens expressions on peripheral blood cells were analyzed by indirect immunofluorescence reaction, serum cytokines IL-6 and IL-10 concentrations were determined by enzyme-linked immunosorbent assay as well as the liver tissue morphology were analyzed at the age of 4, 8, 22 months. Tumor incidence and volumes were evaluated at the age of 8 and 22 months. Motor activity and physical status (body weight, coat state) were estimated in the ontogenesis. The average life-span and survival median was analyzed by the Kaplan–Meier method. Statistical analysis was performed with the program STATISTICA 6.0.

Results. Inhibited expression of LFA-1 and Mac-1 leukocyte integrins on peripheral blood cells as well as elevated IL-6 and IL-10 serum levels, high incidence of liver tumors (100 % of mice-males), their high number and big sizes in the late period of postnatal ontogenesis in CBA high-cancer inbrede mice, also as life-span not reaching two years was demonstrated. At the same time plural tumor-infiltrating lymphocytes were not found. Short-term MPAC preventive administration (during the first month of mouse life occupying the final differentiation period of liver tissue genetically predisposal to hepatomas incidence) revealed the long-term heterotypic adhesion molecules leukocyte integrins LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) up-regulated expression, providing the contact interactions of immune effectors and cancer cells. The events shown is able to enhance the anti-tumor activity of immune reactions including spontaneous hepatocarcinomas lymphocytes infiltration and destruction of tumor tissue. As a result, the hereditary tumors incidence, their number and sizes were reduced as well as life-span and life quality of animals were improved.

Conclusion. Up-regulated leukocyte integrins expression on peripheral blood cells, reduced IL-6 and IL-10 serum levels accompanied by tumors lymphocyte infiltration and destruction using MPAC preventive administration is essential for tumor incidence down-regulation. The herbal formula with multiple components is capable to control anti-tumor immune reactions, as well as the life-span and life quality of high-cancer animals. Hence, the regulation of adhesion violations involved in tumor incidence can be cancer preventive.

Key words: cancer prevention, hepatocarcinomas, leukocyte integrins, tumor-infiltrating lymphocytes, phytoadaptogene

Введение

На современном этапе развития медико-биологической науки все большее значение приобретает разработка подходов профилактики на различных этапах развития опухолей: канцерогенеза, метастазирования, рецидивирования. Активно исследуются нетоксичные природные средства, обладающие комплексным характером действия, в частности фитоадаптогены.

Известно, что растения, относящиеся к этому классу (женьшень, элеутерококк, аралия, родиола розовая и др.), имеют широкий спектр защитного влияния на организм, что важно для первичной профилактики рака, являются антимутагенами, усиливая корректорную активность ДНК-полимеразы [1, 2], обладают антиоксидантными свойствами, снижая образование токсичных продуктов перекисного окисления липидов [3, 4], являются выраженными иммуномодуляторами [5, 6].

Профилактическое воздействие фитоадаптогенов в отношении опухолеобразования может быть направлено на регуляцию адгезионных межклеточных взаимодействий, нарушение которых признается ключевым механизмом опухолевого процесса [7, 8].

Ранее было установлено, что устойчивость эпителиальных тканей к наследственному опухолеобразованию обеспечивается усилением межклеточной интеграции соответствующей ткани на заключительном этапе ее дифференцировки в раннем постна-

тальном онтогенезе. В эпителиальных тканях, predisposed к опухолям, усиления взаимной адгезивности клеток в критический период не происходит [9].

Значение этого явления для частоты спонтанного опухолеобразования было показано на высококачественных линиях мышей с помощью как эндогенного тканеспецифического адгезионного фактора – контактина, так и неспецифического – экстракта родиолы розовой. При введении животным указанных агентов в раннем постнатальном развитии с захватом этапа завершения дифференцировки соответствующей ткани взаимная адгезивность клеток ткани-мишени долговременно повышалась, частота спонтанных опухолей существенно снижалась [9–11]. При этом отмечено усиление функциональной активности Т-лимфоцитов. Вместе с тем применение экстракта родиолы розовой позже, на этапе созревания тимуса (с 2 до 3 мес) или в начальный период образования спонтанных гепатокарцином (с 7 до 8 мес), у мышей-самцов линии СВА не оказывало долговременного повышения указанных показателей. Частота наследственного опухолеобразования не отличалась от контрольных значений, а размеры опухолей у высокогепатомных мышей в возрасте 12–13 мес при этом сократились, т. е. скорость их роста замедлилась [11].

С точки зрения сочетанных воздействий практическое применение в профилактической онкологии могут найти не монопрепараты, а фитокомплексы на их основе, что позволяет решить проблему преодоления индивидуальной резистентности к отдельным адаптогенам [12].

Мультифитоадаптоген (МФА) представляет собой композицию на основе компонентов экстрактов 40 растений, в том числе фитоадаптогенов, таких как женьшень, элеутерококк, родиола розовая и др. Современными физико-химическими методами в МФА определены биологически активные вещества: три-терпеновые сапонины (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, салидрозид, глицирризиновая кислота), флавоноиды (гиперозид, рутин, нарингенин, кверцетин, лютеолин, апигенин), эфирные соединения, аминокислоты, витамины [13, 14].

Ранее в эксперименте *in vitro* был показан анти-мутагенный эффект МФА — уменьшение уровня спонтанных и индуцированных мутаций в клетках дрожжей *S. cerevisiae* [15]. Вместе с тем выявлено снижение частоты хромосомных обменов в лимфоцитах крови пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы в результате применения МФА [16]. Определены антиоксидантные, антистрессорные, гормонотормозяющие, противоопухолевые и иммуномодулирующие, в том числе адгезиогенные и интерферогенные, свойства МФА [17–20].

Следует отметить, что профилактические в отношении опухолей эффекты препаратов корректно выявлять либо при лечебном воздействии на предраковое заболевание, либо учитывая превентивное действие на спонтанное опухолеобразование у линейных животных. В предыдущих исследованиях уже был выявлен лечебный эффект МФА в отношении предракового заболевания — лейкоплакии слизистой оболочки полости рта [17].

Для изучения спонтанного гепатоканцерогенеза наиболее широко применяется инбредная линия мышей СВА. У самцов этой линии гепатоканциномы начинают возникать с 6-месячного возраста, а в возрасте 18–22 мес определяются в 100 % случаев [21, 22].

Целью данного исследования стало изучение значимости коррекции экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови, а также сывороточного уровня цитокинов интерлейкина-6 (ИЛ-6) и интерлейкина-10 (ИЛ-10) при профилактическом воздействии МФА для снижения уровня спонтанных гепатоканцином и увеличения продолжительности жизни высококорактовых мышей СВА.

Материалы и методы

В исследование были включены опытная группа ($n = 151$) и 2 контрольные группы (I группа — 198, II группа — 90) мышей-самцов высококорактовой линии

СВА (сублиния СВА/LacY). Источник получения мышей: экспериментально-биологическая лаборатория ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. МФА получали самки начиная с последних сроков беременности до отъема детенышей в возрасте 3 нед. Затем 1 нед детеныши-самцы пили воду с препаратом самостоятельно. Таким образом, опытные животные получали 10 % раствор МФА с питьевой водой в течение 1-го месяца постнатального развития, включая период завершения дифференцировки нормальной ткани печени (7–15-й день постнатального онтогенеза). Мыши I контрольной группы получали в качестве питья воду. Поскольку препарат является водно-спиртовым экстрактом, мыши II контрольной группы получали 3 % раствор этанола в воде (что соответствует концентрации этанола в получаемом животными препарате). Результаты определения изучаемых параметров в обеих контрольных группах не имели достоверных различий, поэтому мыши этих групп были объединены в 1 контрольную группу ($n = 288$). Всего в исследовании использовали 439 мышей.

Мышей (по 10–22 из каждой группы) выводили из эксперимента в возрасте 4, 8, 22 мес. Определяли экспрессию лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18) на клетках крови животных (иммунофлуоресцентным методом), сывороточный уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 (иммуноферментным методом), массу тела животных. В среднем (8 мес) и позднем (22 мес) онтогенезе оценивали частоту опухолеобразования и размеры гепатоканцином. Вместе с тем в позднем онтогенезе оценивали двигательную (поведенческую) активность животных, а также число мышей с признаками алопеции. Двигательную активность определяли, используя тест «открытого поля» в автоматическом режиме с помощью системы Opto-Varimex-3. Печень контрольных и опытных животных, помимо макроскопического исследования, подвергали гистологической обработке по стандартной методике и окрашиванию гематоксилином-эозином. Макроскопической ревизии подвергали и другие органы животных. Объем опухолей (мм^3) вычисляли стандартным методом. Среднюю продолжительность жизни (СПЖ) и медиану выживаемости определяли по методу Каплана–Мейера с оценкой достоверности различий между группами по критерию F-Кокса.

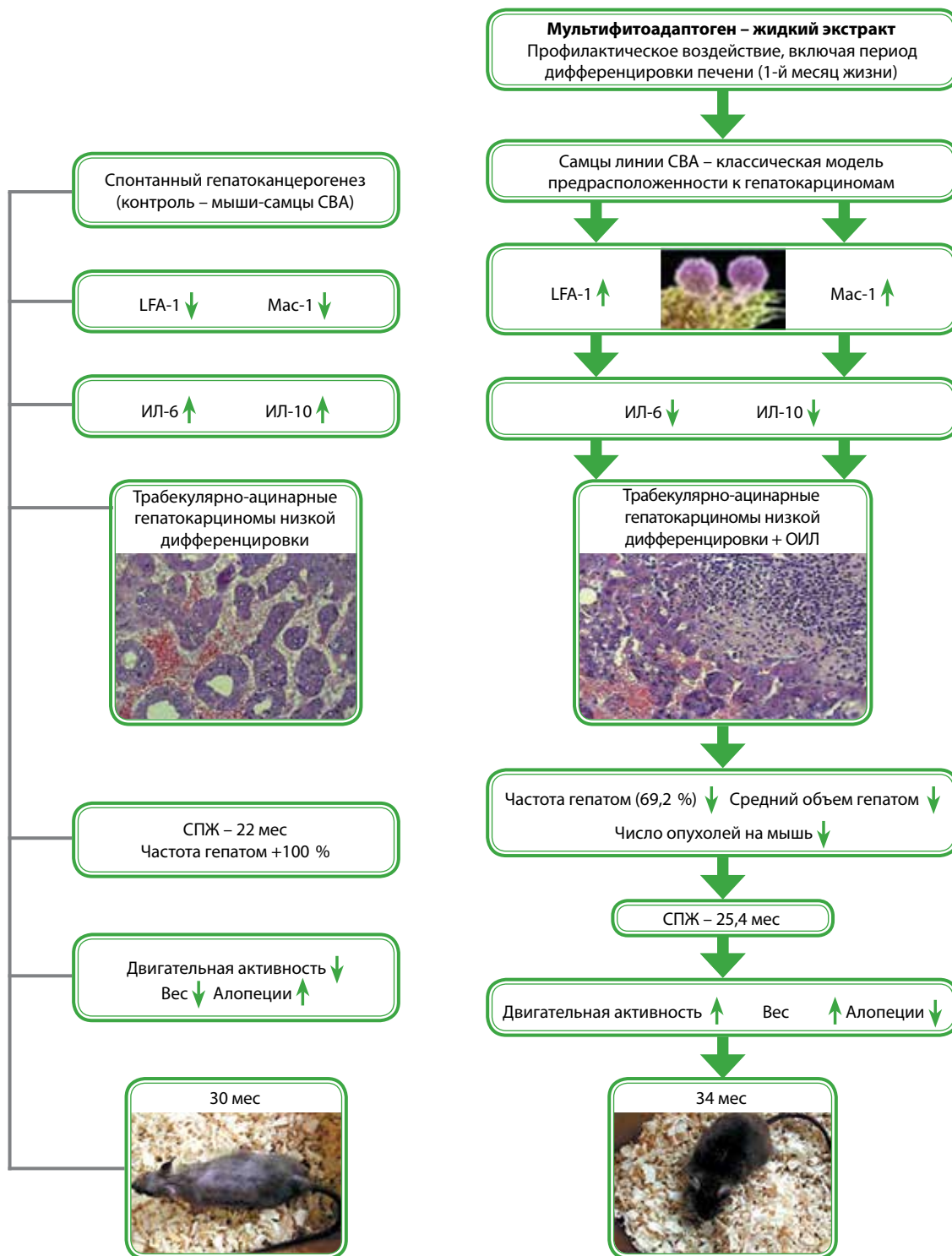
Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0, применяя дисперсионный анализ ONE-WAY ANOVA с последующей оценкой достоверности различий по критерию Ньюмена–Кейлса.

Результаты

В данной статье обобщены иммунобиологические подходы профилактики спонтанного опухолеобразования у мышей высокораковой линии СВА

на примере нетоксичного воздействия МФА в раннем постнатальном онтогенезе (см. рисунок).

В результате исследования было показано, что у 10 % мышей-самцов СВА в возрасте 8 мес возникли



Коррекция иммунобиологических реакций мультифитоадаптогеном при спонтанном гепатоканцерогенезе. ИЛ-6 – интерлейкин-6; ИЛ-10 – интерлейкин-10; СПЖ – средняя продолжительность жизни; ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

опухоли, по морфологическому строению представляющие собой трабекулярные гепатокарциномы умеренной дифференцировки. Начиная с этого периода опухолевая прогрессия сопровождалась снижением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и опухолевых клеток. Вместе с тем в сыворотке крови животных определен повышенный уровень цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10. В позднем онтогенезе (22 мес) низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы были выявлены у всех животных, т. е. в 100 % случаев. При этом инфильтрации лейкоцитами опухолей печени не выявлено [23–25].

В процессе опухолеобразования у животных отмечалась потеря массы тела, т. е. в той или иной степени были выражены кахектические явления, которые сопровождались нарушением шерстного покрова в виде алопечий [26]. Кахексия животных, вероятно, связана как с возрастными изменениями, так и с наличием опухолевого процесса. Вместе с тем в патогенезе кахексии может участвовать и повышенный сывороточный уровень ИЛ-6 и ИЛ-10, способствуя увеличению С-реактивного белка и расщеплению мышечных белков [27, 28].

На фоне спонтанного гепатоканцерогенеза у животных также происходило снижение двигательной (поведенческой) активности. СПЖ мышей СВА в данном случае не достигла 2-летнего возраста (21,7 мес, или 672 дня), медиана выживаемости составила 20,7 мес (или 631 день) [26].

Кратковременное профилактическое воздействие МФА в течение 1-го месяца постнатального онтогенеза обеспечило длительный по времени эффект повышения экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови мышей опытной группы, а также снижение сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 по сравнению с контрольными животными [23]. В возрасте 8 мес макро- и микроскопически гепатомы не были определены ни у одного из исследованных животных. В позднем онтогенезе (22 мес) опухоли были выявлены у 69,2 % мышей, т. е. частота наследственного опухолеобразования снизилась на 31 % по сравнению с контролем. При этом отмечено уменьшение числа опухолей и объема опухолевой массы на 1 животное [24]. Выявлена инфильтрация активированными лимфоцитами трабекулярно-ацинарных гепатокарцином. В опухолевой ткани также выражены деструктивные признаки [25]. Соматическое состояние старых мышей СВА при профилактическом воздействии МФА было удовлетворительным — без признаков похудения и алопечий. Двигательная активность опытных мышей была выше, чем в контрольной группе [26].

В итоге СПЖ высокоракковых мышей под воздействием МФА увеличилась на 17,1 % (до 25,4 мес, или 775 дней). Медиана выживаемости увеличилась на 25,6 % (до 26 мес, или 793 дней). Вместе с тем ни одно животное контрольной группы не пережило 1000 дней (около 33 мес), в то время как при воздействии МФА указанный срок пережили 2 мыши. Самый высокий показатель выживаемости в данном случае составил 1038 дней (34 мес и 4 дня), что соответствует примерно 98 человеческим годам по сравнению с 60 годами при экстраполяции на человека возраста контрольных мышей. Эти результаты, вероятно, имеют значение, если принять во внимание тот факт, что при этом определен противоопухолевый эффект.

Учитывая результаты настоящего исследования, можно полагать, что у высокоракковых мышей при спонтанном гепатоканцерогенезе на иммунных эффекторах, в том числе на Т-лимфоцитах, НК-клетках и других снижена экспрессия лигандов из семейства интегринов для соответствующих гистонеспецифических молекул гомотипической адгезии (ICAM 1–2), которые находятся в дефиците на опухолевых клетках [29]. Последнее, вероятно, является следствием недостатка гистоспецифических факторов адгезии, связанного с нарушением регуляции процессов деления и дифференцировки ткани-мишени [30].

В результате в том числе нарушается рецепторный ансамбль, отвечающий за взаимодействие с опухолевыми клетками-мишенями. Вместе с тем особенности ингибирования цитолитических потенций иммунных эффекторов связаны с изменением уровня ряда цитокинов [31, 32]. Действительно, выявленному в позднем онтогенезе мышей СВА снижению экспрессии молекул LFA-1 и Mac-1 сопутствует повышение, в частности, сывороточного содержания ИЛ-6 и ИЛ-10. Вероятно, возросшее содержание ИЛ-6 усиливает образование антител, экранирующих антигены опухолевых клеток [33]. Наряду с этим повышение уровня ИЛ-10 может активировать еще больший рост содержания ИЛ-6, подавлять экспрессию молекул адгезии ICAM-1 на клетках ткани-мишени, синтез цитотоксических реактивных интермедиатов кислорода и азота, а также продукцию гамма-интерферона, интерлейкина-2, интерлейкина-12 и факторов некроза опухоли, в том числе Т-лимфоцитами, дендритными клетками, НК-клетками и др. [34]. Все эти события способствуют блокированию иммунореактивности в отношении опухоли. В результате можно объяснить в том числе наличие множественных низкодифференцированных трабекулярно-ацинарных гепатокарцином у этих мышей.

Воздействие МФА, вероятно, устраняет дефицит гистоспецифических факторов адгезии, восстанавливает регуляцию пролиферативных процессов, что

может приводить к снижению частоты возникновения спонтанных гепатом на 31 %. Вместе с тем нормализация гистоспецифических факторов адгезии может способствовать коррекции экспрессии молекул адгезии ICAM-1 на клетках-мишенях и, следовательно, их контррецепторов – лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета. Кроме того, продемонстрированное снижение сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 способствует подавлению усиленного образования антител, которые могут экранировать антигены опухолевых клеток, тем самым уменьшая защиту последних от разрушения иммунными эффекторами, в частности при спонтанном гепатоканцерогенезе. Воздействие МФА в данном исследовании снимало блокирование иммунологического надзора в отношении опухолей [35]. В результате было выявлено достоверное снижение числа опухолей ($1,0 \pm 0,3$) и объема опухолевой массы на мышь ($268 \pm 82 \text{ мм}^3$) по сравнению с контролем ($2,7 \pm 3$, $p \leq 0,001$ и $1044 \pm 193 \text{ мм}^3$, $p \leq 0,05$ соответственно) [24].

Вместе с тем снижение сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, определенное параллельно с более высокой массой опытных животных в позднем онтогенезе, может негативно регулировать патогенез какехсии животных, снижая сывороточный уровень С-реактивного белка и предупреждая при этом расщепление мышечных белков [27, 28].

Также уменьшение содержания ИЛ-6 сочетается с полноценным шерстным покровом животных опытной группы в результате стимуляции функциональной активности волосяных фолликулов при подавлении воспалительного процесса в кожном покрове [36].

Усиление экспрессии лейкоцитарных интегринов (в том числе LFA-1 и Mac-1) способствует миграции, накоплению лимфоцитов в патологическом очаге и обеспечивает контактное взаимодействие эффекторов иммунитета с клетками-мишенями. При этом в клетки опухоли активно проникают факторы разрушения, в том числе протеиназы, лимфотоксины и реактивные интермедиаты кислорода, азота, водорода. Также возможен несекреторный лизис опухолевых клеток при активации на них FasAPO1 или CD95-антигена (члена семейства факторов некроза опухоли) – рецептора, запускающего механизм апоптоза клетки. В этом процессе участвуют каспазы (цистеин/аспартат протеиназы), которые расщепляют клеточные белки, что в конечном итоге приводит к фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты и гибели клетки. Все эти процессы могут иметь значение при восстановлении иммунореактивности в отношении опухолевых клеток при новообразованиях [37, 38].

Очевидно, иммуноадгезионные реакции имеют значение для подавления возникновения и прогрес-

сии спонтанных гепатокарцином, а также, соответственно, повышения выживаемости и улучшения соматического состояния животных.

Сопоставляя полученные результаты по увеличению продолжительности жизни экспериментальных мышей с данными других исследователей, можно отметить их значимость. В основном большинстве исследователи пытаются продлить жизнь мышам, используя низкокалорийную диету. Однако в этих исследованиях продление жизни зафиксировано у мышей без опухолевых патологий [39].

Вместе с тем нашей работе ближе результаты, полученные при введении скрещенным инбредным мышам (C57Bl/6 × BALB/c) антибиотика рапамицина. Рапамицин, вводимый в пищу мышам начиная с возраста 270 и 600 дней, приводил к увеличению выживаемости на 14 % у самок и 9 % у самцов, замедляя рост опухолей, процессы старения, либо то и другое у мышей, предрасположенных к развитию опухолей. Известно, что рапамицин и низкокалорийная диета подавляют TOR-сигнальный путь, в том числе рапамицикиназу, и увеличивают таким образом выживаемость беспозвоночных, включая дрожжи, нематоды и дрозофилы. Низкокалорийная диета для продления жизни может применяться только начиная с раннего онтогенеза. Иначе выживаемость не увеличивается. Низкокалорийная диета также вызывает снижение веса животного. Рапамицин может продлевать жизнь без снижения веса животных, если его применять и в среднем, и в позднем онтогенезе. Однако рапамицин имеет побочные эффекты, являясь иммуносупрессором [40, 41]. Поэтому проводить испытания с рапамицином в качестве предполагаемого геропротектора на человеческом контингенте не представляется возможным.

Мы продемонстрировали, что МФА, который является нетоксичным препаратом широкого спектра действия, применяемый в раннем онтогенезе, увеличивал выживаемость мышей, повышал вес животных и оказывал иммуномодулирующее действие, не обладая побочными эффектами. Это отличает наши результаты от таковых с рапамицином и низкокалорийной диетой.

Вместе с тем коррекция клинической симптоматики и иммунобиологических показателей при спонтанном гепатоканцерогенезе линейных мышей-самцов линии СВА в значительной степени связана с разносторонним характером действия МФА, а именно с его антимуtagenной, антистрессорной, антиоксидантной, гормонотомулирующей, противоопухолевой и иммуномодулирующей, в том числе адгезиогенной и интерферонотомной, активностью, выявленной ранее [11, 17–19, 42, 43].

Можно полагать, что профилактический эффект МФА в отношении опухолей может быть связан

с тем, что в состав препарата входят соединения фенольной природы, в том числе флавоноиды, фенологликозиды, тритерпеновые гликозиды (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, салидрозид, гиперозид, нарингенин, кверцетин, розавин, рутин, розиридин, родионин, схизандрин, схизантерин, стипулеанозид, лютеолин, апигенин, арбутин, урсоловая кислота, олеаноловая кислота, глицирризиновая кислота и др.) [13, 14]. С учетом того, что в качестве узкобороздочных лигандов последние могут оказывать прямое или опосредованное действие на процессы репарации ДНК, проявляя антиканцерогенные эффекты, данные соединения могут быть эффективными в составе препаратов для профилактики рака [44, 45].

Тем не менее следует принять во внимание, что многие из этих соединений, в том числе тритерпеновые гликозиды (гинзенозиды, элеутерозиды, глицирризиновая кислота и др.) способны атаковать мультирецепторные системы плазматических мембран, так же как и активировать внутриклеточные стероидные рецепторы. Это обусловлено структурной и функциональной связью этих соединений со стероидами. Например, многие из них принадлежат к семейству стероидных сапонинов [46, 47]. Последние благодаря своей структуре имеют множество физиологических активностей. Например, стероидный скелет обеспечивает способность молекулы встраиваться в плазматические мембраны. Также стероиды могут связывать ядерные рецепторы, действуя непосредственно на транскрипцию мРНК и, соответственно, на синтез белка [48], являются индукторами дифференцировки, корректорами гомо- и гетеротипических адгезионных взаимодействий, сочетая противоопухолевые эффекты с усилением резистентности здоровых тканей к повреждению [49–51], обладают антипролиферативной активностью и повышенной индукцией апоптоза в отношении клеток опухоли [52].

Следовательно, разносторонний характер действия МФА, обеспечивая сочетанное влияние на патогенетические механизмы и коррекцию разных звеньев патологической системы при возникновении опухолей и процессах старения, вероятно, позволяет потенцировать профилактический эффект, что может соответствовать принципу комплексных патогенетических воздействий.

Таким образом, при спонтанном гепатоканцерогенезе у мышей было выявлено снижение экспрессии лейкоцитарных интегринов параллельно с возрастанием сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10, высокой частотой возникновения опухолей (100 %), увеличением их количества и размеров, а также СПЖ, не достигающей 2-летнего возраста. Выраженной инфильтрации лейкоцитами опухолей при этом не наблюдали.

Кратковременное введение МФА с адгезиогенным действием, захватывая завершающий период дифференцировки ткани печени, предрасположенной к возникновению гепатокарцином, приводит к долговременному усилению экспрессии молекул гетеротипической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и клеток-мишеней. Последнее может способствовать повышению активности противоопухолевых реакций иммунитета при инфильтрации спонтанных гепатокарцином активированными лимфоцитами и деструкции опухолевой ткани. В результате получено снижение частоты возникновения, количества и размеров наследственных опухолей, а также повышение выживаемости и качества жизни животных.

Изменение экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов LFA и Mac-1 на поверхности иммунных эффекторов может обеспечиваться коррекцией их контррецепторов – гистонеспецифических молекул адгезии на опухолевых клетках (ICAM), регуляцию которых, в свою очередь, могут осуществлять гистоспецифические факторы клеточных контактов, способствующие нормализации гомотипической межклеточной адгезии и устранению нарушений пролиферации и дифференцировки ткани печени. Таким образом, может происходить восстановление регуляции гетеротипических адгезионных взаимодействий с помощью молекул из семейства ICAM с их лигандами – лейкоцитарными интегринными, обуславливающими прикрепление иммунных эффекторов к клеткам опухоли, способствуя элиминации последних.

Выводы

Воздействие МФА в раннем онтогенезе, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени, снижало уровень спонтанных гепатокарцином на 31 %, увеличивало продолжительность жизни мышей-самцов высокоракетной линии СВА на 17,1 % и медиану выживаемости на 25,6 % по сравнению с контрольными животными.

Лучшую выживаемость мышей-самцов линии СВА, получавших МФА профилактически, сопровождала удовлетворительная двигательная активность без признаков похудения и алопеций.

Коррекция экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета и сывороточного уровня цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 при профилактическом воздействии нетоксичного МФА может иметь значение для повышения цитолитических потенциалов иммунной системы в отношении опухолей.

Инфильтрация спонтанных гепатокарцином лимфоцитами может способствовать усилению

противоопухолевых реакций иммунитета, а также повышению продолжительности и качества жизни животных.

Учитывая профилактическое действие МФА в жидкой форме при развитии спонтанных гепатокарцином у высокоракковых мышей СВА, его лечебный эффект при лейкоплакии слизистой оболочки полости рта у людей, антимутагенные и антиокси-

дантные свойства, можно полагать, что дальнейшие исследования препарата, содержащего соединения фенольной природы (флавоноиды, тритерпеновые гликозиды и др.), могут быть перспективными при создании нетоксичных лекарств-геропротекторов для эффективной профилактики и лечения новообразований, возрастных патологий, а также для увеличения продолжительности жизни человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hassan A.M., Abdel-Aziem S.H., El-Nekeety A.A., Abdel-Wahhab M.A. Panax ginseng extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1. *Cytotechnology* 2015;67(5):861–71. DOI: 10.1007/s10616-014-9726-z. PMID: 24748134.
- Panwar M., Kumar M., Samarth R., Kumar A. Evaluation of chemopreventive action and antimutagenic effect of the standardized Panax ginseng extract, EFLA400, in Swiss albino mice. *Phytother Res* 2005;19(1):65–71. DOI: 10.1002/ptr.1584. PMID: 15799001.
- Xie J.T., Shao Z.H., Vanden Hoek T.L. et al. Antioxidant effects of ginsenoside Re in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2006;532(3):201–7. PMID: 16497296.
- Kim N.D., Pokharel Y.R., Kang K.W. Ginsenoside Rd enhances glutathione levels in H4IIE cells via NF-kappaB-dependent gamma-glutamylcysteine ligase induction. *Pharmazie* 2007;62(12):933–6. PMID: 18214346.
- Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растения в комплексной терапии опухолей. М.: Изд-во РАМН, 2008. 432 с. [Goldberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P. et al. Plants in complex therapy of tumors. M.: Izdatel'stvo RAMN = RAMS publishing house, 2008. 432 p. (In Russ.)].
- Jin Y., Kotakadi V.S., Ying L. et al. American ginseng suppresses inflammation and DNA damage associated with mouse colitis. *Carcinogenesis* 2008;29(12):2351–9. DOI: 10.1093/carcin/bgn211. PMID: 18802031.
- Бочарова О.А. Адгезионная концепция в биологии злокачественного роста. Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2014;2:87–90. [Bocharova O.A. Adhesive concept in biology of malignant growth. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimentalnaya terapiya* = Pathological Physiology and Experimental Therapy 2014;2:87–90 (In Russ.)].
- Allen S., Moran N. Cell Adhesion Molecules: Therapeutic Targets for Inhibition of Inflammatory States. *Semin Thromb Hemost* 2015;41(6):563–71. DOI: 10.1055/s-0035-1556588. PMID: 26322694.
- Бочарова О.А., Модянова Е.А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онтогенезе у мышей инбредных линий с высокой и низкой частотой спонтанных гепатом. Онтогенез 1982;13(4):427–29. [Bocharova O.A., Modyanova E.A. Hepatocyte cell-cell contacts alterations during ontogenesis of inbred strains of mice with high and low frequency of spontaneous hepatomas. *Ontogenesis* 1982;13(4):427–29 (In Russ.)].
- Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линейных мышей. Экспериментальная онкология 1983;5(3):39–42. [Modyanova E.A., Bocharova O.A., Malenkov A.G. The kontaktins-chalones preventive action on spontaneous carcinogenesis in mice inbred strains. *Ehksperimentalnaya onkologiya* = Experimental oncology 1983;5(3):39–42 (In Russ.)].
- Бочарова О.А., Серебрякова Р.В., Бодрова Н.Б. Профилактический эффект *Rhodiola rosea* на спонтанное опухолеобразование в печени на модели высокоракковой линии мышей. Вестник РАМН 1994;5:41–3. [Bocharova O.A., Serebryakova R.V., Bodrova N.B. *Rhodiola rosea* preventive effect on spontaneous tumorigenesis in the liver in high-cancer inbred mice. *Vestnik RAMN* = Bulletin of RAMS 1994;5:41–3 (In Russ.)].
- Zhang H.M., Chen S.W., Xie C.G. Effects and mechanism of ShenQi compound recipe on inflammation marker in GK rats. *Zhong Yao Cai* 2006;29(3):249–53. PMID: 16850723.
- Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2012;10:52–9. [Shejchenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Study of complex phytoadaptogen by HPLC method. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmstsevticheskoy khimii* = Connected Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2012;10:52–9 (In Russ.)].
- Карпова Р.В., Шевченко В.Е., Бочаров Е.В. и др. Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):36–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-00-00. [Karpova R.V., Shevchenko V.E., Bocharov E.V. et al. Possibility of using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for qualitative and quantitative determination of biologically active substances in the ginseng phytoextracts. *Rossysky bioterapevtichesky zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(2):36–46. (In Russ.)].
- Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. Генетика 2013;49(12):1364–69. [Kurenay O.N., Karpova R.V., Bocharova O.P. et al. Multiphytoadaptogen antimutagenesis in yeast cells of *Saccharomyces*. *Genetika* = Russian Journal of Genetics 2013;49(12):1364–69. (In Russ.)].
- Бочков Н.П., Бочарова О.А., Аксенов А.А. и др. Частота хромосом-

- ных aberrаций в лимфоцитах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы. Медицинская генетика 2005;4(1):15–9. [Bochkov N.P., Bocharova O.A., Aksyonov A.A. et al. The frequency of chromosomal aberrations in lymphocytes of patients with benign prostatic hyperplasia. *Meditinskaya genetika* = *Medical Genetics* 2005;4(1):15–9 (In Russ.)].
17. Пожарицкая М.М., Бочарова О.А., Чекалина Т.Л., Воронин В.Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. Методическое пособие для врачей. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2004. 46 с. [Pozharitskaya M.M., Bocharova O.A., Chekalina T.L., Voronin V.F. Modern aspects of pathogenesis and treatment of the oral mucosa leukoplakia. *Methodological manual for doctors*. M.: GOU VUNMTs, 2004. 46 p. (In Russ.)].
 18. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Карпова Р.В. и др. Коррекция клинических и иммунобиологических показателей у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы фитоадаптогеном. БЭБиМ 2006;141(5):555–59. [Bocharova O.A., Matveev V.B., Karpova R.V. et al. Correction of immunological and clinical parameters in men with benign prostatic hyperplasia by phytoadaptogen. *BEhBiM* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2006;141(5):555–59 (In Russ.)].
 19. Чулкова С.В., Бочарова О.А., Клименков А.А. и др. Возможности повышения эффективности комплексного лечения распространенного рака желудка фитоадаптогеном. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(2):85–92. [Chulkova S.V., Bocharova O.A., Klimenkov A.A. et al. Possibilities of increasing the effectiveness of integrated treatment of advanced gastric cancer by phytoadaptogen. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2006;5(2):85–92 (In Russ.)].
 20. Хаиндрава В.Г., Козина Е.А., Кудрин В.С. и др. Экспериментальное моделирование клинической и преклинической стадий болезни Паркинсона. БЭБиМ 2010;150(11):495–98. [Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kudrin V.S. et al. Experimental modeling of clinical and preclinical stages of Parkinson's disease. *BEhBiM* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2010;150(11):495–98. (In Russ.)].
 21. Sharp J., Riches A., Littlewood V., Thomas D. The incidence, pathology and transplantation of hepatomas in CBA mice. *J Pathol* 1976;119(4):211–20. DOI: 10.1002/path.1711190405. PMID: 182943.
 22. Модянова Е.А., Бочарова О.А., Ушаков В.Ф. Механические свойства межклеточных контактов гепатоцитов у мышей инбредных линий и предрасположенность к спонтанному гепатомам. БЭБиМ 1980;89(4):459–62. [Modyanova E.A., Bocharova O.A., Ushakov V.F. The mechanical properties of hepatocytes cell-cell contacts in mice inbred strains and susceptibility to spontaneous hepatomas. *BEhBiM* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1980;89(4):459–62 (In Russ.)].
 23. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрины при гепатоканцерогенезе мышей высокоракетной линии СВА. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(3):53–6. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Ilyenko V.A. et al. Leukocyte integrins at hepato carcinogenesis in high-cancer CBA strain of mice. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2013;12(3):53–6 (In Russ.)].
 24. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракетных мышей СВА. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):73–6. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Reduced occurrence of hepatomas in phytoadaptogen exposed high-cancer CBA strain of mice. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2014;13(2):73–6 (In Russ.)].
 25. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Вершинская А.А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высокоракетной линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):85–90. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Verzhinskaya A.A. et al. Hepatocarcinomas infiltration lymphocytes in high-cancer CBA mice when multiphytoadaptogen exposed in early postnatal ontogenesis. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(2):85–90 (In Russ.)].
 26. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Воздействие мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе, улучшающее выживаемость и соматическое состояние мышечной высокоракетной линии. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):76–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-76-81. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogen effect in early postnatal ontogenesis improves survival and mice somatic condition of high-cancer CBA strain of mice. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(1):76–81 (In Russ.)].
 27. Deans D., Tan B., Ross J. et al. Cancer cachexia is associated with the IL10–1082 gene promoter polymorphism in patients with gastroesophageal malignancy. *Am J Clin Nutr* 2009;89(4):1164–72. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27025. PMID: 19244371.
 28. Kim D., Oh S., Kwon H. et al. Clinical significance of preoperative serum interleukin-6 and C-reactive protein level in operable gastric cancer. *BMC Cancer* 2009;20(9):155–61. DOI: 10.1186/1471-2407-9-155. PMID: 19457231.
 29. Spizzo G., Went P., Dirnhofer S. et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103(2):483–8. PMID: 16678891.
 30. Heidemann J., Maaser C., Ljgering A. et al. Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (CD 106) in normal and neoplastic human Esophageal squamous epithelium. *Int J Oncol* 2006;28(1):777–85. PMID: 16327982.
 31. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. Физиология естественных киллеров. М.: Медицина, 2005. 455 с. [Sepiashvili R.I., Balmasova I.P. *Physiology of natural killer*. Moscow: Meditsina, 2005. 455 p. (In Russ.)].
 32. Fillon M. Biomarkers and prostate cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(21):1570–71. DOI: 10.1093/jnci/djr444. PMID: 22010173.
 33. Jones S., Richards P., Scheller J., Rose-John S. IL-6 trans-signalling: the *in vivo* consequences. *J Interferon Cytokine Res* 2005;25(5):241–53. PMID: 15871661.
 34. Peppas D., Micco L., Javadi A. et al. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathol* 2010;16(2):101–07. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001227. PMID: 21187913.
 35. Danese S., Semeraro S., Marini M. et al. Adhesion molecules in inflammatory bowel disease: therapeutic implications

- for gut inflammation. *Dig Liver Dis* 2005;37(11):811–8. PMID: 16168725.
36. Yu M., Kissling S., Freyschmidt-Paul P. et al. Interleukin-6 cytokine family member oncostatin M is a hair-follicle-expressed factor with hair growth inhibitory properties. *Exp Dermatol* 2008;17(1):12–9. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2007.00643.x. PMID: 17979974.
 37. Kovalovich K., Li W., DeAngelis R. et al. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2 and Bcl-xl. *J Biol Chem* 2001;276(28):26605–13. PMID: 11349125.
 38. Narimatsu M., Maeda H., Itoh S. et al. Tissue-specific autoregulation of the STAT3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T-cell. *Mol Cell Biol* 2001;21(19):6615–25. PMID: 11533249.
 39. Blagosklonny M., Campisi J., Sinclair D. et al. Impact papers on aging in 2009. *AGING* 2010;2(3):111–21. DOI: 10.18632/aging.100132. PMID: 20351400.
 40. Harrison D.E., Strong R., Sharp Z.D. et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009;460(7253):392–95. DOI: 10.1038/nature08221. PMID: 19587680.
 41. Miller R.A., Harrison D.E., Astle C.M. et al. Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice. *J Gerontol A Biol Med Sci* 2011;66(2):191–201. DOI: 10.1093/gerona/glq178. PMID: 20974732.
 42. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В. и др. Исследование радиозащитной активности мульти-фитоадаптогена в эксперименте на мышах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013;3:55–8. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Kazeev I.V. et al. Multiphytoadaptogen study of radioprotective activity in experiments on mice. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya* = Pathologic physiology and experimental therapy 2013;3:55–8 (In Russ.)].
 43. Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Казеев И.В. и др. Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013;4:51–4. [Karpova R.V., Bocharov E.V., Kazeev I.V. et al. The radioprotective multifitoadaptogen efficacy in experiments on dogs. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimental'naya terapiya* = Pathologic physiology and experimental therapy 2013;4:51–4 (In Russ.)].
 44. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;1:56–68. [Belitskij G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. The mechanisms of flavonoids anticancer action. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = Advances in molecular oncology 2014;1:56–68 (In Russ.)].
 45. Nekkanti S., Tokala R., Shankaraiah N. Targeting DNA minor groove by hybrid molecules as anticancer agents. *Curr Med Chem* 2017;24(26):2887–2907. DOI: 10.2174/0929867324666170523102730. PMID: 28545367.
 46. Oliynyk S., Oh S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance. *J Ginseng Res* 2013;37(2):144–66. DOI: 10.5142/jgr.2013.37.144. PMID: 23717168.
 47. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G. *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine* 2016;23(12):1409–21. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.07.011. PMID: 27765361.
 48. Amsterdam J.D., Panossian A.G. *Rhodiola rosea* L. as a putative botanical antidepressant. *Phytomedicine* 2016;23(7):770–83. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.009. PMID: 27013349.
 49. Lian-Wen Qi, Chong-Zhi Wang, Chun-Su Yan. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry* 2011;72(8):689–99. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.02.012. PMID: 21396670.
 50. Shanmugam M.K., Lee J.H., Chai E.Z. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Semin Cancer Biol* 2016;40–41:35–47. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.03.005. PMID: 27038646.
 51. Wang C., He H., Dou G. et al. Ginsenoside 20(S) – Rh2 Induces Apoptosis and Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells: Role of Orphan Nuclear Receptor Nur77. *J Agric Food Chem* 2017;65(35):7687–97. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02299. PMID: 28793767.
 52. Xia T., Wang Y.N., Zhou C.X. et al. Ginsenoside Rh2 and Rg3 inhibit cell proliferation and induce apoptosis by increasing mitochondrial reactive oxygen species in human leukemia Jurkat cells. *Mol Med Rep* 2017;15(6):3591–98. DOI: 10.3892/mmr.2017.6459. PMID: 28440403.

МОДИФИКАЦИЯ РЕАКЦИИ БЛАСТТРАНСФОРМАЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В АЛЛЕРГОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

И.В. Манина¹, В.Ю. Сергеев¹, Н.В. Голубцова², А.Ю. Сергеев³

¹Институт Аллергологии и клинической иммунологии; Россия, 123104 Москва, ул. Малая Бронная, 20, стр. 1;

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Большая Пироговская, 2, стр. 4

Контакты: Ирина Владимировна Манина Irina.v.manina@gmail.com

Введение. Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) востребована для обследования пациентов с иммунологическими нарушениями. Она применяется в различных областях медицины для выявления сенсибилизации к антигенам (аллергенам).

Цель исследования — провести модификацию и автоматизацию РБТЛ для применения в рутинной лабораторной практике.

Материалы и методы. РБТЛ, антигены (аллергены). Программное обеспечение Windows 7; процессор Intel Pentium G4500. Цифровая КМОП-видеокамера, микроскоп «Микмед-6».

Результаты. Мы провели анализ трудностей при постановке РБТЛ в лабораторной аллергологической практике и разработали компьютерную программу для автоматизации РБТЛ.

Заключение. Мы адаптировали и автоматизировали реакцию РБТЛ для применения в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: реакция бласттрансформации лимфоцитов, аллергены, методика, автоматизация

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-88-92

LYMPHOCYTES BLAST-TRANSFORMATION REACTION: MODIFICATION FOR ALLERGOLOGICAL PRACTICE

I. V. Manina¹, V. Yu. Sergeev¹, N. V. Golubtsova², A. Yu. Sergeev³

¹Institute of Allergology and Clinical Immunology; Bldg 1, 20 Malaya Bronnaya St., Moscow 123104, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Secheniv University); Bldg 4, 2 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119991, Russia

Introduction. Lymphocytes blast-transformation reaction (RBTL) is necessary for patient's inspection with immunologic infringements. It is applied in the different fields of medicine to identification of a sensitization to antigens (allergens).

Research objective — to modify and automate RBTL for application in routine laboratory practice.

Materials and methods. RBTL, antigens (allergens). Software: Windows 7; Intel Pentium G4500 CPU. Digital CMOS video camera, Mikmed-6 microscope.

Results. We analyzed difficulties when using RBTL in laboratory allergological practice. We created program files for automation of RBTL.

Conclusion. We adapted and automated RBTL for laboratory diagnostics using.

Keywords: lymphocytes blast-transformation reactions, allergens, technique, automation

Введение

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) разработана в 1960–1970 гг., однако до сих пор не потеряла своей актуальности [1]. На сегодняшний день РБТЛ востребована при обследовании пациентов с иммунологическими нарушениями в различных областях медицины для выявления сенсибилизации к антигенам (аллергенам). Накопленный опыт ее

применения привел к необходимости ее модификации и автоматизации.

В качестве основы метода используется способность сенсибилизированных лимфоцитов переходить в форму бластов под действием сенсибилизировавшего их антигена [2].

В настоящее время РБТЛ востребована для обследования пациентов с иммунологическими нарушениями

в различных областях медицины, чаще всего во фтизиатрии, ревматологии, иммунологии, аллергологии [3]. РБТЛ используется специалистами для оценки клеточного звена иммунитета при подозрении на иммунопатологическое состояние, для оценки функциональной активности лимфоцитов, для выявления клеточной сенсibilизации. Исследуют общую способность лимфоцитов человека к бласттрансформации под действием ФГА или антигена, а также к спонтанной бласттрансформации (без митогена).

Реакция спонтанной бласттрансформации возможна у пациентов в следующих случаях: воспалительный процесс любой этиологии, заболевания крови, состояние после массивного инвазивного вмешательства, состояния после облучения (в том числе повышенный радиационный фон), использование препаратов, влияющих на процессы кроветворения, а также другие воздействия, приводящие к стрессовой реакции иммунной системы [4].

В аллергологии данный метод используется для подтверждения или выявления сенсibilизации к антигенам (аллергенам). РБТЛ является наиболее точной при подозрении у пациентов гиперчувствительности замедленного типа, которая может наблюдаться как при контакте с инфекционным антигеном, так и при аллергических реакциях. Метод особенно важен при диагностике медикаментозной сенсibilизации [5]. Метод РБТЛ при отсутствии других способов диагностики позволяет анализировать возможные риски развития аллергических реакций.

Цель работы — провести модификацию и автоматизацию РБТЛ для применения в рутинной лабораторной практике.

Материалы и методы

Методика постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов

1. Для постановки реакции у больного берут 5–10 мл крови в пробирку, содержащую 100–200 ЕД гепарина, перемешивают и помещают на 60 мин в термостат при 37 °С для осаждения эритроцитов.

2. Надосадочный слой плазмы с лимфоцитами отсасывают в стерильную пробирку. Для оптимальной активации необходимо наличие небольшого числа макрофагов (моноцитов), поэтому не рекомендуется использовать высокоочищенные препараты лимфоцитов.

3. Определяют число лимфоцитов в 1 мкл надосадочного слоя.

4. Взвесь лимфоцитов разводят питательной средой 199, так чтобы в 1 мл содержалось 1–2 млн лимфоцитов. Оставшуюся аутоплазму используют в дальнейшей работе для приготовления питательной среды для культивирования лимфоцитов данного пациента, разводя средой 199.

5. Приготовленную лимфоцитарную взвесь разливают в стерильные флаконы по 1 мл и добавляют необходимое количество антигена.

6. Флаконы помещают в термостат ($T = 37\text{ °C}$) до 72 ч максимум. Более длительное время инкубации не рекомендуется во избежание ложноположительной реакции.

7. Готовят мазки на стеклах и подсчитывают количество лимфоцитов, перешедших в бластную форму, по отношению к общему числу лимфоцитов.

8. Параллельно следует провести отрицательный контроль (т. е. по аналогичной схеме культивировать лимфоцитарную взвесь без добавления антигена в среду), так как возможны реакции спонтанной (неспецифической) бласттрансформации. В качестве положительного контроля можно использовать реакцию на неспецифический митоген (фитогемагглютинин) по аналогичной схеме.

9. Рассчитывают результаты по формуле: определяют количество бластных клеток на 1000 клеток общего количества, после чего рассчитывают процент. Полученный результат сравнивают с контрольными образцами, культивированными при аналогичных условиях без добавления аллергена.

Формула расчета:

$$I(\%) = \text{Бл} / (\text{Лц} + \text{Бл}),$$

где: $I(\%)$ — индекс процентного соотношения бластных клеток в образце;

Бл — бластные клетки в образце;

Лц — лимфоциты в образце.

Реакцию можно считать положительной при 5–35 % бластных клеток от общего числа клеток по сравнению с контрольным (отрицательным) образцом.

Мы не рекомендуем проводить окрашивание мазков в связи с последующим подсчетом на электронно-вычислительных машинах. Красящие пигменты формируют нежелательный фон и лишние структурные элементы, что затрудняет настройку контрастности/освещенности микроскопа и фотоаппарата.

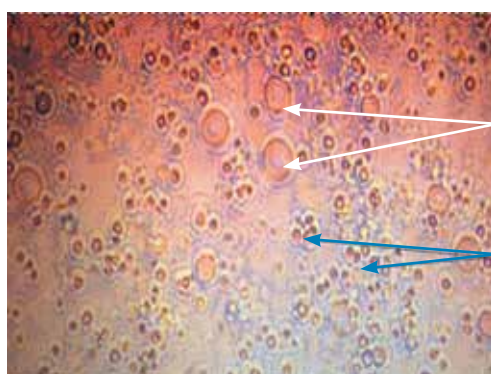
Для упрощения и автоматизации обработки полученных данных мы разработали компьютерную программу, проводящую подсчет результата исследования с фотоснимков образцов предметного стекла в режиме online. В основу программных файлов автоматической дифференцировки клеток (лимфоцитов и бластных форм) мы положили их морфологические различия [6, 7].

Морфологические характеристики лимфобластов и лимфоцитов при микроскопии

В таблице представлены морфологические характеристики лимфобластов и лимфоцитов.

Морфологические характеристики лимфобластов и лимфоцитов при микроскопии

Лимфобласты	Лимфоциты
Размер достигает 20–22 мкм. Ядро занимает большую часть клетки и имеет округлую или слегка овальную форму. Структура ядра нежно-сетчатая (хотя и более грубая, комковатая по сравнению с ядром миелобластов), с правильным, равномерным распределением хроматиновых нитей. Местами хроматиновые нити образуют утолщения. Темные участки базихроматина незаметно переходят в оксихроматин. В ядре имеется 1 (реже 2–3) крупное ядрышко, менее резко отграниченное, чем у миелобластов, расположенное центрально или эксцентрично. Цитоплазма базофильная, относительно светлая, окружает ядро узким пояском, вокруг ядра имеется более светлая периферическая зона, не всегда равномерно переходящая в более интенсивно окрашенную. Зернистости в цитоплазме нет	Размер чаще 7–10 мкм. Ядро круглое, овальное, иногда бобовидное. Структура ядра грубая, чаще состоит из грубых комков базихроматина и оксихроматина, создавая впечатление глыбчатости. Ядро окрашивается в темно- или светло-фиолетовый цвет, в нем иногда обнаруживаются небольшие светлые участки, имитирующие ядрышки. Цитоплазма лимфоцита светло-синяя с просветлением вокруг ядра. Часть лимфоцитов имеет в цитоплазме азурофильную зернистость, окрашивающуюся в красный цвет. Ободок цитоплазмы может иметь различные размеры, в связи с чем лимфоциты делят на 3 группы: узкоцитоплазмные, среднецитоплазмные и широкоцитоплазмные



Лимфобласты

Лимфоциты

Рис. 1. Микроскопия взвеси лимфоцитов и лимфобластов в культуральной среде

На рис. 1 представлены результаты микроскопии взвеси лимфоцитов и лимфобластов в культуральной среде. Различия клеток не вызывают сомнений, что делает возможным их подсчет в автоматическом режиме.

Результаты

Сложности постановки реакции бласттрансформации лимфоцитов в клинической практике

Несмотря на более чем 30-летний период использования, сохраняются определенные трудности при постановке данной реакции.

1. Метод достаточно трудоемок в связи с проведением реакции в 2 этапа: постановка реакции с предшествующей подготовкой образца и подсчет/анализ полученных результатов врачом-лаборантом.

2. Отсутствуют стандартизированные аллергены для многих диагностикумов медицинского (лекарственные препараты, материалы для протезирования и прочее) или бытового применения (ингредиенты косметических средств, средств бытовой химии, синтетических изделий, строительных материалов и т. д.). Однако потребность и необходимость в диагностике сенсibilизации человека к таким объектам

возрастает пропорционально развитию промышленной индустрии и синтезу новых материалов.

3. Необходимость стерилизации помещения и диагностического образца (для предотвращения инфицирования культуры клеток при длительном сроке инкубирования). Возможность применения антибиотиков и противогрибковых препаратов крайне нежелательна во избежание ложноположительных результатов. Данная проблема решается с помощью стерилизации образца. Выбор способа стерилизации/дезинфекции зависит от состава исследуемого вещества (УФ-облучения, обработки спиртом и проч.).

4. Возможность ошибки при обработке результатов врачом-лаборантом вручную под контролем зрения в связи с человеческим фактором. Данная проблема решается с помощью автоматизации подсчета результатов с помощью компьютера.

Программное обеспечение подсчета бластных клеток для реакции бласттрансформации лимфоцитов

Нами было разработано программное обеспечение для автоматизации подсчета лимфоцитов и лимфобластов в подготовленных образцах по стандартному протоколу. Препараты представляли собой неокрашенные мазки обогащенной лимфоцитами сыворотки крови на предметном стекле в разведении. Проводилась световая микроскопия на лабораторном микроскопе «Микмед-6» (ЛОМО, г. Санкт-Петербург). Для получения цифрового изображения поля зрения на микроскоп была установлена цифровая КМОП-видеокамера с разрешением 8 Мп, использовался штатный объектив микроскопа $40 \times 0,65$.

На рис. 2 представлены исходное фото образца и фото после его программной обработки.

Программное обеспечение работает под управлением операционной системы Windows 7 на персональном компьютере с процессором Intel Pentium G4500, тактовая частота 3,5 ГГц. Изображение передается в реальном времени на монитор лаборанта,

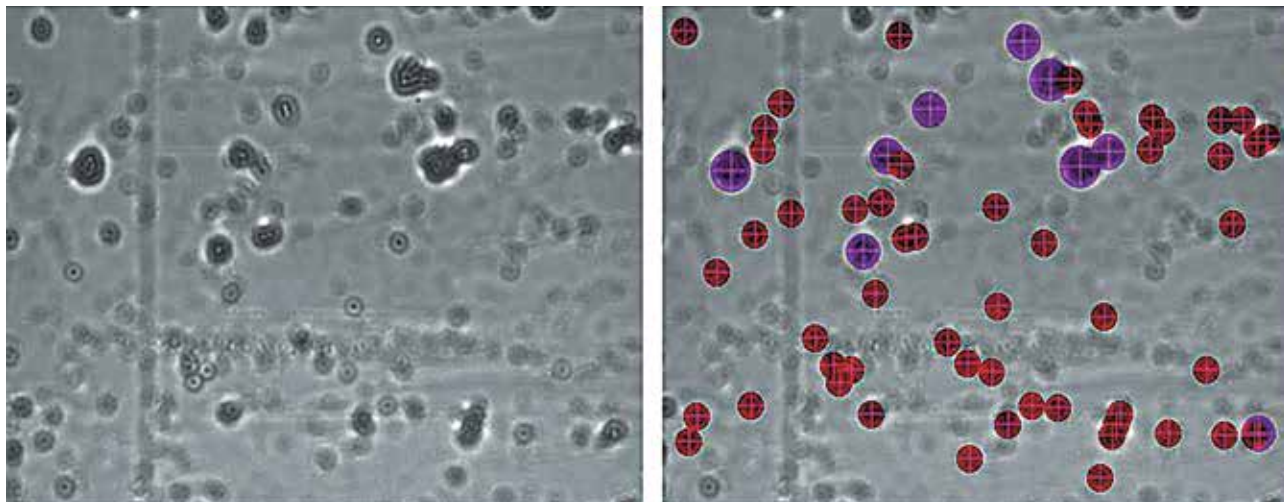


Рис. 2. Программная обработка результатов реакции бласттрансформации лимфоцитов

необходимая четкость изображения контролируется микровинтом микроскопа. По нажатию клавиши производятся автоматическое распознавание и подсчет числа лимфоцитов и лимфобластов на фотоизображении.

Для распознавания использовались 6 моделей (3 модели лимфоцита, 3 модели лимфобласта) клеток, в которых учитывались их размер, форма и структура (яркость участков). В целом лимфобласты описывались как более крупные клетки с равномерной бледной окраской. Процесс распознавания занимал примерно 8 с и отображался на экране для возможности контроля лаборантом.

Для повышения достоверности исследования автоматический подсчет проводился в нескольких полях зрения с наличием клеток и без артефактов по всей площади мазка. В среднем обсчитывалось 5 полей зрения. Исследование прекращалось при превышении числа распознанных клеток 1000, рассчитывалось процентное соотношение числа лимфобластов к общему числу лимфобластов и лимфоцитов. Результаты регистрировались в электронной карте.

Требования к образцам для тестирования

В связи с необходимостью тестирования аллергенов разнообразного состава и консистенции мы разработали рекомендации для отбора и подготовки диагностических образцов для исследования.

1. Твердые субстраты (не растворимые в биологических жидкостях и воде) необходимо стерилизовать с помощью автоклавирования (или ультрафиолета). Стерильные образцы можно вводить в культуру клеток в неизменном виде. Однако нами отмечено, что в данном случае основное взаимодействие лимфоцитов с аллергеном происходит непосредственно на диагностическом образце, что затрудняет оценку

реакции. Следует максимально снимать клетки с твердофазного диагностикума, иначе часть бластных форм остается «прилипшей» к образцу.

2. Твердые образцы, растворимые в биологических жидкостях или воде, следует предварительно развести с соблюдением стерильности до получения однородной жидкой структуры.

3. Жидкие образцы аллергенов при введении в культуру клеток нужно разводить в среде 199. Для избежания цитотоксичного эффекта жидкий диагностический образец необходимо титровать. Мы использовали следующие разведения: 1/25, 1/50, 1/100, 1/200 (использовать менее 3 разведений аллергена нецелесообразно в связи с малой информативностью получаемого результата). Не исключено токсическое действие примесей в диагностическом материале. При оценке результата каждый образец сравнивался с контрольным.

4. При возможности точного пересчета добавляемого образца необходимая концентрация неинфекционного аллергена должна составлять 1000 PNH в 1 мл, лекарственного вещества — 10 мкг в 1 мл.

5. Использование аэрозольных, масляных, эмульсионных, кремовых и прочих субстанций для постановки РБТЛ непригодно в связи с невозможностью технического исполнения протокола методики.

6. Тестирование многокомпонентных образцов (растворы, смеси, сплавы и прочее) может быть сопряжено со сложностью интерпретации результатов. Не исключается токсическое действие примесей. При оценке полученного результата важно учитывать особенности фармакокинетики и фармакодинамики медикаментов и их метаболитов. У пациентов с полипрагмазией важен грамотный сбор анамнеза врачом-аллергологом перед проведением обследования [8, 9].

7. Тестирование бактериальных, вирусных, грибковых субстанций (равно как и инфицированных образцов) нецелесообразно в связи с прямым инфекционно-токсическим действием. Например, шерсть/перхоть/другие биологические субстраты животных, нестерильные жидкости (использованные косметологические или медицинские средства и прочее) непригодны для диагностики в связи с невозможностью провести стерилизацию без изменения молекулярной структуры.

8. Забор материала крови у пациента должен производиться при отсутствии воспалительного процесса любой этиологии. В период воспаления возможны реакции неспецифической трансформации, что делает невозможным получение правильной оценки результата РБТЛ. С момента последнего периода болезни (острого состояния или обострения хронического) должно пройти не менее 7 дней.

9. Для получения адекватных результатов исследования кровь пациента должна быть использована в кратчайшие сроки с момента забора (не более 1 сут хранения при физиологических условиях). Пациент и врач должны быть предупреждены, что использование иммунокорректирующих средств (как стимулирующих, так и супрессантов) накануне исследования может исказить результаты теста.

Заключение

РБТЛ имеет высокую диагностическую ценность в качестве дополнительного критерия верификации аллергических реакций или выявления сенсibilизации у пациентов. Разработанная нами модификация и автоматизация РБТЛ существенно снижает трудозатратность метода и повышает качество результатов, что позволяет ее внедрять в рутинную лабораторную практику.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сохин А.А., Чернушенко Е.Ф. Прикладная иммунология. К.: Здоровье, 1984. 320 с. [Sokhin A.A., Chernushenko E.F. Applied immunology. Kiev: Zdorovye, 1984. 320 p. (In Russ.)].
2. Ройт А. Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. С. 281–285. [Roitt A. Fundamentals of immunology. Moscow: World, 1991. P. 281–285 (In Russ.)].
3. Чернушенко Е.Ф. Иммунологические методы в диагностике туберкулеза. Лабораторная диагностика 2005;2:63–6. [Chernushenko E.F. Immunologic methods in diagnosis of tuberculosis. Laboratory Diagnostika = Laboratory diagnostics. 2005;2:63–6 (In Russ.)].
4. Авербах М.М., Гергерт В.Я., Литвинов И.В. Повышенная чувствительность замедленного типа и инфекционный процесс. М.: Медицина, 1974. 248 с. [Averbakh M.M., Gergert V.Ya., Litvinov I.V. Hypersensitivity of delayed type and infectious process. Moscow: Meditsina, 1974. 248 p. (In Russ.)].
5. Тузлукова Е.Б., Царев С.В., Лусс Л.В. и др. Лекарственная аллергия и другие виды осложнений лекарственной терапии: от классификации к диагностике. Доктор.Ру. 2008;2:27–32. [Tuzlukova E.B., Tsarev S.V., Luz L.V. et al. Medicinal allergy and other of medicinal therapy complications: from classification to diagnostics. Doctor.Ru. 2008;2:27–32 (In Russ.)].
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир, 1969. 646 п. [Lillie R. Pathohistologic technique and practical histochemistry. Moscow: Mir, 1969. 646 p. (In Russ.)].
7. Елисеева В.Г., Субботина М.Я., Афанасьева Ю.И. и др. Основы гистологии и гистологической техники. М.: Медицина, 1967. 268 с. [Yeliseyeva V.G., Subbotin M.Ya., Afanasyeva Yu.I. et al. Fundamentals of histology and histologic technique. Moscow: Meditsina, 1967. 268 p. (In Russ.)].
8. Латышева Т.В., Прокопенко В.Д., Ильина Н.И. и др. Полипрагмазия как основная причина острых лекарственных осложнений. Материалы 4-го Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тез. докл. М., 1997. С. 71. [Latysheva T.V., Prokopenko V.D., Ilyina N.I. et al. Polipragmacy as main reason for acute medicinal complications. 4th Russian national congress "Person and medicine". Thesis of reports. Moscow, 1997. P. 71 (In Russ.)].
9. Хаитов Р.М. Лекарственная аллергия. Методические рекомендации для врачей. М.: Фармуспринт медиа, 2012. 75 с. [Haitov R.M. Medicinal allergy. Methodical recommendations for doctors. Moscow: Pharmusprint media, 2012. 75 p. (In Russ.)].

МАТЕРИАЛЫ XV ВСЕРОССИЙСКОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ИМЕНИ А.Ю. БАРЫШНИКОВА «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ»

А.П. Бер, А.Э. Мачулкин, М.В. Ковальчук,
Н.С. Воробьева, Е.К. Белоглазкина, С.В. Ковалев,
В.Э. Котелянский, А.Г. Мажуга

СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ КОНЬЮГАТОВ ПАКЛИТАКСЕЛА НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРА ПРОСТАТИЧЕСКОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО МЕМБРАННОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Введение. В 2012 г. рак предстательной железы являлся 2-м по распространенности злокачественным новообразованием среди мужского населения (1,1 млн новых случаев). Несмотря на большое количество методов лечения заболевания, таких как радикальная простатэктомия, лучевая терапия, гормональная терапия и химиотерапия, проводить эффективное лечение опухолей, имеющих метастазы, в настоящее время не представляется возможным. Кроме того, многие методы обладают широким спектром побочных действий. В качестве одного из решений данной проблемы выступает направленная доставка противоопухолевых препаратов. В клетках рака предстательной железы наблюдается повышенная экспрессия простатического специфического мембранного антигена (ПСА) по сравнению со здоровыми клетками. Существует ряд низкомолекулярных лигандов, обладающих высокой аффинностью к ПСА.

Цель исследования. Разработка конъюгатов противоопухолевого препарата Паклитаксел с рядом лигандов, специфично связывающихся с ПСА. Связь терапевтического агента и лиганда осуществлялась посредством углеродного линкера, который обеспечивает высвобождение лекарства внутри клетки. Часть лигандов содержали п-галогенбензильный замести-

тель при атоме азота лизина. Вектор с линкером соединялись амидным или мочевиным фрагментом. Сшивка противоопухолевого агента и вектора с линкером осуществлялась посредством 1,3-дипилярного циклоприсоединения с образованием 1,4-дизамещенного 1,2,3-триазола.

Материалы и методы. Все полученные вещества были охарактеризованы спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H и ^{13}C . Чистота конъюгатов подтверждалась с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ/МС). Также конечные соединения были протестированы *in vitro* и *in vivo*.

Результаты. Была синтезирована серия из 11 конъюгатов. Были проведены *in vitro* испытания на клеточных линиях рака предстательной железы LNCaP (ПСА+) и PC3 (ПСА-). Конъюгаты показали токсичность, близкую к паклитакселю, но некоторые из них имеют низкую избирательность по отношению к ПСА-экспрессирующим клеткам. Также были проведены *in vivo* испытания для 2 конъюгатов. Соединения показали способность ингибировать рост опухоли, сопоставимую с оригинальным препаратом.

Заключение. В результате были синтезированы 11 конъюгатов, строение которых подтверждено спектрами ^1H и ^{13}C ЯМР, масс-спектрометрией высокого разрешения. Чистота соединений была подтверждена методом ВЭЖХ/МС. Также были проведены биологические испытания *in vitro* и *in vivo*.

*Исследование преимущественно выполнено
в МГУ им. М.В. Ломоносова при поддержке
Министерства образования и науки
Российской Федерации (02.G25.31.0219).*

К 65-ЛЕТИЮ АЛЕКСАНДРА ВИКТОРОВИЧА КАРАУЛОВА

Вся научная деятельность академика РАН А.В. Караулова связана с иммунологией. Он получил классическое иммунологическое образование, работал в ведущих иммунологических центрах, принимал деятельное участие в организации иммунологического сообщества в нашей стране. После окончания очной аспирантуры Всесоюзного онкологического научного центра АМН СССР в 1979 году работал младшим, старшим научным сотрудником, с 1983 года — заведующим лабораторией иммунологии и руководителем исследовательского управления в системе Минмедпрома СССР, а с 1986 года — заведующим отделением клинической иммунологии Института прикладной молекулярной биологии МЗ СССР. Одновременно с 1983 года А.В. Караулов — научный руководитель по иммунологии ЦКБ IV ГУ при МЗ РСФСР. В 1988 году был назначен заместителем директора Института иммунологии по научной работе, в котором проводил исследования в области клинической иммунологии и иммунологии ВИЧ-инфекции. Одновременно руководил популяционными исследованиями в рамках Всесоюзного научного центра молекулярной диагностики и лечения, являясь главным научным сотрудником, а позднее и директором одного из институтов. В 1990 году он организовал кафедру клинической иммунологии и аллергологии в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова, которой заведует в настоящее время.



Одиннадцатого мая 2018 года исполнилось 65 лет Александру Викторовичу Караулову — заместителю главного редактора нашего журнала

Активно участвует в Проекте по повышению конкурентоспособности ведущих российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров «5–100». В 2014–2016 годах организовал лабораторию молекулярной иммунологии в Национальном исследовательском Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского, а в 2018 году — лабораторию иммунопатологии в Первом МГМУ им. И.М. Сеченова.

Академик А.В. Караулов — специалист в области клинической иммунологии и онкоиммунологии. Основные направления его исследований: клеточные и молекулярные механизмы регуляции врожденного и адаптивного иммуни-

тета, изучение особенностей мукозального иммунитета, физиологическая роль растворимых форм мембранных антигенов клеток иммунной системы человека, иммуномониторинг при применении лекарственных препаратов и клеточной терапии, инновационные технологии диагностики и лечения иммунозависимых заболеваний.

Уже первые научные исследования А.В. Караулова выявили биологические характеристики различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток, что позволило создать и внедрить оригинальную методологию оценки состояния иммунной системы человека и животных. В дальнейшем им получены новые данные о регуляции иммунных реакций в норме и при патологии человека и установлены клеточные и молекулярные механизмы вторичных иммунодефицитов. Работы последнего десятилетия посвящены исследованию механизмов мукозального иммунитета респираторного и урогенитального тракта. Он исследовал структурные особенности, механизмы регуляторного действия и мониторинговую значимость растворимых дифференцировочных молекул клеток иммунной системы и растворимых молекул главного комплекса гистосовместимости. Им создана методология комплексной оценки мукозального иммунитета, изучена значимость отдельных его показателей и доказана возможность коррекции их нарушений при иммунопатологии. Разработаны методы

персонализированной иммунореабилитации и иммунотерапии при различных иммуноопосредованных заболеваниях.

А.В. Караулов – руководитель научной школы по клинической иммунологии. Он автор первых в России учебников, атласов и учебных пособий по клинической иммунологии. Им подготовлено 17 докторов и 30 кандидатов наук. Он опубликовал более 600 печатных работ, включая 460 статей в международных и отечественных реферируемых журналах, получил 10 патентов.

Является заместителем главного редактора «Российского биотерапевтического журнала», членом редколлегии научных журналов «Иммунология», «Российский иммунологический журнал», «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины», «Молекулярная медицина», «Цитокины и воспаление», ЖМЭИ, International Archives of Allergy and Immunology, Molecular Medicine Reports.

Член Европейской академии аллергологов и клинических иммунологов,

член президиума Российского общества иммунологов. Лауреат премии Москвы в области медицины, премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники и в области образования.

Заслуженный деятель науки Российской Федерации. Награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, орденом Почета. Победитель открытого конкурса Совета ректоров медицинских вузов страны «Лучший преподаватель медицинского вуза» в номинации «За подготовку научно-педагогических кадров», отмечен золотой медалью Российского научного общества иммунологов «За выдающиеся достижения в области иммунологии» и ежегодной премией в сфере медицинского и фармацевтического образования в номинации «За лучшее учебное издание в 2015 году». Является почетным профессором государственного университета «Дубна», Южно-Уральского государственного медицинского университета и Курского государственного медицинского университета. Отмечен высшим знаком

Сеченовского университета «За заслуги перед Первым МГМУ».

А.В. Караулов – председатель Экспертного совета по медико-профилактическим наукам ВАК. В 2016 году избран заместителем руководителя Секции медико-биологических наук Отделения медицинских наук РАН, является экспертом РАН, РНФ, Минобрнауки, членом профильной комиссии по аллергологии и иммунологии Минздрава России, членом рабочей комиссии Минздрава России по подготовке научной платформы по иммунологии, членом секции по присуждению Премий Правительства в области науки и техники и главным внештатным консультантом по иммунологии ГМУ УД Президента РФ.

Принимает активное участие в международном сотрудничестве. Является председателем комиссии здравоохранения Российской ассоциации содействия ООН, в качестве советника и эксперта работал в составе российских делегаций на Исполкомах, Генассамблеях, комитетах ВОЗ, был представителем стран Восточной Европы в комитете ВОЗ/ЮНФПА/ЮНИСЕФ.

Редакция «Российского биотерапевтического журнала» поздравляет Александра Викторовича с юбилеем и желает ему здоровья, благополучия и новых творческих успехов!

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

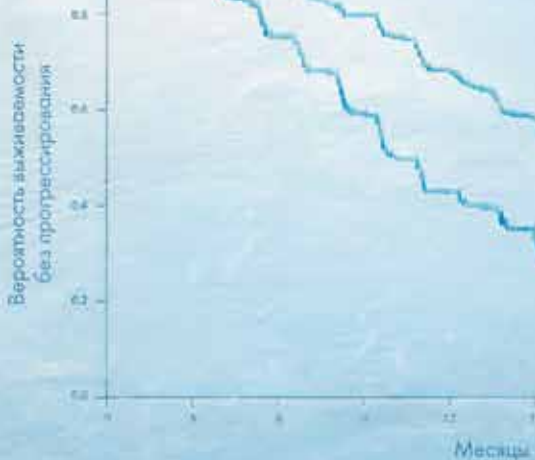


ЗАРЕГИСТРИРОВАН В РФ ДЛЯ ТЕРАПИИ ПЕРВОЙ ЛИНИИ НМРЛ EGFR^m1



Назначение ТАГРИССО® в первой линии терапии НМРЛ EGFR^m увеличивает медиану выживаемости без прогрессирования до 18,9 vs 10,2 мес.

при применении современного стандарта
терапии ИТК EGFR ($p < 0,0001$)^{1,2}



1. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Tagrisso® (осимертиниб) ЛП-004492 от 11.05.2018. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс] URL: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=9a4580b6-f188-4c78-ba9e-ca2fd4b840eb&T=17.05.2018.
2. Soria J-C, Ohe Y, Vansteenkiste J, et al; FLAURA Investigators. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2018;378(2):113-125.

Краткая инструкция по медицинскому применению

Регистрационный номер: ЛП-004492. Международное непатентованное название: осимертиниб (osimertinib). Фармакотерапевтическая группа: противоопухолевое средство, протеинкиназы ингибитор. Лекарственная форма: таблетки, покрытые пленочной оболочкой. Состав: Одна таблетка, покрытая пленочной оболочкой, 40 мг содержит действующее вещество: осимертиниб мезилат* 47,7 мг, что соответствует осимертинibu 40 мг. Одна таблетка, покрытая пленочной оболочкой, 80 мг содержит действующее вещество: осимертиниб мезилат* 95,4 мг, что соответствует осимертинibu 80 мг. Способ применения и дозы: До назначения препарата Tagrisso® следует подтвердить статус мутации в гене EGFR в образцах ткани опухоли или в свободно циркулирующей дезоксирибонуклеиновой кислоте (ДНК) опухоли, выделенной из плазмы крови, с помощью валидированного теста: делеция в экзоне 19 или замена L858R в экзоне 21 (в случае терапии первой линии); мутация T790M (в случае прогрессирования заболевания во время или после терапии ингибитором тирозинкиназы EGFR. Дозы: Рекомендуемая доза осимертинива – 80 мг один раз в сутки. Терапию продолжают до наступления прогрессирования заболевания или развития непереносимой токсичности. Препарат следует принимать ежедневно в одно и то же время вне зависимости от приема пищи. В случае пропуска приема препарата пропущенную дозу следует принять в том случае, если до времени приема следующей дозы осталось не менее 12 часов. Способ применения: Внутрь. Таблетки следует проглатывать целиком, запивая водой. Не следует делить, дробить или разжевывать таблетки. Показания к применению: Первая линия терапии местнораспространенного или метастатического немелкоклеточного рака легкого в случае наличия в опухолевых клетках мутации в гене рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) (делеция в экзоне 19 или замены L858R в экзоне 21) у взрослых пациентов. Местнораспространенный или метастатический немелкоклеточный рак легкого с мутацией T790M в гене EGFR у взрослых пациентов. Противопоказания: повышенная чувствительность к осимертинibu или любому из компонентов препарата. Беременность и период грудного вскармливания. Нарушение функции почек тяжелой степени, терминальная стадия хронической почечной недостаточности, включая пациентов на гемодиализе. Нарушение функции печени средней и тяжелой степени. Дети и подростки в возрасте до 18 лет (данные отсутствуют). Прием препаратов зверобоя продырявленного на фоне терапии препаратом Tagrisso, противоопухолевых. Совместное применение мощных индукторов CYP3A4 (например, ритонавира, фенитоина, рифампицина, и карбамазепина). С осторожностью: интерстициальное заболевание легких, удлинение интервала QTc, совместное применение с умеренными индукторами CYP3A4 (например, бозотан, эфавиренз, модафинил), нарушение функции печени легкой степени тяжести. Побочное действие: Информация о профиле безопасности препарата Tagrisso отражает опыт его применения у 1142 пациентов НМРЛ с мутацией в гене EGFR. Все эти пациенты принимали препарат в дозе 80 мг в сутки в двух рандомизированных исследованиях III фазы (первая линия терапии в исследовании FLAURA, вторая линия терапии в исследовании AURA 3), двух исследованиях, проводимых в одной группе (вторая или последующая линия терапии в исследовании AURA 2) и в одном исследовании I фазы (первая или последующая линия терапии в исследовании AURA 1). Большинство нежелательных реакций были 1 или 2 степени тяжести. Наиболее частыми нежелательными лекарственными реакциями были диарея [49%] и сыпь [47%]. Нежелательные реакции 3 и 4 степени тяжести в обоих исследованиях составили 9,7% и 0,9%, соответственно. 2,1% пациентов, получивших препарат Tagrisso® в дозе 80 мг в сутки, потребовалось снижение дозы из-за развития нежелательных лекарственных реакций. У 4,3% пациентов терапия была прекращена из-за развития нежелательных реакций. Определение частоты побочных реакций: очень часто ($\geq 1/10$); часто ($\geq 1/100$ до $< 1/10$); нечасто ($\geq 1/1000$ до $< 1/100$); редко ($\geq 1/10000$ до $< 1/1000$); очень редко ($< 1/10000$); неизвестно (невозможно оценить по имеющимся данным). Нежелательные лекарственные реакции, отмеченные в исследованиях FLAURA и AURA (AURA 3, AURA 2 и AURA 1): Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения: часто – интерстициальная болезнь легких, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 1,5%. Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта: очень часто – диарея, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 1,2%, очень часто – стоматит, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,2%. Нарушения со стороны органа зрения:

нечасто – кератит, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,1%. Нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки: очень часто – сыпь, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,9%, очень часто – сухость кожи, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,1%, очень часто – паронихия, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,3%, очень часто – зуд, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,1%. Изменения параметров лабораторных и инструментальных исследований (результаты исследований, представленные как изменение степени по CTCAE) [отражает частоту лабораторных отклонений, а не частоту отмеченных нежелательных явлений]: нечасто – удлинение интервала QTc (0,9%), очень часто – снижение количества тромбоцитов, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 1,6%, очень часто – снижение количества лейкоцитов, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 1,5%, очень часто – снижение количества лимфоцитов, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 7,2%, очень часто – снижение количества нейтрофилов, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 4,1%. Нежелательные лекарственные реакции, отмеченные в исследовании FLAURA (степень определяли по CTCAE): Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения: интерстициальная болезнь легких – любая степень – 3,9%, степень 3 и выше – 1,1%. Нарушения со стороны органа зрения: кератит – любая степень – 0,4%, степень 3 и выше – 0%. Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта: диарея – любая степень – 58%, степень 3 и выше – 2,2%, стоматит – любая степень – 29%, степень 3 и выше – 0,7%. Нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки: сыпь – любая степень – 58%, степень 3 и выше – 1,1%, сухость кожи – любая степень – 36%, степень 3 и выше – 0,4%, паронихия – любая степень – 35%, степень 3 и выше – 0,4%, зуд – любая степень – 17%, степень 3 и выше – 0,4%. Изменения параметров лабораторных и инструментальных исследований: Удлинение интервала QTc – любая степень – 1,1%, степень 3 и выше – 0%. Результаты исследований, представленные как изменение степени по CTCAE: снижение количества тромбоцитов – любая степень – 51%, степень 3 и выше – 0,7%, снижение количества лейкоцитов – любая степень – 72%, степень 3 и выше – 0,4%, снижение количества лимфоцитов – любая степень – 63%, частота нежелательных реакций 3–4 степени – 0,6%, снижение количества нейтрофилов – любая степень – 41%, степень 3 и выше – 3,0%. Нежелательные лекарственные реакции, отмеченные в исследовании AURA 3 (степень определяли по CTCAE): Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения: интерстициальная болезнь легких – любая степень – 3,6%, степень 3 и выше – 0,4%. Нарушения со стороны органа зрения: кератит – любая степень – 1,1%, степень 3 и выше – 0%. Нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта: диарея – любая степень – 41%, степень 3 и выше – 1,1%, стоматит – любая степень – 15%, степень 3 и выше – 0%. Нарушения со стороны кожи и подкожной клетчатки: сыпь – любая степень – 34%, степень 3 и выше – 0,7%, сухость кожи – любая степень – 23%, степень 3 и выше – 0%, паронихия – любая степень – 22%, степень 3 и выше – 0%, зуд – любая степень – 13%, степень 3 и выше – 0%. Изменения параметров лабораторных и инструментальных исследований: Удлинение интервала QTc – любая степень – 1,4%, степень 3 и выше – 0%. Результаты исследований, представленные как изменение степени по CTCAE: снижение количества тромбоцитов – любая степень – 46%, степень 3 и выше – 0,7%, снижение количества лейкоцитов – любая степень – 61%, степень 3 и выше – 1,1%, снижение количества нейтрофилов – любая степень – 27%, степень 3 и выше – 2,2%.

Материал предназначен для специалистов здравоохранения (работников здравоохранения, фармацевтических работников). Перед назначением препарата необходимо ознакомиться с полным текстом инструкции по медицинскому применению. Дальнейшая информация предоставляется по требованию: ООО «АстраЗенка Фармасьютикалз», Россия, 125284, Москва, ул. Беговая д. 3, стр. 1, тел.: +7 (495) 799 56 99, факс: +7 (495) 799 56 98. Дата утверждения: 11.05.2018. Если вам стало известно о нежелательных явлениях, другой информации по безопасности или случаях неэффективности при использовании препаратов нашей компании, пожалуйста, в течение 24 часов свяжитесь с сотрудниками подразделения по безопасности лекарственных препаратов 7 (495) 799 56 99 (доб. 2580) или отправьте всю известную вам информацию на электронный адрес: AdverseEvents.ru@AstraZeneca.com.

ООО «АстраЗенка Фармасьютикалз»
Россия, 125284, Москва, ул. Беговая д. 3, стр. 1
Тел.: +7 (495) 799 56 99, факс: +7 (495) 799 56 98
www.astrazeneca.ru

AstraZeneca