



ISSN 1726-9784

# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal  
of Biotherapy**

**1**

**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 (Сизтл, США); Р.И. Якубовская, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия)

ОСНОВАН В 2002 Г.

1 ТОМ 17  
'18

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  
bioterapy\_rbj@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 В.Е. Ефремова  
Корректор Е.П. Врублевская  
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. № 1. 1–100  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018  
Подписной индекс в каталоге  
агентства «Роспечать» — 81679  
Отпечатано в типографии  
ООО «Медиаколор»  
Тираж 1000 экз.  
<http://www.ronc.ru/node/1877>

## Мероприятия в 2018 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей  
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского  
Уральского отделения РАН

**29—30**  
**марта**  
**2018 г.**  
**Москва**

**XV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ИМЕНИ А.Ю. БАРЫШНИКОВА  
«НОВЫЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ  
И МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: ПРОБЛЕМЫ, ДОСТИЖЕНИЯ,  
ПЕРСПЕКТИВЫ»**

**Место проведения:** г. Москва, Миусская площадь, 7, стр. 1.

- регистрационную форму высылать на электронную почту:  
[conference-edito@mail.ru](mailto:conference-edito@mail.ru)
- тезисы докладов – на [biotherapy\\_rbj@mail.ru](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)!
- срок подачи заявки для участия с докладом – **25 января 2018 г.**
- срок подачи тезисов (для публикации) – **25 января 2018 г.**
- регистрация участников – до 1 марта 2018 г.
- по всем вопросам, связанным с участием в конференции,  
обращаться к секретарю Оргкомитета  
Решетниковой Вере Владимировне  
по тел. +7 (499) 324 55 85, +7 (926) 505 72 55  
или по электронной почте [conference-edito@mail.ru](mailto:conference-edito@mail.ru)

Тезисы и тексты докладов конференции  
будут опубликованы в «Российском  
биотерапевтическом журнале».

Оргкомитет оставляет за собой  
право отбора докладов.

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. Evsegneeva**, 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

1 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](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[biotherapy\\_rbj@ronc.ru](mailto:biotherapy_rbj@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](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://www.abvpress.ru)  
**Editor V.E. Efremova**  
**Proofreader E.P. Vrublevskaya**  
**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 № ФЦ 77-53039  
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 1. 1–100

© PH "ABV-Press", 2018

Rospechat' catalogue index: 81679

Printed at the Mediacolor LLC  
1,000 copies

<http://www.ronc.ru/node/1877>

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Т.В. Осипова, В.М. Бухман</i><br>Биомаркеры трансляционной медицины. ....                                                                                                                                           | 6  |
| <i>Д.А. Рябчиков, И.А. Дудина, И.К. Воротников, Д.А. Денчик, А.С. Шушарин, Э.И. Абдуллаева</i><br>Возможности применения генетических и сывороточных онкомаркеров<br>при ранней диагностике рака молочной железы. .... | 14 |
| <i>Н.Э. Атаханова, Д.М. Алмурадова, И.А. Дудина</i><br>Молекулярно-биологические характеристики трижды негативного рака молочной железы . . . . .                                                                      | 23 |
| <i>Г.М. Волгарева</i><br>Естественная циркуляция вирусов папилломы человека у мужчин — что о ней известно? . . . . .                                                                                                   | 28 |
| <i>Я.А. Жуликов, И.В. Самойленко, Л.В. Демидов</i><br>Механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии . . . . .                                                                             | 34 |
| <i>В.С. Кряжева, М.А. Чекалова, В.В. Кузнецов</i><br>Современные методики оценки эффективности лучевой терапии<br>при раке шейки матки . . . . .                                                                       | 47 |

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Д.А. Рябчиков, О.А. Безнос, И.А. Дудина, И.К. Воротников,<br/>Д.А. Денчик, С.В. Чулкова, О.А. Талипов, Н.Н. Тупицын</i><br>Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов<br>с люминальным раком молочной железы . . . . .                                                                                                                              | 53 |
| <i>И.С. Шорманов, М.С. Лось, К.С. Титов</i><br>Комплексная противоишемическая терапия раннего послеоперационного периода<br>органосохраняющего оперативного лечения почечно-клеточного рака . . . . .                                                                                                                                                       | 58 |
| <i>А.В. Пономарев, А.А. Солодовник, А.С. Мкртчян, Ю.П. Финашутина,<br/>А.А. Турба, В.А. Мисюрин, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова</i><br>Связь делеций и точечных мутаций гена <i>p53</i> с резистентностью<br>клеточных линий метастатической меланомы кожи человека к аранозе . . . . .                                                                     | 64 |
| <i>М.Е. Копырулина, Е.Н. Захарова, Т.Н. Заботина, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов</i><br>Технология создания и свойства иммунофлуоресцентных зондов с меткой Alexa-488<br>для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. . . . .                                                                                                                    | 70 |
| <i>Т.В. Абрамова, И.Б. Меркулова, Н.Ю. Кульбачевская,<br/>О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, В.М. Бухман</i><br>Сравнительное патоморфологическое исследование внутренних органов крыс при доклиническом<br>изучении воспроизведенного винкристина-РОНЦ и винкристина фирмы Teva . . . . .                                                            | 76 |
| <i>А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, О.Л. Орлова, Н.В. Голубцова,<br/>А.А. Рудакова, З.А. Соколова, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Л.Р. Тилова</i><br>Масштабирование технологии получения липосомальной формы<br>тетра-3-фенилтиофталлоцианина гидроксиалюминия<br>и изучение ее мутагенных и иммунотоксических свойств . . . . . | 83 |
| <i>А.И. Щербаков, Е.Н. Кособокова, М.В. Пинюгина, Е.В. Шешукова, В.С. Косоруков</i><br>Аффинные свойства анти-Her2 антител, полученных из растительного источника . . . . .                                                                                                                                                                                 | 95 |

## REVIEWS

|                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>T.V. Osipova, V.M. Bukhman</i><br><b>Biomarkers of translational medicine</b> . . . . .                                                                                                                                      | 6  |
| <i>D.A. Ryabchikov, I.A. Dudina, I.K. Vorotnikov, D.A. Denchik, A.S. Shusharin, E.I. Abdullaeva</i><br><b>Possibilities of application of genetic and serum oncomarkers<br/>in early diagnostics of breast cancer</b> . . . . . | 14 |
| <i>N.E. Atakhanova, D.M. Almuradova, I.A. Dudina</i><br><b>Molecular-biological characteristics of triple negative breast cancer</b> . . . . .                                                                                  | 23 |
| <i>G.M. Volgareva</i><br><b>Natural history of papillomaviruses in men – what is known?</b> . . . . .                                                                                                                           | 28 |
| <i>Ya.A. Zhulikov, I.V. Samoylenko, L.V. Demidov</i><br><b>Mechanisms of resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic cutaneous melanoma</b> . . . . .                                                                         | 34 |
| <i>V.S. Kryazheva, M.A. Chekalova, V.V. Kuznetsov</i><br><b>Modern methods of assessing the effectiveness of radiation therapy<br/>in cervical cancer</b> . . . . .                                                             | 47 |

## ORIGINAL REPORTS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>D.A. Ryabchikov, O.A. Beznos, I.A. Dudina, I.K. Vorotnikov,<br/>D.A. Denchik, S.V. Chulkova, O.A. Talipov, N.N. Tupitsyn</i><br><b>Disseminated tumor cells of luminal breast cancer patients</b> . . . . .                                                                                                                                                            | 53 |
| <i>I.S. Shormanov, M.S. Los', K.S. Titov</i><br><b>Complex anti-ichemic therapy of the early postoperative period<br/>of organ-preserving operational treatment of renal cellular cancer</b> . . . . .                                                                                                                                                                    | 58 |
| <i>A.V. Ponomarev, A.A. Solodovnik, A.S. Mkrtchyan, Yu.P. Finashutina,<br/>A.A. Turba, V.A. Misyurin, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova</i><br><b>Relationship between deletion and point mutations of <i>p53</i> and drug resistance<br/>to aranoza in human melanoma cell lines</b> . . . . .                                                                            | 64 |
| <i>M.E. Kopyrulina, E.N. Zakharova, T.N. Zabolina, D.Yu. Blokhin, P.K. Ivanov</i><br><b>The technology of creation and quality testing of immunofluorescent probes<br/>with dye Alexa-488 for analysis of cellular populations by flow cytometry</b> . . . . .                                                                                                            | 70 |
| <i>T.V. Abramova, I.B. Merkulova, N.Yu. Kulbachevskaya, O.I. Konyaeva,<br/>N.P. Ermakova, V.A. Chaley, V.M. Bukhman</i><br><b>The comparative pathomorphologic research of the inner organs of rats<br/>on the preclinical study of vincristine-RONC and vincristine-Teva</b> . . . . .                                                                                   | 76 |
| <i>A.V. Lantsova, L.L. Nikolaeva, N.A. Oborotova, E.V. Sanarova, O.L. Orlova,<br/>N.V. Golubtsova, A.A. Rudakova, Z.A. Sokolova, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, L.R. Tilova</i><br><b>Scaling of the technology of obtaining the hydroxylaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine<br/>liposomal form and studying its mutagenic and immunotoxic properties</b> . . . . . | 83 |
| <i>A.I. Scherbakov, E.N. Kosobokova, M.V. Pinyugina, E.V. Sheshukova, V.S. Kosorukov</i><br><b>Affinity properties of plant-made anti-Her2 antibodies</b> . . . . .                                                                                                                                                                                                       | 95 |

## БИОМАРКЕРЫ ТРАНСЛЯЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ

Т.В. Осипова, В.М. Бухман

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

Контакты: Татьяна Владимировна Осипова [tvosipova2011@yandex.ru](mailto:tvosipova2011@yandex.ru)

Разработка новых лекарственных средств является одним из приоритетных направлений трансляционной медицины. Существенная роль отводится биомаркерам (БМ), оценивающим безопасность и эффективность новых препаратов. Правильный выбор БМ позволяет сократить время и затраты, необходимые для разработки препаратов и передачи их в клинику. Обзор посвящен анализу современной научной литературы относительно роли ранее известных и вновь открытых БМ в трансляционных исследованиях. Трансляционные БМ (ТБМ) устанавливаются во время доклинических испытаний и применяются на всех этапах исследования. ТБМ должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью, легко измеряться в реальном времени в легкодоступных биологических средах, одинаково оценивать процесс у разных видов животных (в том числе у человека), позволять сравнивать результаты клинических исследований с доклиническими. Основная роль ТБМ токсичности — предсказывать, определять и отслеживать токсичность препаратов на всех этапах их изучения. Создан международный консорциум (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC), основной задачей которого является квалификация новых ТБМ токсичности и поиск новых, более совершенных, чем существующие, методов тестирования маркеров. В рамках PSTC сформировано 6 рабочих групп, каждая из которых координирует исследования по изучению и отбору ТБМ токсичности, вызванной введением препаратов, в печени, почках, сердце и сосудах, скелетной мускулатуре, семенниках. Первыми квалифицированными консорциумом маркерами были 7 содержащихся в моче маркеров для доклинических исследований на крысах с целью установления ранних поражений в почках, индуцированных действием препаратов. Лишь небольшое число БМ, используемых при изучении новых лекарств, смогут стать трансляционными.

**Ключевые слова:** биомаркер, трансляционная медицина, трансляционные биомаркеры, токсичность препаратов

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-6-13

### BIOMARKERS OF TRANSLATIONAL MEDICINE

T.V. Osipova, V.M. Bukhman

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

The development of new medicines is one of the priority areas of translational medicine. A significant role for biomarkers (BM) that assess the safety and efficacy of new drugs. The right choice of BM reduces the time and costs necessary for the development of drugs and transfer them to the clinic. The review is devoted to the analysis of modern scientific literature on the role of previously known and newly discovered BM in translational research. Translational BM (TBM) established during preclinical studies and are applicable at all stages of the study. TBM should have a high sensitivity and specificity, be easily measured in real time in an easily accessible biological fluids, to evaluate the same process in different species of animals (including humans), make it possible to compare the results of clinical trials with preclinical. The main role of the TBM toxicity to predict, identify and monitor the toxicity of drugs at all stages of their study. The international consortium (Predictive Safety Testing Consortium, PSTC) whose main task is the qualification of new TBM toxicity and the search for new, more advanced than existing methods for testing markers, was established. Under PSTC formed 6 working groups, each of which coordinates research for the study and selection of TBM toxicity caused by the administration of drugs in the liver, kidney, heart and blood vessels, skeletal muscle, testes. The first qualified consortium markers were 7 contained in the urine markers for preclinical studies on rats with the goal of establishing early lesions in the kidney induced by drugs. Only a small number of BM used in the study of new drugs, can be translational.

**Key words:** biomarker, translational medicine, translational biomarkers, toxicity of drugs

#### Введение

Последние десятилетия характеризуются развитием нового направления в медицине — трансляционной медицины (ТМ). ТМ является биомедицин-

ской дисциплиной и объединяет разнообразные немедицинские и медицинские науки в целях улучшения здоровья человека [1, 2]. Основой ТМ являются трансляционные исследования, иначе называемые

трансляционной наукой (translational science), однако понятие ТМ шире, чем трансляционные исследования, так как кроме фундаментальных разработок и их клинической апробации включает организационные вопросы [1]. Стимулом к проведению трансляционных исследований, как правило, является клинически значимая проблема, которая требует проведения фундаментальных исследований, направленных на установление мишени для диагностики и лечения заболевания или для изучения механизмов обнаруженного явления [3].

Основная задача трансляционных исследований — быстрое внедрение новейших достижений естественных наук и биоинформационных технологий в реальную медицинскую практику [3–6].

Приоритетными задачами ТМ являются [4]:

- разработка методов молекулярной диагностики;
- создание новых медицинских устройств;
- разработка методов генной и клеточной терапии;
- поиск новых лекарственных средств.

Соответственно этим задачам в ТМ выделяют 3 главных направления развития [7]:

- молекулярно-генетическое, основным разделом которого является молекулярная диагностика;
- лечебное, связанное с поиском новых лекарственных средств и методов лечения, а также с профилактикой заболеваний;
- организационные мероприятия по переходу к реализации полученных результатов в здравоохранении.

Любое трансляционное исследование проходит несколько этапов развития, от рабочей гипотезы и до применения в практической медицине. На каждом из этих этапов существенная роль отводится биомаркерам (БМ). Правильный выбор маркера позволяет принять верное решение в ходе исследования, сократить время и снизить затраты, необходимые для разработки препаратов и передачи их в клинику. БМ становятся неотъемлемой частью клинических исследований.

Трансляционные исследования строятся на принципе конгруэнтности, т. е. согласованности между доклинической моделью и болезнью человека [8]. Конгруэнтность включает 3 основных положения:

- согласованность между БМ, используемыми в доклинической и клинической фазах исследования, т. е. мониторируются одни и те же БМ;
- согласованность соотношения между фармакокинетическими и фармакодинамическими маркерами, между доклинической моделью и человеком; механизм действия препарата у человека такой же, как в доклинической фазе;
- согласованность между конечными точками, измеренными в доклинической и клинической фазах испытаний.

### Биомаркеры

БМ давно используются как в медицине, так и при разработке лекарственных средств. В 2001 г. рабочая группа National Institute of Health (США) предложила определение БМ как характеристики, которая может служить индикатором физиологического и патологического биологического процесса или фармакологического ответа на терапевтическое вмешательство. В дальнейшем в это определение было внесено уточнение. БМ — это *объективно исследуемый параметр*, измерение которого отличается высокой точностью, воспроизводимостью и надежностью, что позволяет отражать интенсивность физиологических процессов, состояние здоровья, степень риска или факт развития болезни, ее стадию и прогноз [9]. Параметр может быть химическим, физическим и биологическим.

БМ используются при:

- оценке нормальных физиологических процессов в организме;
- выявлении заболевания и подборе лечения;
- прогнозировании течения, прогрессирования и исхода болезни;
- разработке новых лекарств, установлении их лечебного эффекта и побочного действия, выявлении механизма действия.

Несмотря на большое количество БМ, имеющих разнообразную природу, разработать единую классификацию не удастся. В настоящее время БМ классифицируют в зависимости от цели применения при диагностике и лечении, от исследуемой системы, от вида исследования, специфичности и т. д., поэтому существует несколько вариантов классификации. В зависимости от характеристики БМ их делят на 2 большие группы: молекулярные маркеры и маркеры отображения.

**Молекулярные маркеры** могут быть измерены в биологических средах — сыворотка, плазма, слюна, моча, биопсийный материал и т. д. К ним относятся нуклеиновые кислоты, белки, липиды, ферменты, гормоны и проч. Для обнаружения молекулярных БМ применяют современные методы геномики, протеомики, метаболомики, гликомики, липидомики и т. д. Молекулярные маркеры часто используются на ранних этапах разработки лекарственных средств.

Существует 4 типа молекулярных БМ:

- *геномные* — установленные на основе анализа изменений ДНК (однонуклеотидных полиморфизмов);
- *транскриптомные* — установленные на основе анализа профиля экспрессии РНК;
- *протеомные* — установленные на основе анализа белкового профиля;
- *метаболомные* — основанные на анализе продуктов метаболизма (метаболитов).

В последние годы значительно увеличился класс БМ отображения, которые основаны на технологии формирования изображения. Основное преимущество этих маркеров состоит в том, что они удобны для пациентов (ангиография, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография и т. д.).

Маркеры, используемые при диагностике и лечении лекарственными препаратами и оценивающие эффект терапевтического вмешательства, подразделяются на [10]:

- *диагностические* — используются, чтобы идентифицировать присутствие или отсутствие заболевания, рецидив после операции и проведенного лечения;
- *прогностические* — определяют естественный процесс протекания заболевания, предсказывают исход заболевания независимо от лечения, используются при планировании лечения; эти маркеры связаны с рецидивом, прогрессией и выживаемостью;
- *предиктивные* — связаны с лечением, предсказывают ту группу больных, которые, скорее всего, ответят на специфическое лечение; предиктивные маркеры позволяют на доклинической стадии разработки оценить эффективность и безопасность препаратов;
- *фармакодинамические* — применяются при разработке новых препаратов и позволяют мониторировать ответ организма на введение препарата.

Фармакодинамическими могут быть как диагностические, так и прогностические маркеры [11].

БМ применяются на различных этапах разработки лекарственных препаратов: исследования *in vitro* и *in vivo*, в ранней фазе клинических испытаний.

В 2010 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) выделило 4 категории БМ, которые должны использоваться в процессе разработки новых лекарственных средств: *прогностические, предиктивные, фармакодинамические* и *«суррогатные» конечные точки* [12]. Согласно определению, данному FDA, «суррогатной» конечной точкой в клиническом исследовании считается лабораторный показатель или параметр объективного исследования, который используется как замена клинически значимой конечной точки. При этом предполагается, что изменения, вызываемые в «суррогатной» точке под влиянием терапии, отразятся на истинных конечных точках [9]. Суррогатные конечные точки являются подклассом БМ, оценивающих ожидаемый клинический эффект применяемого лечения.

#### Биомаркеры безопасности и эффективности

При разработке новых препаратов существенная роль принадлежит БМ, оценивающим их безопас-

ность и эффективность. В связи с этим выделяют 2 категории маркеров: *маркеры токсичности* (safety biomarkers или toxicity biomarkers) и *маркеры эффективности* (efficacy biomarkers). Маркеры токсичности являются индикаторами вредных побочных эффектов в системах *in vitro* и *in vivo* на этапе доклинических и клинических испытаний [13]. Эти маркеры тестируются в очень чувствительных тестах, с тем чтобы оценить токсичность как можно раньше, пока она обратима. Важной характеристикой маркера токсичности является корреляция его уровня со степенью тяжести поражения тканей или клеток [14].

Маркеры эффективности используются, чтобы оценить эффективность разрабатываемых препаратов [13]. Предиктивные, прогностические, фармакодинамические и суррогатные маркеры относятся к маркерам эффективности [15]. Процесс разработки новых лекарственных средств является одним из приоритетных направлений ТМ. Этот процесс состоит из нескольких фундаментальных этапов исследования. Первый этап — неклинический — включает открытие, изучение физико-химических свойств нового препарата, обеспечение качества его производства и т. д. Второй этап — доклиническое изучение токсичности (*in vitro* и *in vivo*), биодоступности, проведение фармакокинетических и фармакодинамических исследований, оценивающих потенциальную эффективность препарата. Третий этап — клинический, когда результаты исследований по оценке эффективности и безопасности нового лекарства, полученные на животных, переносятся на человека [16]. Из всех этих этапов переход от исследований на животных к человеку является самым важным и значительным в трансляционных исследованиях. На этом этапе БМ придается особое значение, так как они позволяют установить значимость результатов, полученных на животных, для человека. Исследования на животных позволяют сократить риски, связанные с токсичностью препаратов у человека. Однако известно, что корреляция результатов, полученных при изучении токсичности у животных и у человека, низкая. Так, примерно 40 % препаратов, вызывающих гепатотоксичность у человека, не проявляли ее при тестировании на животных [17].

#### Биомаркеры в трансляционных исследованиях

Особое значение придается БМ на этапе перехода (трансляции) результатов доклинических исследований в клинические. Трансляционный БМ (ТБМ) — это маркер, который может быть применен на этапе как доклинических, так и клинических испытаний. ТБМ устанавливаются во время доклинических испытаний и применяются на всех дальнейших этапах исследований.

Упор делается на ТБМ, присутствующие в биологических жидкостях (кровь, моча, слюна и т. д.), так как их легко получить в клинических условиях [11]. Выделяют несколько этапов изучения новых БМ в трансляционных исследованиях [18]:

- *открытие* нового маркера, основывающееся на глубоком изучении заболевания, необходимости его диагностики и лечения;
- *идентификация и характеристика* — молекулярная и биохимическая характеристики маркера, необходимые для разработки тест-системы; обнаружение различных молекулярных форм маркера и изучение их роли в диагностике и лечении;
- *валидация* — многосторонние исследования, определяющие диагностическую чувствительность и специфичность маркера;
- *стандартизация* — процесс внедрения нового БМ в лабораторные тесты. Оценка аналитических характеристик теста, точности и воспроизводимости измерений, определение чувствительности и т. д.;
- *применение в клинике*.

ТБМ особенно важны на ранних этапах доклинической разработки препаратов. Их основная роль состоит в правильном отборе препаратов и их доз, а также в мониторинге токсичности. Кроме того, ТБМ должны использоваться на первых этапах испытаний у человека, чтобы отслеживать и определять токсичность на ранних стадиях, когда токсические эффекты обратимы.

ТБМ должны обладать следующими характеристиками [11]:

- иметь высокие чувствительность и специфичность, которые должны быть выше, чем у БМ, применяемых в настоящее время;
- измеряться с помощью надежных тест-систем у разных видов животных, используемых в трансляционных исследованиях (мыши, крысы, собаки, обезьяны и т. д.), в том числе и у человека; измерения должны быть воспроизводимы;
- легко измеряться в реальном времени, и это измерение не должно быть дорогим;
- быть неинвазивными или малоинвазивными, определяться в легкодоступных биологических средах (кровь, моча, слюна и т. д.);
- иметь установленный стабильный уровень в норме;
- уровень маркера должен отражать степень тяжести морфологических нарушений у животных и у человека;
- одинаково характеризовать процесс у разных видов животных и давать возможность сравнивать результаты клинических исследований с доклиническими.

Основная цель тестирования новых лекарственных препаратов на животных заключается в определении

их безопасности. ТБМ играют важную роль в таких исследованиях, так как они могут предсказать (predict), определить (detect) и отследить (monitor) токсичность, индуцированную препаратами, на всех этапах испытаний [19]. Для того чтобы используемый маркер мог правильно предсказать эффективность и безопасность препарата у больного, он должен быть тщательно валидирован и квалифицирован. Применение невалидированных и невалидированных маркеров приводит к ошибочным результатам (потеря полезного препарата или одобрение и внедрение неэффективного). В связи с этим валидация и квалификация БМ являются важными этапами их изучения с целью выбора маркеров для скрининга препаратов [20]. На сегодняшний день проблемы, связанные с валидацией, рассматриваются как самый существенный барьер при использовании данных измерений маркера, полученных в ходе разработки препаратов [13].

В 2006 г. на базе The Critical Path Institute (C-Path) был создан консорциум Predictive Safety Testing Consortium (PSTC), основной задачей которого является квалификация новых ТБМ токсичности для использования их в доклинических и ранних клинических испытаниях новых препаратов [21]. Все исследовательские программы PSTC сосредоточены на поиске и отборе новых маркеров токсичности [12], а также разработке более совершенных, чем существующие, методов их тестирования. В структуре PSTC создано 6 рабочих групп, каждая из которых координирует исследования по изучению и отбору БМ токсичности, вызванной введением препаратов, в печени, почках, скелетной мускулатуре, сердце и сосудах, семенниках. При этом стратегия исследований опирается на трансляционный подход и преимущество имеют БМ из биологических жидкостей [21].

В 2008 г. PSTC предложил на рассмотрение FDA и European Medicines Agency набор из 7 уринальных маркеров для доклинических исследований с целью установления ранних поражений в почках, индуцированных действием препаратов (drug-induced kidney injury, DIKI). К их числу относятся: KIM-1, альбумин, общий белок,  $\beta_2$ -микроглобулин, цистатин С, кластерин и tff-3. Вместе с традиционными клиническими маркерами (сывороточный креатинин, азот мочевины крови) и гистологическим исследованием эти БМ включены в доклинические токсикологические исследования на крысах. Данные маркеры способны устанавливать поражения в различных отделах нефрона. KIM-1, альбумин, кластерин, tff-3 являются маркерами тубулярных нарушений в почках, а общий белок,  $\beta_2$ -микроглобулин, цистатин С — маркерами гломерулярных поражений с последующим вовлечением в патологический процесс тубулярного отдела [22]. Указанные выше маркеры DIKI

включены в стандарт Good Laboratory Practice (GLP). Дополнительно к этим 7 маркерам рассматриваются такие маркеры, как GST- $\alpha$ , NAG и NGAL [23].

Стандартными БМ поражений печени, индуцированных препаратами (ППИП), являются аланин-аминотрансфераза (АЛТ) и аспаратаминотрансфераза (АСТ), а также щелочная фосфатаза (ЩФ), гамма-глутамилтрансфераза и общий билирубин. Повышение активности АЛТ, АСТ и ЩФ свидетельствует о поражении гепатоцитов и клеток желчных протоков, а изменения уровня общего билирубина — о функциональных нарушениях печени. Однако эти маркеры имеют низкие специфичность и чувствительность. Отсутствует корреляция между уровнем этих маркеров в сыворотке и степенью тяжести морфологических поражений. В связи с этим нужны другие маркеры, способные рано предсказывать развитие ППИП и отличать поражения печени от поражений скелетной мускулатуры [24]. В последние годы были предложены новые маркеры ППИП: глутаматдегидрогеназа (ГлДГ), малатдегидрогеназа (MDH), paraoxonase/arylesterase (PON-1), purine nucleoside phosphorylase (PNP), аргиназа (ARG-1), сорбитолдегидрогеназа (СД) и glutathione S-transferase (GST- $\alpha$ ) [21, 25]. В качестве потенциальных БМ ранних стадий ППИП рассматриваются микроРНК (miRNA). В исследованиях К. Wang и соавт. на мышах, которым вводили ацетаминофен, было показано, что miR-122 и miR-192 в плазме могут оцениваться как информативные и чувствительные маркеры ППИП [26].

Традиционными маркерами выявления токсичности, оказываемой препаратами на скелетную мускулатуру, являются АСТ и креатинкиназа (КК) в сыворотке. Эти маркеры имеют низкую специфичность и чувствительность. PSTC были предложены 4 новых, более чувствительных и специфичных маркера дегенеративных и некротических поражений скелетной мускулатуры: myosin light chain 3 (Myl3), skeletal muscle troponin 1 (sTn1), fatty acid binding protein 3 (FABP3), КК мышечного типа (СК-М, гомодимер СК-ММ). Указанные маркеры, рекомендованные для установления ранних токсических поражений скелетной мускулатуры у крыс-самцов, должны использоваться в исследованиях совместно с АСТ и КК сыворотки крови [21]. Предполагается, что эти новые квалифицированные маркеры будут обладать трансляционными свойствами и результаты, полученные в исследованиях на животных, могут быть перенесены на человека.

Известно, что 5–10 % разрабатываемых препаратов вызывают токсические поражения сосудов (препарат-индуцированные поражения сосудов, ПИПС), которые характеризуются появлением геморагий, воспалительной реакции, нарушений эндотелия и гладкой мускулатуры сосудов. Маркеры,

используемые для установления ранних поражений сосудов у животных и человека, представлены маркерами поражения клеток эндотелия и гладкой мускулатуры. В настоящее время в качестве перспективных рассматриваются такие маркеры, как VEGF, GRO/CINC-1, TIMP-1, vWgpp, NGAL, TSP-1,  $\alpha$ -актин гладкой мускулатуры, кальпонин и трансгелин [21, 25]. Ввиду морфологической схожести сосудистых поражений у человека и крысы предполагается, что маркеры ПИПС, применяемые на этапе доклинических испытаний, могут быть использованы в исследованиях на человеке [27].

В настоящее время в качестве трансляционных маркеров ПИПС предполагается использовать miRNA, эндотелиальные микрочастицы и методы визуализации [27].

Кардиотоксичность, так же как и гепатотоксичность, зачастую является серьезной проблемой при разработке лекарственных препаратов. В течение многих лет для диагностики кардиотоксичности применяют такие сывороточные маркеры, как лактатдегидрогеназа, КК, АСТ. Однако они обладают низкими чувствительностью и специфичностью. Широкое применение получили следующие маркеры: креатинкиназа-МВ (СК-МВ), миоглобин, гомоцистеин, С-реактивный белок и тропонины — тропонин Т (сTnT) и тропонин I (сTnI). В последние годы к этому списку добавились новые маркеры — мозговой натрийуретический пептид (NT-proANP), интерлейкин-6, миелопероксидаза, растворимый лиганд CD40. Изучение miRNA при различных заболеваниях сердца показало, что они могут рассматриваться как полезные маркеры для диагностики и мониторинга сердечно-сосудистых заболеваний. Установлено, что miRNA-133 и miRNA-1 являются важными маркерами гипертрофии сердца. В исследованиях Т.Е. Callis и соавт. было показано, что у мышей miRNA-208 является регулятором сердечной гипертрофии [28]. Сердечные тропонины сTnT и сTnI широко используются при диагностике острой сердечной недостаточности и инфаркта миокарда у человека и являются чувствительными и специфичными маркерами острых поражений сердечной мышцы у различных лабораторных животных, включая грызунов, кроликов, собак и нечеловекообразных приматов [29]. Исследования последних лет показывают, что тропонины являются полезными маркерами кардиотоксичности, вызванной лекарственными препаратами [30], и обладают рядом характеристик, присущих идеальным трансляционным маркерам [31]. Сердечный тропонин является примером БМ с обратной трансляцией (reverse translation) — от человека к животным. В 2008 г. был сделан запрос в FDA о квалификации сердечного тропонина как сывороточного маркера для доклинических токсикологических

исследований [32]. Исследования Р. Clements и соавт. (2010) на крысах показали, что в качестве трансляционного маркера кардиотоксичности может использоваться FABP-H (fatty acid binding protein) — белок, связанный с внутриклеточным транспортом жирных кислот [33]. FABP-H проявил себя как хороший ранний маркер кардиотоксичности у крыс, хотя чувствительность и специфичность этого маркера были ниже, чем у тропонина. Основным недостатком FABP-H как БМ — это отсутствие специфичности при наличии мышечной травмы и почечной недостаточности.

На сегодняшний день не существует ни одного маркера, который может рассматриваться в качестве трансляционного маркера для выявления токсичности, оказываемой на репродуктивную систему [21]. Токсичность новых препаратов изучается по их влиянию на сперматогенез, и в качестве маркеров используются гормоны — лютеинизирующий гормон (ЛГ), тестостерон, фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) и ингибин В. Однако ЛГ, ФСГ и тестостерон обладают низкой чувствительностью. Среди лабораторных животных, таких как мыши, кролики, крысы и обезьяны, крысы являются самой подходящей моделью для изучения тестикулярной токсичности [34, 35]. В настоящее время ингибин В рассматривается HESI\* как потенциальный неинвазивный БМ для оценки поражений сперматогенеза у крыс.

Рабочая группа PSTC по изучению маркеров токсичности препаратов в отношении репродуктивной системы исследует применимость сывороточных miRNA в качестве БМ тестикулярных поражений [25].

Своевременная, быстрая диагностика нейротоксичности лекарственных препаратов чрезвычайно важна. Для этого нужны высокочувствительные и специфичные маркеры, обладающие свойствами трансляционных маркеров, способных предсказать нейротоксичность как у животных, так и у человека [36]. Функции нервной системы сложны, и их БМ являются самые различные показатели. В качестве БМ для оценки дисфункции центральной нервной системы, вызываемой нейротоксическими веществами, используют как нейрофизиологические (электроэнцефалография), так и нейроповеденческие тесты. Широко применяются неинвазивные методы — компьютерная томография, ядерный магнитный резонанс, позитронная эмиссионная томография [37].

Однако эти методы дороги и малопригодны для оценки состояния спинного мозга, изменений в нерв-

ных клетках и мышцах. В последние годы большое внимание уделяется изучению и использованию БМ, присутствующих в жидких средах организма. Для диагностики нейротоксичности маркеры, присутствующие в спинномозговой жидкости (СМЖ), считаются особенно ценными, поскольку при заболеваниях центральной нервной системы происходят изменения в составе СМЖ [36].

Среди этих маркеров можно выделить: mi-RNA, F2-isoprostanes, глиальный фибриллярный кислый белок (ГФКБ), microtubule-associated protein (MAP-2), основной белок миелина (ОБМ), белок tau, нейрофиламенты, spectrin breakdown product (SBDP-145), транслокационный протеин (TSPO), ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1). Данные маркеры требуют дальнейшего изучения и валидации.

ГФКБ, являющийся маркером поражения астроглии, рассматривается как ключевой маркер для оценки нейротоксичности. Его уровень повышается в некоторых отделах головного мозга животных, пораженных нейротоксическими веществами. Перспективным направлением для изучения токсического эффекта различных препаратов и химических агентов на нервную систему считается разработка геномных и протеомных микрочипов [38].

### Заключение

Разработка новых лекарственных средств является одним из приоритетных направлений ТМ. На каждом этапе трансляционного исследования, от рабочей гипотезы и до применения в практической медицине, существенная роль отводится БМ. В 2010 г. FDA выделило 4 категории БМ, которые должны использоваться в процессе разработки новых лекарственных средств: прогностические, предиктивные, фармакодинамические и «суррогатные» конечные точки.

Переход от исследований на животных к человеку является самым важным и значительным в трансляционных исследованиях. На этом этапе БМ придается особое значение, так как они позволяют установить значимость для человека результатов, полученных на животных. ТБМ устанавливаются во время доклинических испытаний и применяются на всех этапах исследований. Особенно важна роль ТБМ на ранних этапах разработки лекарственных препаратов, так как с помощью них можно отбирать лучшие препараты и их дозы, отслеживать и предсказывать токсичность. Наиболее перспективными трансляционными маркерами считаются маркеры, присутствующие

\*HESI (The Health and Environmental Sciences Institute) организован в 1998 г. и является координирующей организацией по решению глобальных задач здравоохранения и окружающей среды. Комитеты HESI контролируют ответственность за определение исследовательских тем, разработку программ исследования, интерпретацию результатов исследования и их применение.

в жидких средах организма, так как их легко получить в клинических условиях (кровь, моча, слюна, СМЖ и т. д.). ТБМ должны обладать высокой специфичностью и чувствительностью, измеряться с помощью надежных тест-систем у разных видов животных, используемых в трансляционных исследованиях, уровень маркера должен коррелировать с тяжестью морфологических нарушений у животных и у человека. ТБМ должны иметь установленный стабильный уровень в норме, одинаково оценивать процесс у разных видов животных, что позволит сравнивать результаты клинических исследований с доклиническими. Валидация и квалификация БМ являются важными этапами их изучения с целью выбора маркеров для использования в скрининге эффективных и безопасных препаратов. Применение невалифицированных и невалидированных маркеров приводит к ошибочным результатам (потеря полезного препарата или одобрение неэффективного).

Основными задачами созданного в 2006 г. консорциума PSTC являются квалификация новых ТБМ токсичности для использования их в доклинических и ранних клинических испытаниях новых препара-

тов, а также поиск новых, более совершенных, чем существующие, методов тестирования БМ. В структуре PSTC создано 6 рабочих групп, каждая из которых координирует исследования по изучению и отбору БМ токсичности, вызванной введением препаратов, в печени, почках, сердце, скелетной мускулатуре, сосудах, семенниках. Первыми квалифицированными консорциумом маркерами были 7 уринальных маркеров для доклинических исследований с целью установления ранних поражений в почках, индуцированных действием препаратов (drug-induced kidney injury — DIKI). К их числу относятся: КИМ-1, альбумин, общий белок,  $\beta_2$ -микроглобулин, цистатин С, кластерин и tff-3. Вместе с традиционными клиническими маркерами (сКР, АМК) и гистологическим исследованием эти БМ включены в предклинические токсикологические исследования на крысах. Эти маркеры способны улавливать поражения в различных отделах нефрона. КИМ-1, альбумин, кластерин, tff-3 являются маркерами тубулярных нарушений в почках, а общий белок,  $\beta_2$ -микроглобулин, цистатин С — маркерами гломерулярных поражений с последующим вовлечением в патологический процесс тубулярного отдела.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Ипатов О. М., Медведева Н. В., Арчаков А. И. и др. Трансляционная медицина — путь от фундаментальной биомедицинской науки в здравоохранение. Вестник Российской академии медицинских наук 2012;(6):1–9.
- Пальцев М. А., Бедушкина Н. Н. Трансляционная медицина — новый этап развития молекулярной медицины. Молекулярная медицина 2012;(4):1–4.
- Шляхто Е. В. Трансляционные исследования как модель развития современной медицинской науки. Трансляционная медицина 2014;(1):5–18. DOI: 10.18705/2311-4495-2014-0-1-5-18.
- Пономаренко Г. Н. Концепция трансляционной медицины в физиотерапии и реабилитации. Медицинский академический журнал 2013; 13(1):98–106.
- Wang W. Global health and translational medicine: new drivers for medicine and medical sciences. J Med Med Sci 2012;3(3):126–7.
- Homer-Vanniasinkam S., Tsui J. The continuing challenges of translational research: clinician-scientists' perspective. Cardiol Res Pract 2012;2012:246710. DOI: 10.1155/2012/246710. PMID: 23050194.
- Колбин А. С., Гапешин Р. А., Малышев С. М. Современные подходы к организации трансляционных исследований. Педиатрическая фармакология 2014;11(3):15–9. DOI: 10.15690/pf.v11i3.1002.
- Feuerstein G. Z., Chavez J. Translational medicine for stroke drug discovery. The pharmaceutical industry perspective. Stroke 2009;40(3):121–5. DOI: 10.1161/STROKEAHA.108.535104. PMID: 19064772.
- Atkinson A. J., Colburn W., Degrutta V. et al. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definition and conceptual framework. Clin Pharmacol Ther 2001;69(3):89–95. DOI: 10.1067/mcp.2001.113989. PMID: 11240971.
- Ansari D., Aronsson L., Sasor A. et al. The role of quantitative mass spectrometry in the discovery of pancreatic cancer biomarkers for translational science. J Transl Med 2014;12:87. DOI: 10.1186/1479-5876-12-87. PMID: 24708694.
- Beger R. D., Bhattacharyya S., Yang X. et al. Translational biomarkers of acetaminophen-induced acute liver injury. Arch Toxicol 2015;89(9):1497–522. DOI: 10.1007/s00204-015-1519-4. PMID: 25983262.
- Dennis E. H., Walker E. G., Baker A. F. et al. Opportunities and challenges of safety biomarker qualification: perspectives from the predictive safety testing consortium. Drug Dev Res 2013;74(2):112–26. DOI: 10.1002/ddr.21070.
- DeCaprio A. P. Introduction to toxicologic biomarkers. In: Toxicologic biomarkers. Ed. by A. P. DeCaprio. New York, London: Taylor & Francis group, 2006. P. 1–12.
- Tarrant J. M. Blood cytokines as biomarkers of in vivo toxicity in preclinical, safety, assessment: considerations for their use. Toxicol Sci 2010;117(1):4–16. DOI: 10.1093/toxsci/kfq134. PMID: 20447938.
- Halim A. B. Biomarkers in drug development: A useful tool but discrepant results may have a major impact. In: Drug discovery and development — present and future. Ed. by I. Kapetanović. In Tech, 2011. P. 401–30. DOI: 10.5772/27526.
- Cosmatos D., Chow S. C. Translational medicine. Strategies and statistical methods. CRC Press, 2009. P. 1–9.

17. Zhang M., Chen M., Tong W. Is toxicogenomics a more reliable and sensitive biomarker than conventional indicators from rats to predict drug-induced liver injury in humans? *Chem Res Toxicol* 2012;25(1):122–9. DOI: 10.1021/tx200320e. PMID: 22122743.
18. Wehling M. Development of biomarkers. In: *Principles of translational science in medicine: From bench to bedside*. Ed. by M. Wehling. 2<sup>nd</sup> edn. Academic Press, 2015. P. 145–9.
19. Мирошниченко И.И., Птицина С.Н. Биомаркеры в современной медико-биологической практике. *Биомедицинская химия* 2009;55(4):425–40.
20. Predictive approaches in drug discovery and development: Biomarkers and in vitro/in vivo correlations. Ed. by J.A. Williams, R. Lalonde, J.R. Koup, D.D. Christ. John Wiley & Sons, Inc., 2012. 408 p.
21. Sauer J.M., Walker E.G., Porter A.C. The Predictive Safety Testing Consortium: safety bio-markers collaboration, and qualification. *J Med Dev Sci* 2016;1(1):34–45. DOI: 10.18063/JMDS.2015.01.007.
22. Ozer J.S. A guidance for renal biomarker lead optimization and use in translational pharmacodynamics. *Drug Discov Today* 2010;15(3–4):142–7. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.12.001. PMID: 20026239.
23. Goodsaid F.M., Blank M., Dieterle F. et al. Novel biomarkers of acute kidney toxicity. *Clin Pharmacol Ther* 2009;86(5):490–6. DOI: 10.1038/clpt.2009.149. PMID: 19710639.
24. Antoine D.J., Lewis P.S., Goldring C.E., Park B.K. Are we closer to finding biomarkers for identifying acute drug-induced liver injury? *Biomark Med* 2013;7(3):383–6. DOI: 10.2217/bmm.13.42. PMID: 23734798.
25. Campion S., Aubrecht J., Boekelheide K. et al. The current status of biomarkers for predicting toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013;9(11):1391–408. DOI: 10.1517/17425255.2013.827170. PMID: 23961847.
26. Wang K., Zhang S., Marzolf B. et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106(11):4402–7. DOI: 10.1073/pnas.0813371106. PMID: 19246379.
27. Mikaelian I., Cameron M., Dalmas D.A. et al. Nonclinical safety biomarkers of drug-induced vascular injury: current status and blueprint for the future. *Toxicol Pathol* 2014;42(4):635–57. DOI: 10.1177/0192623314525686. PMID: 24777748.
28. Callis T.E., Pandya K., Seok H.Y. et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest* 2009;119(9):2772–86. DOI: 10.1172/JCI36154. PMID: 19726871.
29. Berridge B.R., Pettit S., Walker D.B. et al. A translational approach to detecting drug-induced cardiac injury with cardiac troponins: consensus and recommendations from the Cardiac Troponins Biomarker Working Group of the Health and Environmental Sciences Institute. *Am Heart J* 2009;158(1):21–9. DOI: 10.1016/j.ahj.2009.04.020. PMID: 19540388.
30. Wallace K.B., Hausner E., Herman E. et al. Serum troponins as biomarkers of drug-induced cardiac toxicity. *Toxicol Pathol* 2004;32(1):106–21. DOI: 10.1080/01926230490261302. PMID: 14713555.
31. O'Brien P.J. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology* 2008;245(3):206–18. DOI: 10.1016/j.tox.2007.12.006. PMID: 18249481.
32. Reagan W.J. Troponin as a biomarker of cardiac toxicity: past, present, and future. *Toxicol Pathol* 2010;38(7):1134–7. DOI: 10.1177/0192623310382438. PMID: 20884820.
33. Clements P., Brady S., York M. et al. Time course characterization of serum cardiac troponin, heart fatty acid binding protein and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol Pathol* 2010;38(5):703–14. DOI: 10.1177/0192623310374969. PMID: 20585145.
34. Moffit J.S., Her L.S., Mineo A.M. et al. Assessment of inhibin B as a biomarker of testicular injury following administration of carbendazim, cetorelix, or 1,2-dibromo-3-chloropropane in Wistar Han rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2013;98(1):17–28. DOI: 10.1002/bdrb.21045. PMID: 23364888.
35. Stewart J., Turner K.J. Inhibin B as a potential biomarker of testicular toxicity. *Cancer Biomark* 2005;1(1):75–91. DOI: 10.3233/CBM-2005-1109. PMID: 17192034.
36. Roberts R.A., Aschner M., Calligaro D. et al. Translational biomarkers of neurotoxicity: a Health and Environmental Sciences Institute perspective on the way forward. *Toxicol Sci* 2015;148(2):332–40. DOI: 10.1093/toxsci/kfv188. PMID: 26609132.
37. Биомаркеры и оценка риска: концепции и принципы. Совместное издание программы ООН по окружающей среде, международной организации труда и Всемирной организации здравоохранения. Выпущено издательством «Медицина» по поручению МЗ РФ. Женева: Всемирная организация здравоохранения, 1996. 54 с.
38. O'Callaghan J.P., Sriram K. Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 2005;4(3):433–42. DOI: 10.1517/14740338.4.3.433. PMID: 15934851.

# ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И СЫВОРОТОЧНЫХ ОНКОМАРКЕРОВ ПРИ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.А. Рябчиков<sup>1</sup>, И.А. Дудина<sup>2</sup>, И.К. Воротников<sup>1</sup>, Д.А. Денчик<sup>1</sup>, А.С. Шушарин<sup>1</sup>, Э.И. Абдуллаева<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Денис Анатольевич Рябчиков dr.denisr@mail.ru

*В настоящее время маммография — основной скрининговый метод диагностики рака молочной железы (РМЖ); но процесс канцерогенеза начинается задолго до появления визуализируемого новообразования. Поэтому для успешной ранней диагностики РМЖ у населения необходим системный подход, который будет затрагивать все этапы развития опухоли. В статье на примере РМЖ — социально значимого заболевания — обсуждаются перспективы интеграции недавних научных достижений онкогенетики и протеомики со стандартными методами. Рассмотрены возможности применения генетических исследований, сывороточных онкомаркеров и лучевых методов при ранней диагностике РМЖ, а также представлены потенциальные варианты, которые могут быть использованы при ведении таких пациентов.*

**Ключевые слова:** рак молочной железы, ранняя диагностика, онкомаркеры, скрининг, профилактика

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-14-22

## POSSIBILITIES OF APPLICATION OF GENETIC AND SERUM ONCOMARKERS IN EARLY DIAGNOSTICS OF BREAST CANCER

D.A. Ryabchikov<sup>1</sup>, I.A. Dudina<sup>2</sup>, I.K. Vorotnikov<sup>1</sup>, D.A. Denchik<sup>1</sup>, A.S. Shusharin<sup>1</sup>, E.I. Abdullaeva<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Sechenov University, Bldg. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

*Currently, mammography is the main screening method for diagnosing breast cancer (BC); but the process of carcinogenesis begins long before the appearance of a visualized tumor. For successful early diagnosis of breast cancer, a systematic approach is required, that includes all stages of tumor development. On the example of BC we consider the possibilities of integrating the recent scientific achievements of oncogenetics and proteomics with standard methods. In this article we investigate the possibilities of using genetic research, serum cancer markers and radiation methods for early diagnosis of BC. This article also presents potential options for managing high-risk development of this disease.*

**Key words:** breast cancer, early diagnosis, oncomarkers, screening, prevention

### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место по заболеваемости и смертности в структуре онкопатологий у женщин. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире ежегодно регистрируется более 1,4 млн впервые выявленных случаев рака данной локализации; в России в 2016 г. было зафиксировано 87,1 случая впервые выявленного РМЖ на 100 000 женского населения [1]. Наиболее высокий процент летальности отмечается у пациентов с III и IV стадиями РМЖ, но и при ранних стадиях проблема прогрессирования и, как следствие,

высокой смертности актуальна [2]. Как правило, женщины узнают о своем диагнозе после проведенной маммографии на приеме у врача, к которому обращаются с жалобами на обнаружение уплотнения при самообследовании. Увеличение заболеваемости, омоложение, семейность — угрожающие тенденции последнего десятилетия. Считается, что контролировать (уменьшать) рост РМЖ невозможно, поэтому повышение эффективности ранней диагностики — важнейший и начальный этап преодоления проблемы высокой смертности, что и определяет в большинстве случаев благоприятный прогноз.

В последние десятилетия для пациентов с онкологическими заболеваниями разрабатываются персонализированные подходы к лечению. После окончания проекта «Геном человека» в 2003 г. стало ясно, что популяционный подход к лечению заболеваний, особенно онкологических, часто бывает неэффективным ввиду большого разнообразия геномных, протеомных, транскриптомных вариантов среди пациентов. Персонализированная медицина предлагает совершенно новый подход, основанный на индивидуальных характеристиках каждого человека. Несмотря на распространенное мнение о заведомо высокой стоимости необходимого оборудования и сложности технологий, доказано, что в конечном счете использование персонализированного подхода ведет к существенной экономии расходов на медицинскую помощь (при правильно поставленном диагнозе и соответствующем выборе тактики лечения затраты резко сокращаются) [3]. Но такой подход работает только на больших группах пациентов, что требует введения новых технологий в повседневную практику.

Ученые всего мира сходятся во мнении, что не существует единого эффективного метода диагностики, онкомаркера при РМЖ, как, например, простатический специфический антиген при раке предстательной железы. Поэтому для успешной ранней диагностики РМЖ у населения необходим системный подход, включающий как выявление пациентов на доклинической стадии, так и определение групп высокого риска развития этой патологии в будущем. В данной статье на примере РМЖ — социально значимого заболевания — обсуждаются перспективы интеграции недавних научных достижений онкогенетики и протеомики со стандартными методами. Рассмотрены возможности применения генетических исследований, сывороточных онкомаркеров и лучевых методов при ранней диагностике РМЖ.

#### Генетическое тестирование и консультация

Все случаи РМЖ по этиологии можно разделить на 3 группы: спорадические (70–75 %), наследственно обусловленные (5–10 %) и семейные (15–20 %) [4]. Таким образом, пациенты с наследственной или семейной формой РМЖ встречаются в 20–30 % случаев. Генетическое тестирование и консультация направлены именно на выявление этой группы больных, так как на сегодняшний день проведено большое количество исследований и детерминированы некоторые гены, обуславливающие предрасположенность к развитию РМЖ.

Последние 20 лет изучение генетических аспектов РМЖ в большей части было направлено на анализ *BRCA1*- и *BRCA2*-мутаций. Поэтому касательно *BRCA*-ассоциированного РМЖ научное сообщество

имеет достаточно большое количество систематизированной информации. Но только 20–30 % случаев наследственно обусловленного и семейного РМЖ связано с *BRCA*-мутациями. Это составляет примерно 5–7 % из возможных 25 %, которые можно идентифицировать методами генетического тестирования и консультации [4]. Но существуют и другие гены, клинически значимые мутации в которых определяют риски развития РМЖ и прогноз при наличии этого новообразования [5–8]. Наиболее перспективными генами являются: *CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN* и, конечно, *BRCA1* и *BRCA2*. Исследуемые гены можно разделить на 2 группы: высокопенетрантные (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*) и умеренно-пенетрантные (*CHEK2*, *ATM*, *PALB2*). Рассмотрим роль каждого гена в развитии РМЖ и проведем стратификацию рисков.

Еще в 1994 г. было установлено, что семейные случаи РМЖ связаны с мутациями гена — супрессора опухоли *BRCA1* (*BR*east *C*ancer *1*), нормальный продукт которого отвечает за репарацию поврежденной ДНК. Аналогичная функция годом позже была обнаружена и у гена *BRCA2* (*BR*east *C*ancer *2*). Также известно, что белковый продукт гена *BRCA1* участвует в созревании, дифференцировке, трансформации стволовой клетки в эстрогенпозитивную [9]. Поэтому *BRCA*-ассоциированный РМЖ часто является трижды негативным и отличается более агрессивным течением, нетипичной метастатической картиной, отсутствием целенаправленной терапии в сравнении с остальными молекулярными типами РМЖ [10]. Распространенность *BRCA1* колеблется от 1:500 до 1:1000, *BRCA2* — от 1:250 до 1:500 и различается в зависимости от исследуемой этнической группы (например, в популяции евреев-ашкенази частота мутаций составляет 1/40). *BRCA1* и *BRCA2* — высокопенетрантные гены, поэтому риск развития РМЖ в раннем возрасте (до 40 лет) намного выше и далее постоянно увеличивается (до 74–87 % к 80 годам) [11, 12]. Для сравнения, риск развития РМЖ в 50 лет без *BRCA*-мутаций — 5 %, при наличии одной из клинически значимых мутаций в этих генах — почти 50 % (рис. 1).

**P53** — ключевой белок — супрессор опухолевого роста, кодируемый геном *TP53*. В 50 % случаев рака любой локализации встречаются мутации этого гена, но их значение в большинстве случаев однозначно не определено [14]. При анализе мутации *TP53* важно определить ее этиологию — генеративная или соматическая.

Синдром Ли–Фраумени, обусловленный генеративной мутацией, клинически характеризуется высокой частотой появления различных типов опухолей в раннем возрасте (саркомы мягких тканей, РМЖ, остеогенные саркомы, опухоли головного мозга и надпочечников). Он имеет аутосомно-доминантный тип

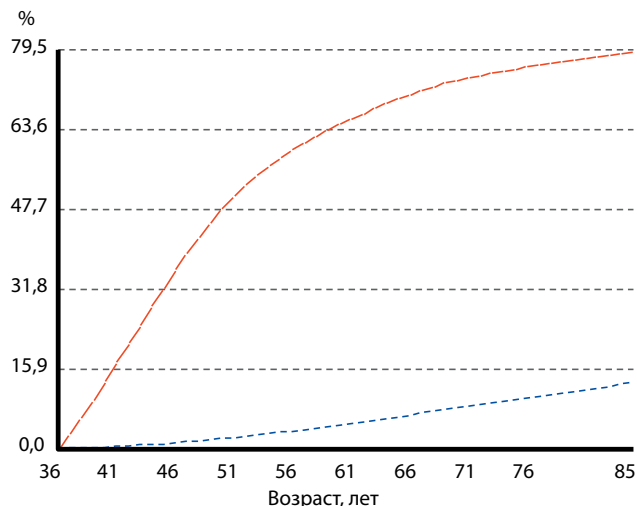


Рис. 1. Риск развития РМЖ при диком типе гена *BRCA* (синий пунктир) и при его мутациях (красный пунктир) (адаптировано из [13])

наследования и высокую пенетрантность: у 26–53 % пациенток обнаруживается РМЖ до 45 лет [6]. РМЖ при синдроме Ли–Фраумени — самая часто встречающаяся опухоль у женщин в возрасте от 20 до 40 лет [15, 16]. Риск развития РМЖ до 40 лет, по разным оценкам, при этом синдроме выше в 18–25 раз. Тем не менее общий вклад генеративных мутаций *TP53* в развитие РМЖ среди всех пациентов ничтожно мал, а при ранних случаях (до 40 лет) распространенность РМЖ, обусловленного синдромом Ли–Фраумени, составляет не более 0,5–3,0 % [6, 17]. По другим данным, генеративная мутация *TP53* (синдром Ли–Фраумени/критерий Chompret) может способствовать развитию до 17 % всех семейных случаев РМЖ [18].

Соматические мутации *TP53* обнаруживаются в 20–60 % случаев РМЖ [5, 6, 19–21], потеря гетерозиготности — в 30–42 % [19]. В эпоху геномного секвенирования роль соматических мутаций *TP53* была пересмотрена. Более 20 % мутаций происходит за пределами ДНК-связывающего домена, поэтому их влияние на канцерогенез маловероятно [22]. Наиболее изучена прогностическая роль соматических мутаций [20, 23, 24]. В случае выявления мутации *TP53* в обязательном порядке должен быть увеличен объем диагностических тестов.

*PTEN*-мутация также связана с высоким риском развития РМЖ. Существует множество вариантов клинически значимых генеративных мутаций в этом гене, некоторые из которых объединены в синдромы. Синдром Коудена является редким (1:1 000 000) ауто-сомно-доминантным заболеванием. Он характеризуется множественным образованием гамартом, а также высокой частотой развития РМЖ, рака эндометрия матки и щитовидной железы (рис. 2) [5]. Также при мутации в этом гене возникают поражения слизистых

оболочек и кожи, пороки щитовидной железы, фиброзно-кистозная мастопатия, гамартмы желудочно-кишечного тракта. При наличии *PTEN*-мутации вероятность появления РМЖ в течение жизни достигает 67–85 % [24, 25].

Зародышевые и соматические мутации гена *PTEN* при спорадических случаях РМЖ редки [6, 21]. Потеря гетерозиготности в локусе *PTEN* встречается в 11–41 % спорадических случаев РМЖ [6], но роль этих изменений не установлена [6, 19].

*PALB2*-мутация ассоциирована с повышенным риском развития РМЖ и опухолей поджелудочной железы. Среди всех вышеперечисленных мутаций ее роль была обнаружена сравнительно недавно — в 2007 г., поэтому информация о распространенности *PALB2*-мутации и риске развития РМЖ неоднозначна. В связи с этим необходимо отнести данный ген к умеренно-пенетрантным, хотя некоторые исследователи сравнивают пенетрантность *PALB2* с *BRCA2* [27]. Интересно отметить, что белковый продукт гена *BRCA2* является связывающимся партнером для белка гена *PALB2* [28].

Большинство исследований указывают, что риск развития РМЖ в 2–6 раз выше при наличии мутации в гене *PALB2* [29]. По другим данным, риск РМЖ для женщин — носителей мутации *PALB2* по сравнению с населением в целом в 8–9 раз выше среди лиц моложе 40 лет, в 6–8 раз — среди женщин от 40 до 60 лет и в 5 раз — после 60 лет [30]. Абсолютный риск РМЖ для носителей *PALB2*-мутаций в 70 лет составляет 33 %, а при отягощенном семейном онкологическом анамнезе (2 и более случая РМЖ до 50 лет) — 58 % (рис. 3) [30]. Последние исследования указывают на значительную роль гена *PALB2* для группы пациентов с наследственным *BRCA*-негативным РМЖ [31].

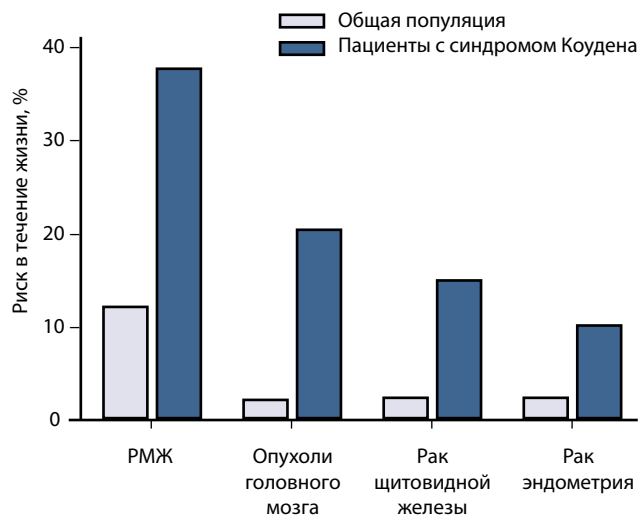


Рис. 2. Риски развития РМЖ и других онкологических заболеваний при синдроме Коудена в сравнении с общей популяцией (адаптировано из [26])

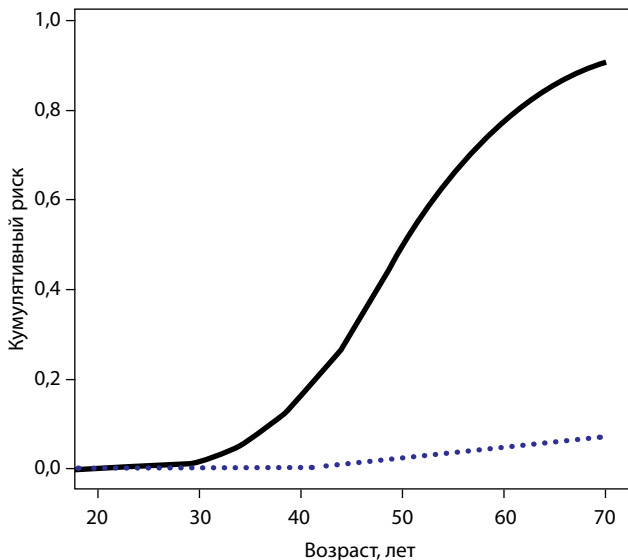


Рис. 3. Риск развития РМЖ при PALB2-мутации (сплошная линия) в сравнении с общей популяцией (пунктир) (адаптировано из [32])

При *CHEK2*-мутации риск развития РМЖ составляет 23–48 % [7]. Причем при наличии семейного онкологического анамнеза риск выше в 4–5 раз, а при его отсутствии – в 2–3 раза. Это подтверждает гипотезу, что пенетрантность *CHEK2*-мутаций в семьях высокого риска модифицируется другими генетическими нарушениями и/или факторами внешней среды [6, 9]. Среди семейных случаев РМЖ, не связанных с мутациями *BRCA1* и *BRCA2*, распространенность *CHEK2*-мутации составляет от 4,9 до 11,4 % в зависимости от общего количества случаев РМЖ в семьях [6].

*ATM*-мутации, по разным оценкам, увеличивают риск развития РМЖ до 17–52 % (рис. 4). Носители гомозиготных или гетерозиготных мутаций в гене *ATM* страдают от редкого рецессивного заболевания – атаксии-телеангиэктазии, которое характеризуется мозжечковой атаксией, дилатацией кровеносных сосудов глаз и кожи, иммунодефицитом, а также повышенной восприимчивостью к онкологическим заболеваниям [33]. Причем у гетерозиготных носителей риск развития злокачественных новообразований выше, чем у гомозиготных [33].

Исследования спорадического и семейного РМЖ не смогли однозначно продемонстрировать повышенную распространенность генеративных *ATM*-мутаций по сравнению с контрольной группой. Последние данные указывают, что 2 % семейных случаев РМЖ связано с мутацией в этом гене, хотя точная частота ассоциации остается неизвестной [35, 36]. М. Fernet и соавт. высказали предположение, что существование 2 различных классов *ATM*-мутаций («усеченные» и миссенс) могло бы объяснить некоторые противоречивые данные [37].

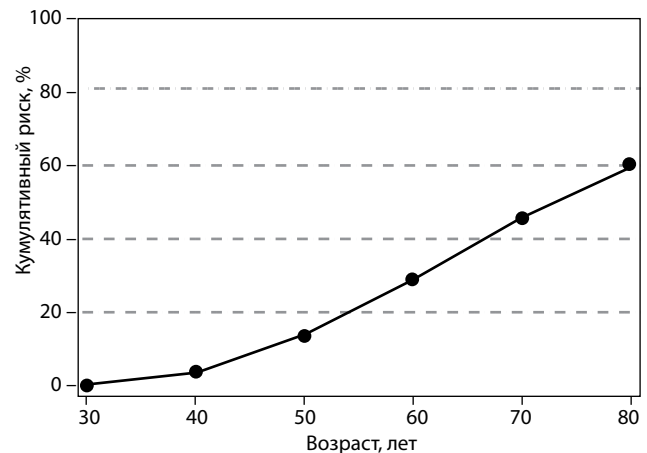


Рис. 4. Риск развития РМЖ при *ATM*-мутации (адаптировано из [34])

Таким образом, первый этап может быть направлен на выявление генеративных мутаций 7 генов, увеличивающих риск развития РМЖ преимущественно наследственной и семейной этиологии. Кроме того, следует выделить группу пациентов с соматическими мутациями при спорадическом РМЖ, которых также можно отдифференцировать. Поэтому проведение генетического исследования рекомендуется всем больным без исключения.

По оценкам анализируемой литературы, расширение панели генов в сравнении с исследованием только *BRCA1* и *BRCA2* позволит минимум в 2 раза увеличить число пациентов, у которых РМЖ будет диагностирован на ранней стадии.

Лица без выявленного РМЖ, но с положительными результатами генетического тестирования должны быть отнесены к группе высокого риска. Автоматически в нее попадают и женщины с отягощенным семейным онкологическим анамнезом (1 случай РМЖ/рака яичников в 1-й линии родства, 2 и более случаев РМЖ/рака яичников во 2-й и 3-й линиях родства) независимо от результатов генетического тестирования. Пациентки с признаками гиперплазии эпителия молочной железы также имеют повышенный риск развития РМЖ: в 4–5 раз при атипичной гиперплазии и в 2 раза при обычной [38].

#### Возможные подходы к уменьшению высоких рисков развития рака молочной железы

На сегодняшний день не существует специфических методов профилактики РМЖ. В качестве средств минимизации рисков изучаются возможности использования следующих стратегий.

1. *Терапевтический подход*: не существует общепринятых клинических рекомендаций по терапевтической профилактике РМЖ, поэтому во многих исследованиях в качестве превентивных агентов рассматриваются различные лекарственные средства как неселективной, так и таргетной направленности.

Опубликовано большое число исследований о пользе широко применяемых лекарственных препаратов в качестве средств профилактики РМЖ. Например, в 2011 г. был опубликован метаанализ, который показал, что долгосрочное потребление аспирина (в течение 5 лет и более) связано с 10 % снижением риска развития РМЖ [39]. Расширенное наблюдение продемонстрировало, что общая смертность от онкологических заболеваний примерно на 20 % ниже среди людей, регулярно принимающих аспирин [40]. По мнению авторов, такой эффект связан с неселективным ингибированием циклооксигеназы-2, которая гиперэкспрессируется при РМЖ [41]. Помимо аспирина в качестве профилактических средств рассматриваются препараты из группы ретиноидов, статинов, а также метформин [42].

Ингибиторы PARP — новый класс лекарственных средств, которые исследуются как перспективные препараты для целенаправленного лечения и профилактики трижды негативного РМЖ, особенно связанного с *BRCA1*- и *BRCA2*-мутациями. Тем не менее информация об использовании ингибиторов PARP в качестве агентов профилактики ограничена [42]. Известно о доклинических результатах, демонстрирующих значительное замедление развития опухоли, причем при приеме малых доз препарата [43]. Отсутствие результатов клинических исследований не позволяет использовать ингибиторы PARP на практике, но в связи с огромным потенциалом они требуют особого внимания.

2. *Хирургический подход*: двухсторонняя подкожная мастэктомия с последующей маммопластикой снижает риск развития РМЖ на 90–95 %.

На сегодняшний день в России не существует единого стандарта хирургической профилактики РМЖ у женщин с высоким риском развития заболевания. Возможно выполнение превентивной мастэктомии при желании пациента и при наличии *BRCA*-мутации, но в анамнезе обязательно должен быть контралатеральный РМЖ. По рекомендациям American Cancer Society, лечебно-профилактическая операция показана при наличии мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, ассоциация American Society of Plastic Surgeons расширяет показания и для пациентов с мутациями в генах *PTEN* и *TP53*. National Comprehensive Cancer Network также рекомендует данный тип оперативного вмешательства при атипичной гиперплазии и диффузных микрокальцинатах.

Вопрос об использовании превентивной двухсторонней подкожной мастэктомии с одномоментной реконструкцией в группе высокого риска при отсутствии РМЖ в анамнезе окончательно не решен. Несмотря на высокий риск развития заболевания и, как следствие, проведение комбинированного лечения, удаление ткани молочной железы при отсутствии злокачественного новообразования неправомерно.

Но за рубежом, несмотря на радикальность метода, с каждым годом количество женщин, выбирающих эту стратегию профилактики, возрастает. Профилактическая двухсторонняя овариэктомия также может быть рекомендована в особых случаях [44].

3. *Диагностический подход*: ежемесячное самообследование (не является эффективным методом ранней диагностики; не снижает показатели заболеваемости, но повышает выявляемость); ультразвуковое исследование (УЗИ), маммография или магнитно-резонансная томография (МРТ) молочных желез с 35 лет 1 раз в год. При наследственных и семейных случаях заболевания необходимо рекомендовать обследование остальных членов семьи [33].

### Лабораторные исследования сывороточных онкомаркеров

Классическим онкомаркером выбора при диагностике РМЖ является СА-15-3. Его чувствительность (Se) и специфичность (Sp) составляют 56–65 и 90–94 % соответственно [45]. На первый взгляд может показаться, что результаты благоприятные. Но в контексте скрининга РМЖ, где главная цель — выявить заболевание на начальных этапах в большой группе населения или определить факторы риска его развития, данный маркер совершенно неинформативен. Концентрация СА-15-3 прямо пропорциональна размеру опухоли, количеству вовлеченных лимфатических узлов, возрасту пациента. На ранней (I) стадии, при которой уже присутствует опухолевое образование, Se СА-15-3 составляет не более 10–13 % (рис. 5) [46–48]. Онкомаркер СА-15-3 может быть использован при мониторинге терапии, диагностике рецидивов, оценке прогноза, но результативный скрининг с ним невозможен.

СЕА и ТРА — альтернативные маркеры РМЖ. Se СЕА и ТРА равна 40–44 и 67 %, Sp — 95 и 82 %

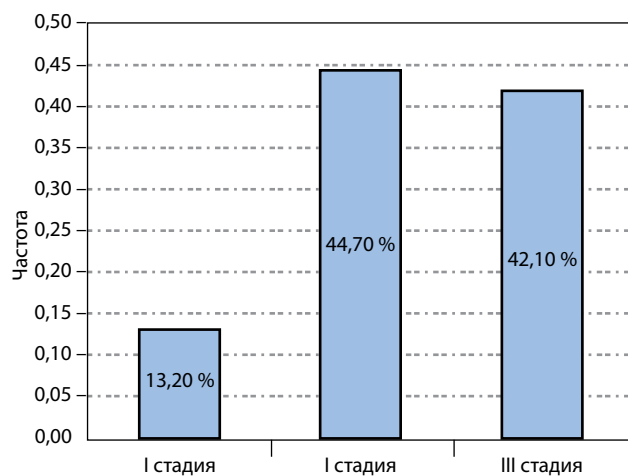


Рис. 5. Частота повышения уровня СА-15-3 при различных стадиях РМЖ (адаптировано из [48])

соответственно [46, 49]. В большинстве исследований эти онкомаркеры оказались эффективны при диагностике рецидивов, мониторинге и оценке лечения, но, как и в случае с СА-15-3, применение их в ранней диагностике РМЖ ограничено. Различные комбинации СА-15-3, СЕА и ТРА также не дают желаемого результата: незначительно улучшают Se (СА-15-3 + СЕА до 25 %), но снижают Sp.

Итак, на сегодняшний день все используемые белковые онкомаркеры не могут быть рекомендованы для раннего выявления РМЖ в системе скрининга. Их применение может быть оправдано только при мониторинге терапии, наблюдении после операции, оценке прогноза и диагностике РМЖ преимущественно на поздних стадиях.

S. Ławicki и соавт. в 2016 г. опубликовали исследование, в котором целенаправленно изучались онкомаркеры, эффективные при диагностике РМЖ на I стадии [50]. Оказалось, что VEGF среди исследуемых онкомаркеров (MMP-9, TIMP-1, VEGF, CA-15-3) имеет наилучшую Se (51 %) при Sp 96 %. VEGF считается важным фактором стимуляции лимфо- и ангиогенеза при многих патологических состояниях, в частности при злокачественных новообразованиях. Высокие уровни экспрессии VEGF и его матричной ДНК были обнаружены и при РМЖ [51, 52]. Se других онкомаркеров оказалась ниже и составила при I стадии 26 % для MMP-9 и 6 % для TIMP-1 при Sp 96 %. Невысокий уровень MMP-9 связан с его функцией: он разрушает коллаген IV типа базальной мембраны вблизи опухолевых клеток, что способствует росту опухоли и метастазированию. Авторы также оценили возможности совместного использования нескольких онкомаркеров. Наилучшей является комбинация VEGF + CA-15-3. При использовании этой схемы можно увеличить Se до 61 % при минимальной потере Sp (90 %). Комбинация всех 4 онкомаркеров (VEGF + CA-15-3 + MMP-9 + TIMP-1) повышает Se до 71 %, но снижает Sp до 80 % [50]. Несмотря на некоторые успехи в изучении сывороточных онкомаркеров, в настоящее время не существует онкомаркера или их комбинации, которые были бы эффективны при скрининге РМЖ у населения.

Лабораторная диагностика РМЖ должна включать использование как стандартных, так и новых онкомаркеров. Применение онкомаркеров СА-15-3 и СЕА эффективно при выявлении поздних, запущенных стадий РМЖ, когда концентрация маркеров повышена у большей части пациентов, а также при подозрении на злокачественные новообразования иной локализации (СЕА не является органоспецифическим онкомаркером — может быть повышен при карциномах пищеварительного тракта, раке легкого, опухолях головы и шеи). Использование онкомаркера VEGF (оценка совместно с СА-15-3)

информативно при ранней диагностике РМЖ (около 50 % пациентов)

### Инструментальные методы

При всех положительных свойствах генетических и сывороточных онкомаркеров их главный минус — отсутствие наглядности, способности к визуализации и, как следствие, невозможность полной морфологической оценки опухоли. Основным и повсеместно применяемым скрининговым методом диагностики РМЖ является маммография. В крупных исследованиях была доказана ее эффективность — снижение смертности в исследуемой группе. Но маммография имеет важные ограничения, не позволяющие использовать ее в качестве «идеального» метода: молодой возраст пациента, повышенная плотность, неполнота охвата зон [53].

УЗИ молочных желез было предложено в качестве дополнительного инструмента скрининга РМЖ. В Японии было проведено рандомизированное контролируемое исследование J-START, результаты которого показали, что Se в исследуемой группе (маммография + УЗИ) составила 91 % против 77 % в контрольной группе (маммография) при Sp 87 % против 91 % [54]. Увеличение количества ложноположительных результатов — основная проблема УЗИ молочных желез.

### Заключение

В данной статье систематизированы основные генетические и белковые онкомаркеры, которые, по данным литературы, могут повысить выявляемость РМЖ на доклинической стадии. Трехэтапный подход к ранней диагностике РМЖ затрагивает все этапы развития опухоли: от возникновения патологических мутаций и появления опухолевых клеток до визуализируемого образования. Поэтому данные методики позволяют не только диагностировать опухоль на доклинической стадии, но и определять риски развития заболевания для каждого конкретного случая.

В 2013 г. был создан международный междисциплинарный исследовательский проект под названием «Персонализированная стратификация риска для профилактики и раннего выявления РМЖ», цель которого — разработка всеобъемлющего инструмента прогнозирования рисков развития РМЖ у женщин, рассчитанных на основании генетического исследования и некоторых других индивидуальных характеристик [55]. Связано это с тем, что в настоящее время в общепринятых клинических рекомендациях рассматриваются варианты воздействия только при очень высоком риске, таком как отягощенный семейный анамнез и клинически значимые мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Этого недостаточно, так

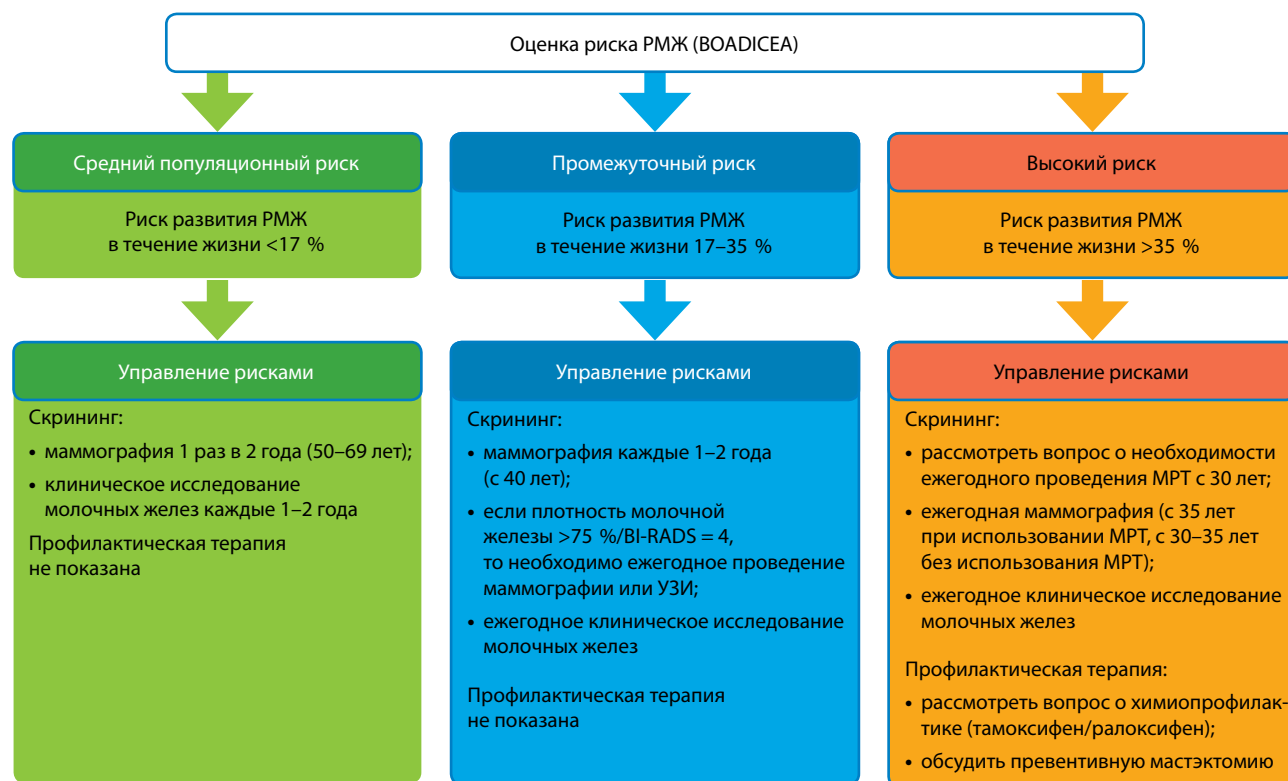


Рис. 6. Стратификация риска развития РМЖ и особенности ведения пациентов по методике BOADICEA (адаптировано из [55])

как большое число пациентов попадает в «слепое окно», которое включает женщин с другими, реже встречающимися мутациями в высокопенетрантных генах, мутациями в умеренно-пенетрантных генах, а также пациентов с повышенной плотностью молочной железы. Результатом работы проекта стало создание нового инструмента оценки риска – BOADICEA, который комплексно учитывает анамнез жизни, онкологический анамнез, плотность молочной железы, результаты генетического исследования (па-

нель более чем из 10 генов). Рекомендации по оценке рисков, полученные в результате данного анализа, представлены на рис. 6.

Совершенно точно, что для уменьшения смертности от онкологических заболеваний требуется тесное сотрудничество передовой науки и практической медицины. Необходимо проведение клинических исследований, а при их успешном завершении – внедрение новых методов скрининговых программ и оценки рисков в повседневную клиническую практику.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Социально значимые заболевания населения России в 2016 году (статистические материалы). Под ред. А.Д. Каприна и др. М., 2017.
- Рябчиков Д.А., Портной С.М., Воротников И.К., Чхиквадзе Н.В. Прогнозирование эффекта неоадъювантной химиотерапии у больных местнораспространенным раком молочной железы с использованием иммуногистохимических маркеров. Онкогинекология 2012;(3):56–61.
- Дедов И.И., Тюльпаков А.Н., Чехонин В.П. и др. Персонализированная медицина: современное состояние и перспективы. Вестник Российской академии медицинских наук 2012;67(12):4–12. DOI: <http://dx.doi.org/10.15690/vramn.v67i12.474>.
- Lynch H.T., Snyder C., Lynch J. Hereditary breast cancer: Practical pursuit for clinical translation. Ann Surg Oncol 2012;19(6):1723–31. DOI: 10.1245/s10434-012-2256-z. PMID: 22434244.
- Buys S.S., Sandbach J.F., Gammon A. et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. Cancer 2017;123(10):1721–30. DOI: 10.1002/cncr.30498. PMID: 28085182.
- Oldenburg R.A., Meijers-Heijboer H., Cornelisse C.J. et al. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? Crit Rev Oncol Hematol 2007;63(2):125–49. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2006.12.004. PMID: 17498966.
- Rosenthal E.T., Evans B., Kidd J. et al. Increased identification of candidates for high-risk breast cancer screening through expanded genetic testing. J Am Coll Radiol 2017;14(4):561–8.

- DOI: 10.1016/j.jacr.2016.10.003.  
PMID: 28011157.
8. Kleibl Z., Kristensen V.N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast* 2016;28:136–44. DOI: 10.1016/j.breast.2016.05.006. PMID: 27318168.
  9. Бит-Сава Е.М., Белогурова М.Б. Наследственный рак молочной железы. Сибирский онкологический журнал 2013;1(55):75–81.
  10. Aysola K., Desai A., Welch C. et al. Triple negative breast cancer – an overview. *Hereditary Genet* 2013;2013(Suppl 2):001. DOI: 10.4172/2161-1041.S2-001.
  11. Lee A.J., Cunningham A.P., Tischkowitz M. et al. Incorporating truncating variants in PALB2, CHEK2 and ATM into the BOADICEA Breast Cancer Risk Model. *Genet Med* 2016;18(12):1190–8. DOI: 10.1038/gim.2016.31. PMID: 27464310.
  12. Любченко Л.Н., Батенева Е.И., Воротников И.К. и др. Наследственный рак молочной железы: генетическая и клиническая гетерогенность, молекулярная диагностика, хирургическая профилактика в группах риска. Успехи молекулярной онкологии 2014;1(2):16–25. DOI: 10.17650/2313-805X.2014.1.2.16-25.
  13. Collins I.M., Bickerstaffe A., Ranaweera T. et al. iPrevent®: a tailored, web-based, decision support tool for breast cancer risk assessment and management. *Breast Cancer Res Treat* 2016;156(1):171–82. DOI: 10.1007/s10549-016-3726-y. PMID: 26909793.
  14. Ozaki T., Nakagawara A. Role of p53 in cell death and human cancers. *Cancers (Basel)* 2011;3(1):994–1013. DOI: 10.3390/cancers3010994. PMID: 24212651.
  15. Mai P.L., Best A.F., Peters J.A. et al. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer* 2016;122(23):3673–81. DOI: 10.1002/cncr.30248. PMID: 27496084.
  16. Pederson H.J., Padia S.A., May M., Grobmyer S. Managing patients at genetic risk of breast cancer. *Cleve Clin J Med* 2016;83(3):199–206. DOI: 10.3949/ccjm.83a.14057. PMID: 26974991.
  17. Laloo F., Varley J., Moran A. et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer* 2006;42(8):1143–50. DOI: 10.1016/j.ejca.2005.11.032. PMID: 16644204.
  18. Gonzalez K.D., Noltner K.A., Buzin C.H. et al. Beyond Li Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1250–6. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6959. PMID: 19204208.
  19. de Jong M.M., Nolte I.M., te Meerman G.J. et al. Genes other than BRCA1 and BRCA2 involved in breast cancer susceptibility. *J Med Genet* 2002;39(4):225–42. PMID: 11950848.
  20. Silwal-Pandit L., Vollan H.K., Chin S.F. et al. TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3569–80. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2943. PMID: 24803582.
  21. Encinas G., Maistro S., Pasini F.S. et al. Somatic mutations in breast and serous ovarian cancer young patients: a systematic review and meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras (1992)* 2015;61(5):474–83. DOI: 10.1590/1806-9282.61.05.474. PMID: 26603012.
  22. Hainaut P., Pfeifer G.P. Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016;6(11). DOI: 10.1101/cshperspect.a026179. PMID: 27503997.
  23. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(1):a001008. DOI: 10.1101/cshperspect.a001008. PMID: 20182602.
  24. Murányi B., Hortobágyi T. Immunohistochemical correlates of TP53 somatic mutations in cancer. *Oncotarget* 2016;7(40):64910–20. DOI: 10.18632/oncotarget.11912. PMID: 27626311.
  25. Ngew J., Sesock K., Eng C. Breast cancer risk and clinical implications for germline PTEN mutation carriers. *Breast Cancer Res Treat* 2017;165(1):1–8. DOI: 10.1007/s10549-015-3665-z. PMID: 26700035.
  26. Yakubov E., Ghoochani A., Buslei R. et al. Hidden association of Cowden syndrome, PTEN mutation and meningioma frequency. *Oncoscience* 2016;3(5–6):149–55. DOI: 10.18632/oncoscience.305. PMID: 27489861.
  27. Kraus C., Hoyer J., Vasileiou G. et al. Gene panel sequencing in familial breast/ovarian cancer patients identifies multiple novel mutations also in genes others than BRCA1/2. *Int J Cancer* 2017;140(1):95–102. DOI: 10.1002/ijc.30428. PMID: 27616075.
  28. Jones S., Hruban R.H., Kamiyama M. et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. *Science* 2009;324(5924):217. DOI: 10.1126/science.1171202. PMID: 19264984.
  29. Hartley T., Cavallone L., Sabbaghian N. et al. Mutation analysis of PALB2 in BRCA1 and BRCA2-negative breast and/or ovarian cancer families from Eastern Ontario, Canada. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12(1):19. DOI: 10.1186/1897-4287-12-19. PMID: 25225577.
  30. Antoniou A.C., Casadei S., Heikkinen T. et al. Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. *N Engl J Med* 2014;371:497–506. DOI: 10.1056/NEJMoa1400382. PMID: 25099575.
  31. Janatova M., Kleibl Z., Stribrna J. et al. The PALB2 gene is a strong candidate for clinical testing in BRCA1- and BRCA2-negative hereditary breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22(12):2323–32. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-13-0745-T. PMID: 24136930.
  32. Southey M.C., Teo Z.L., Dowty J.G. et al. A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12(6):R109. DOI: 10.1186/bcr2796. PMID: 21182766.
  33. Gatti R., Perlman S. Ataxia-telangiectasia. *GeneReviews*® 1999. PMID: 20301790.
  34. Goldgar D.E., Healey S., Dowty J.G. et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res* 2011;13(4):R73. DOI: 10.1186/bcr2919. PMID: 21787400.
  35. Eliade M., Skrzypski J., Baurand A. et al. The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families? *Oncotarget* 2017;8(2):1957–71. DOI: 10.18632/oncotarget.12699. PMID: 27779110.
  36. Tavera-Tapia A., Pérez-Cabornero L., Macías J.A. et al. Almost 2 % of Spanish breast cancer families are associated to germline pathogenic mutations in the ATM gene. *Breast Cancer Res Treat* 2017;161(3):597–604. DOI: 10.1007/s10549-016-4058-7. PMID: 27913932.
  37. Fernet M., Moullan N., Lauge A. et al. Cellular responses to ionising radiation of AT heterozygotes: differences between missense and truncating mutation

- carriers. *Br J Cancer* 2004;90(4):866–73. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601549. PMID: 14970866.
38. Cuzick J., Sestak I., Thorat M.A. Impact of preventive therapy on the risk of breast cancer among women with benign breast disease. *Breast* 2015;24 Suppl 2:51–5. DOI: 10.1016/j.breast.2015.07.013. PMID: 26255741.
  39. Cuzick J., DeCensi A., Arun B. et al. Preventive therapy for breast cancer: a consensus statement. *Lancet Oncol* 2011;12(5):496–503. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70030-4. PMID: 21441069.
  40. Rothwell P.M., Fowkes F.G., Belch J.F. et al. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 2011;377(9759):31–41. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62110-1. PMID: 21144578.
  41. Shim V., Gauthier M.L., Sudilovsky D. et al. Cyclooxygenase-2 expression is related to nuclear grade in ductal carcinoma in situ and is increased in its normal adjacent epithelium. *Cancer Res* 2003;63(10):2347–50. PMID: 12750248.
  42. Litzenburger B.C., Brown P.H. Advances in preventive therapy for estrogen-receptor-negative breast cancer. *Curr Breast Cancer Rep* 2014;6(2):96–109. DOI: 10.1007/s12609-014-0144-1. PMID: 24829621.
  43. To C., Kim E.-H., Royce D.B. et al. PARP inhibitors, veliparib and olaparib, are effective chemopreventive agents for delaying mammary tumor development in BRCA1-deficient mice. *Cancer Prev Res (Phila)* 2014;7(7):698–707. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0047. PMID: 24817481.
  44. Petrucelli N., Daly M.B., Pal T. BRCA1- and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer. *GeneReviews*® 2016. PMID: 20301425.
  45. Zheng H., Luo R.C. Diagnostic value of combined detection of TPS, CA153 and CEA in breast cancer. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2005;25(10):1293–4. PMID: 16234113.
  46. Chen Y., Zheng Y.H., Lin Y.Y. et al. Clinical and prognostic significance of preoperative serum CA153, CEA and TPS levels in patients with primary breast cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2011;33(11):842–6. PMID: 22335950.
  47. Duffy M.J. Serum tumor markers in breast cancer: are they of clinical value? *Clin Chem* 2006;52(3):345–51. DOI: 10.1373/clinchem.2005.059832. PMID: 16410341.
  48. Keyhani M., Nasizadeh S., Dehghannejad A. Serum CA15-3 measurement in breast cancer patients before and after mastectomy. *Arch Iranian Med* 2005;8(4):263–6.
  49. Tang S., Zhou F., Sun Y. et al. CEA in breast ductal secretions as a promising biomarker for the diagnosis of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer* 2016;23(6):813–9. DOI: 10.1007/s12282-016-0680-9. PMID: 26898373.
  50. Ławicki S., Zajkowska M., Głazewska E.K. et al. Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-9, and TIMP-1 in the diagnosis of patients with breast cancer. *Onco Targets Ther* 2016;9:911–9. DOI: 10.2147/OTT.S99959. PMID: 26966379.
  51. Schmidt M., Voelker H.U., Kapp M. et al. Expression of VEGFR-1 (Flt-1) in breast cancer is associated with VEGF expression and with node-negative tumour stage. *Anticancer Res* 2008;28(3A):1719–24. PMID: 18630531.
  52. Teramoto S., Arihiro K., Koseki M. et al. Role of vascular endothelial growth factor-C and -D mRNA in breast cancer. *Hiroshima J Med Sci* 2008;57(2):73–8. PMID: 18717190.
  53. Lee K., Kim H., Lee J.H. et al. Retrospective observation on contribution and limitations of screening for breast cancer with mammography in Korea: detection rate of breast cancer and incidence rate of interval cancer of the breast. *BMC Womens Health* 2016;16(1):72. DOI: 10.1186/s12905-016-0351-1. PMID: 27863517.
  54. Ohuchi N., Suzuki A., Sobue T. et al. Sensitivity and specificity of mammography and adjunctive ultrasonography to screen for breast cancer in the Japan Strategic Anti-cancer Randomized Trial (J-START): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387(10016):341–8. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00774-6. PMID: 26547101.
  55. Gagnon J., Lévesque E., Borduas F. et al. Recommendations on breast cancer screening and prevention in the context of implementing risk stratification: impending changes to current policies. *Curr Oncol* 2016;23(6):e615–25. DOI: 10.3747/co.23.2961. PMID: 28050152.

# МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТРИЖДЫ НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н.Э. Атаханова<sup>1</sup>, Д.М. Алмурадова<sup>1</sup>, И.А. Дудина<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ташкентская медицинская академия; Республика Узбекистан, 100109 Ташкент, ул. Фароби, 2;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Ирина Александровна Дудина miss.rowe@yandex.ru

В структуре онкологической заболеваемости рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место, и частота его неуклонно растет. Ежегодно в мире диагностируется около 1,67 млн первично выявленных случаев РМЖ и более 500 000 женщин умирает от этого заболевания. Трижды негативный РМЖ (ТНРМЖ) составляет около 15–20 % всех случаев РМЖ и встречается чаще у женщин фертильного возраста. ТНРМЖ характеризуется отсутствием экспрессии рецепторов эстрогенов, прогестерона и HER-2/neu, что существенно затрудняет лечение. Для ТНРМЖ типичны агрессивное течение, высокий риск рецидива в течение первых 3 лет после лечения, а также быстрое метастазирование и снижение продолжительности жизни. В данной статье представлен обзор литературы о молекулярно-биологических характеристиках ТНРМЖ, а также рассмотрены основные подходы к таргетной терапии каждого подтипа.

**Ключевые слова:** трижды негативный рак молочной железы, молекулярно-биологические подтипы, таргетная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-23-27

## MOLECULAR-BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER

N.E. Atakhanova<sup>1</sup>, D.M. Almuradova<sup>1</sup>, I.A. Dudina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tashkent Medical Academy; 2 Pharobi St., Tashkent 100169, Republic of Uzbekistan;

<sup>2</sup>Sechenov University, Bldg. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Breast cancer is the most common disease in women all over the world. In the structure of cancer morbidity, breast cancer ranks first and its frequency is steadily increasing. In the world, about 1.67 million new cases are diagnosed and every year more than 500,000 women die from breast cancer. Triple negative breast cancer (TNBC) is about 15–20 % of all breast tumors; is more common in women of fertile age. TNBC is characterized by a lack of expression of estrogen, progesterone receptors and HER-2/neu, which significantly complicates the treatment of this disease, which is characterized by aggressive course, the maximum risk of recurrence during the first 3 years after surgical treatment, and rapid metastasis and decreased life expectancy. This article presents a review of the literature on the molecular-biological characteristics of TNBC. The article also describes the main approaches to targeted therapies for each subtype.

**Key words:** triple-negative breast cancer, molecular-biological subtypes, targeted therapy

### Введение

Рак молочной железы (РМЖ) — социально значимое заболевание нашего времени: каждые 20 с у 1 женщины в мире диагностируют РМЖ и каждые 5 мин более 3 женщин умирает от этой патологии. Трижды негативный РМЖ (ТНРМЖ) представляет собой гетерогенную группу заболеваний, характеризующуюся наличием уникальных молекулярно-генетических, морфологических и патологических особенностей. Опухоли этого типа не имеют 3 наиболее важных терапевтических маркеров, типичных для пациентов с РМЖ, к которым относятся рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа

(HER2), рецептор эстрогена-альфа (ER) и рецептор прогестерона (PR). На долю ТНРМЖ приходится не менее 15–20 % всех случаев РМЖ. Эпидемиологические исследования показывают более высокую распространенность данного типа среди молодых женщин и лиц африканского происхождения [1–3].

К клинко-патологическим особенностям ТНРМЖ в сравнении с люминальными и HER2-позитивными типами относятся: молодой возраст при постановке диагноза, больший средний размер опухоли, высокая частота поражения регионарных лимфатических узлов. Кроме того, у пациентов с этим типом РМЖ высока вероятность раннего метастазирования

(особенно в головной мозг) и рецидивирования в течение 5 лет [4–7].

### Классификация

Поскольку ТНРМЖ является гетерогенным заболеванием, в последнее десятилетие было предложено большое количество патологических и иммуногистохимических субклассификаций для выделения более однородных подтипов.

B.D. Lehmann и соавт. проанализировали профили экспрессии более 2000 генов на 587 образцах, в результате чего были выделены 6 устойчивых молекулярно-генетических подтипов ТНРМЖ: базальноподобный 1 (BL1), базальноподобный 2 (BL2), иммуномодуляторный (IM), мезенхимальный (M), мезенхимальноподобный (MSL), люминальный/андрогенрецепторный (LAR). Также в редких случаях при отсутствии специфических признаков возможно выявление неклассифицируемого подтипа (UNS) [8].

**Подтипы BL1 и BL2.** Еще в 2003–2005 гг. было показано, что 60–72 % случаев ТНРМЖ и 80–90 % *BRCA1*-ассоциированного РМЖ имеют базальноподобную картину экспрессии генов [9, 10]. Это фенотипическое сходство привело к гипотезе о том, что дефекты путей репарации необходимы для развития базальноподобного ТНРМЖ. Действительно, в подгруппе BL1 наблюдается гиперэкспрессия генов, которые регулируют клеточный цикл, участвуют в восстановлении поврежденной ДНК (*CHEK1*, *FANCA*, *FANCG*, *RAD54BP*, *RAD51*, *NBN*, *EXO1*, *MSH2*, *MCM10*, *RAD21* и *MDC1*) и активируют пролиферацию (*AURKA*, *AURKB*, *CENPA*, *CENPF*, *BUB1*, *TTK*, *CCNA2*, *PRC1*, *MYC*, *NRAS*, *PLK1* и *BIRC5*). Высокий пролиферативный потенциал BL1-подтипа дополнительно подтверждается обнаружением гиперэкспрессии мРНК Ki-67 (MKI67) и ядерным окрашиванием Ki-67 иммуногистохимическим методом. BL2-подтип демонстрирует гиперэкспрессию факторов роста, таких как эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста нервов (NGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF1R); также данная подгруппа обогащена сигнальными путями EGF, MET. Этот подтип имеет более высокие уровни экспрессии TP63 и MME, что свидетельствует о его базальном/миоэпителиальном происхождении [8]. Стоит отметить, что BL-подтипы ТНРМЖ молекулярно гетерогенны: это указывает на неоднородность исходного базальноподобного подтипа [11].

Логично, что BL1-подтип должен обладать выраженной чувствительностью к терапевтическим стратегиям, нацеленным на пути восстановления ДНК (химиотерапия платиновыми производными/PARP-ингибиторы), тогда как BL2-подтип теоретически должен лучше реагировать на тирозинкиназные ингибиторы. Эти данные подтверждает исследование

H. Masuda и соавт. [12]. При назначении стандартной неоадьювантной химиотерапии оказалось, что частота патологического полного ответа опухоли (pCR) в подгруппе BL1 составила 51 %, а в подгруппе BL2 – 0 %. Это вызывает серьезную проблему при определении подхода к лечению базальноподобных опухолей.

Химиотерапия на основе платины, по-видимому, увеличивает частоту pCR у пациентов с ТНРМЖ [13]. В рандомизированном контролируемом исследовании II фазы, результаты которого опубликовали G. Von Minckwitz и соавт., было показано, что добавление карбоплатина к стандартной схеме неоадьювантной химиотерапии у пациентов с трижды негативным или HER2-позитивным РМЖ увеличивает pCR до 43,7 % при pCR, равном 36,9 %, в контрольной группе. При наличии *BRCA1*-мутации и/или семейного анамнеза РМЖ схемы с использованием платиносодержащих препаратов более эффективны [14].

Ингибиторы PARP также могут рассматриваться в качестве терапевтических агентов при базальноподобных подтипах ТНРМЖ. Доклинические данные показали, что олапариб (olaparib) обладает противоопухолевой активностью в *BRCA*-мутантных клеточных линиях [15]; позже это было подтверждено в клиническом исследовании II фазы [16]. Клиническое исследование III фазы инипариба (iniparib) не показало положительных результатов, что подтвердило слабый ингибирующий эффект препарата [17, 18]. Новые сильнодействующие ингибиторы PARP, такие как BMN-673, находятся на ранней стадии клинических испытаний [19]. На основании предварительных результатов исследования I-SPY2 добавление велипариба (veliparib) и карбоплатина к стандартным режимам неоадьювантной химиотерапии в 2 раза увеличивает pCR, что кажется перспективным [20].

**Подтип IM.** Данный подтип ТНРМЖ имеет схожий фенотип с профилем генной экспрессии иммунной системы [21]. При IM-подтипе отмечается высокая экспрессия генов, продукты которых отвечают за межклеточную иммунную сигнализацию (путь TNF1/TNF2, путь NK-клеток, сигнальный путь В-клеточного рецептора), цитокиновую сигнализацию (путь цитокинов, IL-12, IL-7), обработку и представление антигена [8]. Иммуногистохимический анализ выявил повышенные уровни транскрипционных факторов, включающих интерфероны и фактор некроза опухоли (TNF), а также гиперактивные янус-киназы (JAK)/сигнальные передатчики и активаторы транскрипции (STAT). Однако B.D. Lehmann и соавт. в 2014 г. высказали сомнение, так как данный тип экспрессии генов может быть результатом наличия значительного количества иммунного инфильтрата в опухоли [22].

В качестве таргетной терапии при данном подтипе ТНРМЖ может быть рассмотрена иммунотерапия,

основанная на блокировке иммунологических «контрольных точек». Различные препараты этой группы находятся на ранних стадиях клинических исследований, поэтому в настоящее время не существует систематизированных данных по эффективности их применения при ТНРМЖ [23].

**Подтипы М и MSL** в первую очередь ассоциированы с увеличением в сравнении с другими подтипами ТНРМЖ маркеров раковых стволовых клеток (CSC), активности эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), а также содержат высокий уровень aberrаций в пути PI3K/АКТ/mTOR [11]. Во время EMT клетки РМЖ приобретают экспрессию мезенхимальных маркеров, теряя при этом экспрессию эпителиальных генов, участвующих в поддержании клеточных контактов. Таким образом, снижение экспрессии белка Е-кадгерина и повышение виментина в клетках ТНРМЖ позволяют стратифицировать подгруппу мезенхимального ТНРМЖ [23].

Подтип М обогащен множеством уникальных генов, отвечающих за взаимодействие с рецепторами внеклеточного матрикса, клеточную подвижность (Rho-зависимый путь) и дифференцировку (Wnt-путь, ALK-путь) [8, 11]. Подтип MSL имеет аналогичные характеристики, однако отличительной его чертой является повышенная экспрессия генов факторов роста, связанных с компонентами и процессами различных сигнальных путей, такими как рецептор фактора роста тромбоцитов (PDGFR), рецептор фактора роста фибробластов (FGFR), рецептор, связанный с G-белком (GPCR), ERK1/2, метаболизм инозитолфосфата, передача сигналов ABC-транспортеров [8]. Для данного подтипа также характерна гиперэкспрессия генов, участвующих в ангиогенезе (*VEGFR2 (KDR)*, *TEK*, *TIE1* и *EPAS1*), но при этом наблюдаются низкие уровни генов пролиферации и ограниченная экспрессия клаудинов 3, 4 и 7 [8].

Интересно отметить, что приблизительно 10–30 % случаев ТНРМЖ, классифицируемых как М или MSL на основе морфологических признаков опухоли, верифицируются как метастатический РМЖ [9, 24]. Метастатический РМЖ – редкий гистологический подтип (менее 1 %), который имеет общий с М и MSL профиль экспрессии генов и характеризуется резистентностью к химиотерапии, а также обогащением CSC и EMT [24–28]. В 2017 г. R.K. Basho и соавт. опубликовали результаты клинического исследования I фазы, где рассматривалась эффективность использования комбинации доксорубина, бевацизумаба и ингибиторов mTOR (темсиrolimus или everolimus) [29]. В этом исследовании именно метастатический РМЖ рассматривался как «суррогат ответа» для терапевтических исследований мезенхимальных подтипов ТНРМЖ. Частота объективного ответа составила 21 %, стабилизации состояния

не менее чем на 6 мес – 19 %, причем в группе с наличием признаков aberrаций в пути PI3K/АКТ/mTOR результаты были лучше [29].

Исходя из молекулярно-генетических особенностей подтипов М и MSL, в качестве перспективных препаратов для лечения ТНРМЖ могут быть использованы ингибиторы Notch-пути, с-MET-таргетная терапия, ингибиторы TGF- $\beta$ . Путь Notch участвует в поддержании пула и дифференцировке CSC, поэтому мезенхимальные подтипы, особенно MSL, могут оказаться чувствительными к ингибированию данного пути. На сегодняшний день были разработаны 2 типа ингибиторов Notch: ингибиторы  $\gamma$ -секретазы и моноклональные антитела к дельта-подобному лиганду 4 (delta-like ligand 4 monoclonal antibodies) [23]. В 2017 г. M.A. Locatelli и соавт. опубликовали результаты I фазы клинического исследования использования ингибитора  $\gamma$ -секретазы PF-03084014 в сочетании с доцетакселом у пациентов с распространенным ТНРМЖ [30]. Оказалось, что при такой комбинации частичный ответ наблюдался в 16 % случаев, а стабилизация заболевания – в 36 %. Терапия, направленная на с-MET, также может стать успешной, поскольку сигнализация с-MET может контролировать фенотипы EMT и CSC [23]. Однако полученные в 2011 г. B. Daniel и коллегами результаты об ингибировании с-MET при метастатическом ТНРМЖ были разочаровывающими: увеличения выживаемости без прогрессирования не наблюдалось [31]. В доклинических исследованиях ингибиторы TGF- $\beta$  продемонстрировали многообещающие результаты, индуцируя обратный мезенхимально-эпителиальный переход [32, 33].

**Подтип LAR** среди всех подтипов ТНРМЖ имеет самый дифференцированный профиль экспрессии генов. Несмотря на то, что данный подтип является ER-отрицательным, он обогащен генами и их продуктами, регулирующими синтез стероидных гормонов, метаболизм порфиринов, андрогенов и эстрогенов. B.D. Lehmann и соавт. продемонстрировали, что ТНРМЖ, принадлежащий к подтипу LAR, имеет значительно более высокие уровни экспрессии андрогеновых рецепторов (AR). Опухоли подтипа LAR также экспрессируют многочисленные нисходящие AR-мишени и коактиваторы (DHCR24, ALCAM, FASN, FKBP5, APOD, PIP, SPDEF и CLDN8) [8]. AR-положительные опухоли обнаружены примерно в 1/3 случаев ТНРМЖ и связаны с благоприятным прогнозом [34–37].

В качестве таргетной терапии ТНРМЖ, относящегося к LAR-подтипу, рассматриваются 2 группы препаратов: ингибиторы AR и ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC) [23]. По данным C.R. Tate и соавт., ингибиторы HDAC *in vivo* способны повышать чувствительность ТНРМЖ к эндокринной

терапии [38]. Таким образом, в настоящее время ведутся клинические испытания использования ингибиторов HDAC совместно с ингибиторами ароматазы у пациентов с ТНРМЖ [39].

В 2013 г. А. Gucalp и соавт. опубликовали результаты клинического исследования II фазы, в котором изучалась возможность использования бикалутамида, перорального ингибитора AR, при ТНРМЖ с гиперэкспрессией AR [40]. Двадцатичетырехнедельная CBR (определяется как совокупность полного ответа, частичного ответа, стабилизации состояния больных) составила 19 %, медиана выживаемости без прогрессирования — 12 нед, при этом частота побочных эффектов была минимальной. Другое соединение, энобосарм (enobosarm), продемонстрировало CBR, равную 35 %, при метастатическом AR-положительном РМЖ [41].

### Заключение

ТНРМЖ — агрессивная форма заболевания, которая до недавнего времени рассматривалась как единая гомогенная группа, что приводило к «смазыванию» терапевтических эффектов лекарственных препаратов. Благодаря новым технологиям и расширению знаний о канцерогенезе были выделены 6 молекулярно-генетических подтипов ТНРМЖ, для каждого из которых характерна уникальная картина экспрессии генов. Стало ясно, что для успешного лечения ТНРМЖ необходимо разработать новые методы лечения и определить индивидуальную терапевтическую стратегию для каждого подтипа. В то же время молекулярно-генетических маркеров может оказаться недостаточно, а значит, требуется тщательное изучение эпигенетических особенностей, транскриптома и протеома ТНРМЖ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Dawood S., Broglio K., Kau S.W. et al. Triple rezeptornegative breast cancer: the effect of race on response to primary systemic treatment and survival outcomes. *J Clin Oncol* 2009;27(2):220–6. DOI: 10.1200/JCO.2008.17.9952. PMID: 19047281.
- Irvin W.J. Jr., Carey L.A. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer* 2008;44(18):2799–805. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.09.034. PMID: 19008097.
- Lund M.J., Trivers K.F., Porter P.L. et al. Race and triple negative threats to breast cancer survival: a population-based study in Atlanta, GA. *Breast Cancer Res Treat* 2009;113(2):357–70. DOI: 10.1007/s10549-008-9926-3. PMID: 18324472.
- Bauer K.R., Brown M., Cress R.D. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 2007;109(9):1721–8. DOI: 10.1002/cncr.22618. PMID: 17387718.
- Anders C., Carey L.A. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology* 2008;22(11):1233–9. PMID: 18980022.
- Dent R., Trudeau M., Pritchard K.I. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13(15 Pt 1):4429–34. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045. PMID: 17671126.
- Hines S.L., Vallow L.A., Tan W.W. et al. Clinical outcomes after a diagnosis of brain metastases in patients with estrogen- and/or human epidermal growth factor receptor 2-positive versus triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2008;19(9):1561–5. DOI: 10.1093/annonc/mdn283. PMID: 18534964.
- Lehmann B.D., Bauer J.A., Chen X. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011;121(7):2750–67. DOI: 10.1172/JCI45014. PMID: 21633166.
- Foulkes W.D., Stefansson I.M., Chappuis P.O. et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(19):1482–5. PMID: 14519755.
- Lakhani S.R., Reis-Filho J.S., Fulford L. et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res* 2005;11(14):5175–80. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2424. PMID: 16033833.
- Yam C., Mani S.A., Moulder S.L. Targeting the molecular subtypes of triple negative breast cancer: Understanding the diversity to progress the field. *Oncologist* 2017;22(9):1086–93. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0095. PMID: 28559413.
- Masuda H., Baggerly K.A., Wang Y. et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5533–40. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0799. PMID: 23948975.
- Von Minckwitz G., Schneeweiss A., Loibl S. et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(7):747–56. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70160-3. PMID: 24794243.
- Von Minckwitz G., Hahnen E., Fasching P.A. et al. Pathological complete response (pCR) rates after carboplatin-containing neoadjuvant chemotherapy in patients with germline BRCA (gBRCA) mutation and triple-negative breast cancer (TNBC): Results from GeparSixto. *J Clin Oncol* 2014;32(15 Suppl):1005. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.1005.
- Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A. et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* 2009;361(2):123–34. DOI: 10.1056/NEJMoa0900212. PMID: 19553641.
- Tutt A., Robson M., Garber J.E. et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *Lancet* 2010;376(9737):235–44. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60892-6. PMID: 20609467.

17. O'Shaughnessy J., Schwartzberg L.S., Danso M.A. et al. A randomized phase III study of iniparib (BSI-201) in combination with gemcitabine/carboplatin (G/C) in metastatic triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol* 2011;29(15 Suppl):1007. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15\_suppl.1007.
18. Mateo J., Ong M., Tan D.S.P. et al. Appraising iniparib, the PARP inhibitor that never was – what must we learn? *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(12):688–96. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.177. PMID: 24129347.
19. Shen Y., Rehman F.L., Feng Y. et al. BMN 673, a novel and highly potent PARP1/2 inhibitor for the treatment of human cancers with DNA repair deficiency. *Clin Cancer Res* 2013;19(18):5003–15. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1391. PMID: 23881923.
20. Rugo H.S., Olopade O., DeMichele A. et al. Adaptive randomization of veliparib-carboplatin treatment in breast cancer. *N Engl J Med*. 2016;375(1):23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1513749. PMID: 27406347.
21. Ziltsova E.K., Ivanova O.A., Krivorotko P.V. et al. Can the androgen receptor blocking become the basis of a new method of treatment of triple negative breast cancer? *Malignant Tumours* 2017;1:18–25. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-1-18-25.
22. Lehmann B.D., Pietenpol J.A. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol* 2014;232(2):142–50. DOI: 10.1002/path.4280. PMID: 24114677.
23. Du F.L., Eckhardt B.L., Lim B. et al. Is the future of personalized therapy in triple-negative breast cancer based on molecular subtype? *Oncotarget* 2015;6(15):12890–908. DOI: 10.18632/oncotarget.3849. PMID: 25973541.
24. Gibson G.R., Qian D., Ku J.K., Lai L.L. Metaplastic breast cancer: clinical features and outcomes. *Am Surg* 2005;71(9):725–30. PMID: 16468506.
25. Hennessey B.T., Giordano S., Broglio K. et al. Biphasic metaplastic sarcomatoid carcinoma of the breast. *Ann Oncol* 2006;17(4):605–13. DOI: 10.1093/annonc/mdl006. PMID: 16469754.
26. Jung S.Y., Kim H.Y., Nam B.H. et al. Worse prognosis of metaplastic breast cancer patients than other patients with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010;120(3):627–37. DOI: 10.1007/s10549-010-0780-8. PMID: 20143153.
27. Luini A., Aguilar M., Gatti G. et al. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: The experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat* 2007;101(3):349–53. DOI: 10.1007/s10549-006-9301-1. PMID: 17009109.
28. Rayson D., Adjei A.A., Suman V.J. et al. Metaplastic breast cancer: Prognosis and response to systemic therapy. *Ann Oncol* 1999;10(4):413–9. PMID: 10370783.
29. Basho R.K., Gilcrease M., Murthy R.K. et al. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway for the treatment of mesenchymal triple-negative breast cancer: Evidence from a phase I trial of mTOR inhibition in combination with liposomal doxorubicin and bevacizumab. *JAMA Oncol* 2017;3(4):509–15. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.5281. PMID: 27893038.
30. Locatelli M.A., Aftimos P., Dees E.C. et al. Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2017;8(2):2320–8. DOI: 10.18632/oncotarget.13727. PMID: 27906684.
31. Diéras V., Campone M., Yardley D.A. et al. Randomized, phase II, placebo-controlled trial of onartuzumab and/or bevacizumab in combination with weekly paclitaxel in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Ann Oncol* 2015;26(9):1904–10. DOI: 10.1093/annonc/mdv263. PMID: 26202594.
32. Shipitsin M., Campbell L.L., Argani P. et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007;11(3):259–73. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.01.013. PMID: 17349583.
33. Oettle H., Hilbig A., Seufferlein T. et al. Trastuzumab (AP 12009) in the treatment of patients with advanced tumors: Completion of dose-escalation and first efficacy data. *J Clin Oncol* 2010;28(15 Suppl): 2611. DOI: 10.1200/jco.2010.28.15\_suppl.2611.
34. Gonzalez-Angulo A.M., Stemke-Hale K., Palla S.L. et al. Androgen receptor levels and association with PIK3CA mutations and prognosis in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(7):2472–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1763. PMID: 19276248.
35. Park S., Koo J., Park H.S. et al. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol* 2010;21(3):488–92. DOI: 10.1093/annonc/mdp510. PMID: 19887463.
36. McNamara K.M., Yoda T., Takagi K. et al. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;133:66–76. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2012.08.007. PMID: 22982153.
37. Рябчиков Д.А., Воронников И.К., Козлов Н.А., Чхиквадзе Н.В. Андрогеновые рецепторы как фактор прогноза в различных молекулярно-биологических подтипах рака молочной железы. *Сибирский онкологический журнал* 2017;16(3):40–5. DOI: 10.21294/1814-4861-2017-16-3-40-45.
38. Tate C.R., Rhodes L.V., Segar H.C. et al. Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat. *Breast Cancer Res* 2012;14(3):R79. DOI: 10.1186/bcr3192. PMID: 22613095.
39. Sabnis G.J., Goloubeva O., Chumsri S. et al. Functional activation of the estrogen receptor- $\alpha$  and aromatase by the HDAC inhibitor entinostat sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Res* 2011;71(5):1893–903. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2458. PMID: 21245100.
40. Gucalp A., Tolaney S., Isakoff S.J. et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(19):5505–12. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3327. PMID: 23965901.
41. Overmoyer B., Sanz-Altamira P., Taylor R.P. et al. Enobosarm: a targeted therapy for metastatic, androgen receptor positive, breast cancer. *J Clin Oncol* 2014;32(15 Suppl):568. DOI: 10.1200/jco.2014.32.15\_suppl.568.

# ЕСТЕСТВЕННАЯ ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА У МУЖЧИН – ЧТО О НЕЙ ИЗВЕСТНО?

**Г.М. Волгарева**

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

**Контакты:** Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@ronc.ru

*Вирусы папилломы человека (ВПЧ) до настоящего времени привлекают к себе внимание биологов и врачей в первую очередь в связи с тем, что ряд представителей этой группы вызывают рак шейки матки у женщин. Вместе с тем очевидно, что в циркуляции этих вирусов в популяции участвуют как женщины, так и мужчины. Накапливаются данные о том, что имеется ряд особенностей в распространении ВПЧ среди мужчин по сравнению с женщинами, а также о том, что онкогенные ВПЧ вызывают рак в некоторых органах и у мужчин. Настоящая работа представляет собой попытку обобщения данных литературы об особенностях распространения ВПЧ у мужчин. Уяснение этих различий важно для разработки эффективных мер профилактики ВПЧ-ассоциированных новообразований с учетом гендерных особенностей.*

**Ключевые слова:** вирусы папилломы человека, естественная циркуляция, мужчины, рак

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-28-33

## NATURAL HISTORY OF PAPILLOMAVIRUSES IN MEN – WHAT IS KNOWN?

**G.M. Volgareva**

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

*Up till now human papillomaviruses (HPV) draw attention of biologists and clinicians owing mostly to the fact that some members of this group cause cervical cancer in women. However it is clear that both women and men take part in HPV distribution throughout population. Data get accumulated on peculiarities of HPV natural history in men when compared with women, as well as on capability of oncogenic HPV to induce cancer in several male organs. The present paper is an attempt to synthesize literature data on specific features of HPV natural history in men. Elucidation of these features is important for working out efficient approaches for prevention of HPV-associated malformation with regard to gender specificities.*

**Key words:** human papillomaviruses, natural history, men, cancer

### Введение

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) до настоящего времени привлекают к себе внимание в первую очередь в связи с тем, что некоторые представители этой группы вызывают рак шейки матки (РШМ), один из самых распространенных видов рака у женщин. Установление этиологической роли этих ВПЧ при РШМ заняло длительное время. Так, еще в 1842 г. итальянский врач Ригони-Штерн (Rigoni-Stern) проанализировал свидетельства о смерти женщин в Вероне за 70 лет и обнаружил, что РШМ с высокой частотой поражал замужних женщин, вдов и женщин легкого поведения, однако у девиц и монахинь выявлялся крайне редко. Rigoni-Stern пришел к заключению, что этот тип рака связан с сексуальным поведением и, по-видимому, передается половым путем [1]. Только в 1976 г. немецкий исследователь цур Хаузен (zur Hausen) опубликовал гипотезу

о возможной ассоциации РШМ с ВПЧ, а в последующие годы совместно с сотрудниками получил экспериментальные данные в пользу этой гипотезы. Генетический материал ВПЧ был обнаружен ими в подавляющем большинстве биопсий из образцов РШМ. Были проклонированы и охарактеризованы ВПЧ 2 наиболее распространенных типов, 16-го и 18-го, а также показана интеграция вирусного генома в хромосомы клетки-хозяина и избирательная транскрипция вирусных онкогенов *E6* и *E7* [2–4]. Последовавшее за этим стремительное накопление фактов полностью подтвердило этиологическую роль ВПЧ при РШМ и увенчалось разработкой 2 эффективных вакцин для профилактики данного заболевания [5, 6]. Признание ВПЧ как этиологического фактора РШМ было зафиксировано в пресс-релизе Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в 1996 г.

Вирусы папилломы небольшие (52–55 нм). Они эпителиотропны. Эти вирусы инфицируют кожу, а также слизистые оболочки широкого спектра высших позвоночных и индуцируют пролиферацию клеток. Вирусы папилломы вызывают доброкачественные опухоли (так называемые бородавки, или папилломы) у своего природного хозяина. Папилломы возникают в кожном эпителии, а также в эпителии слизистых оболочек. Клеточная пролиферация, индуцированная папилломавирусами определенных типов, характеризуется высокой частотой прогрессии в направлении к раковой опухоли. Соответствующие вирусы папилломы относят к типам высокого онкогенного риска. Для возникновения раковой опухоли необходима хроническая вирусная инфекция. Папилломавирусы видоспецифичны. Вирусная частица содержит 1 двунитевую молекулу ДНК (8000 пар оснований), заключенную в белковый капсид. Таксономически вирусы папилломы выделяют в семейство *Papillomaviridae*. Классификация их основана на генетическом принципе, а именно на степени генетического сходства вновь выделенного вируса с ранее описанным в наиболее консервативной части генома — в гене *L1*, кодирующем белок капсида. Вновь выделенный папилломавирус признается новым типом, если нуклеотидная последовательность области *L1* этого вируса отличается от нуклеотидной последовательности наиболее близкого из уже известных папилломавирусов более чем на 10 %. Количество известных типов папилломавирусов постоянно увеличивается, причем большинство вновь описываемых типов выделяют от *Homo sapiens* [7]. Так, по данным на 2010 г. был полностью известен геном 189 типов папилломавирусов, среди которых было 120 ВПЧ [7, 8]. Международное агентство по изучению рака (МАИР; International Agency for Research on Cancer, IARC) при ВОЗ систематически обобщает новые данные о канцерогенных эффектах ВПЧ [9–11]. В 2007 г. группа экспертов МАИР впервые зафиксировала как окончательно доказанный (sufficient evidence) факт канцерогенности ВПЧ-16, основного типа ВПЧ, вызывающего РШМ, не только для женщин (помимо РШМ он вызывает рак вульвы и рак вагины), но также для мужчин. Была признана доказанной этиологическая роль ВПЧ-16 в возникновении рака полового члена, а также части случаев рака головы и шеи (рак ротовой полости и ротоглотки) и рака перианальной области, — в 2 последних случаях ВПЧ-16 является канцерогеном как у мужчин, так и у женщин. Помимо этого, было зафиксировано наличие ограниченных данных (limited evidence), указывающих на канцерогенность ВПЧ-18, второго по значимости типа ВПЧ при РШМ, в возникновении рака полового члена, ануса и ротовой полости; как ограниченные были охарактеризованы

данные о возможной этиологической роли ВПЧ рода  $\beta$  в возникновении плоскоклеточного рака кожи (все ВПЧ, вызывающие рак слизистых оболочек у человека в различных органах, в том числе ВПЧ-16 и ВПЧ-18, принадлежат к роду  $\alpha$ ); а также зарегистрировано недостаточное для окончательного заключения количество данных (inadequate evidence) в пользу возможного участия ВПЧ в возникновении рака ряда других органов: пищевода, легкого, толстой кишки, яичника, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, носовой полости. Канцерогенными для человека были признаны ВПЧ типов 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 и 66; предположительно канцерогенными — ВПЧ типов 6 и 11 [10]. В последнее десятилетие накапливались сообщения о том, что естественная циркуляция ВПЧ у мужчин и у женщин различается [12]. Уяснение этих различий важно для разработки эффективных мер профилактики ВПЧ-ассоциированных новообразований с учетом гендерных особенностей.

В фокус внимания исследователей все чаще попадают ВПЧ-положительные опухоли, развивающиеся у мужчин. Доля новых случаев ВПЧ-положительных онкологических заболеваний мужчин значительно варьирует в зависимости от географического региона, оставаясь низкой в наименее развитых странах, что связано с высокой заболеваемостью женщин в этих странах РШМ [12]. Помимо карцином упомянутых выше органов ВПЧ ответственны также за возникновение у лиц обоих полов бородавок гениталий, папиллом ротовой полости и такого редкого заболевания, как рекуррентный респираторный папилломатоз. Оценки доли ВПЧ-позитивных случаев онкологических заболеваний мужчин относительно всех ВПЧ-позитивных новообразований, возникающих ежегодно у женщин и мужчин суммарно, даваемые разными авторами, колеблются в широких пределах [13, 14]. Один из наиболее высоких показателей приводят специалисты Sanofi Pasteur MSD, выполнившие теоретическую экспертизу данных из 26 европейских стран и показавшие, что у мужчин, проживающих в Европе (без учета данных по России), ежегодно возникает около 15,5 тыс. новых случаев рака, этиологически связанного с ВПЧ-16 и ВПЧ-18, а также от 287 до 326 тыс. новых случаев заболеваний генитальными бородавками, вызванными ВПЧ-6 и ВПЧ-11 (эти типы ВПЧ относятся к категории низкого риска). Среди всех вновь выявляемых ВПЧ-положительных случаев рака в этих странах на долю мужчин приходится до 30 %. Авторы пришли к заключению, что значительную часть всех ВПЧ-положительных новообразований мужчин в европейских странах можно предупредить с помощью профилактических прививок квадрилентной вакциной [13].

Настоящая работа представляет собой попытку обобщения данных литературы об особенностях распространения ВПЧ у мужчин. Специфика темы потребует в ряде случаев привлекать и данные, касающиеся женщин.

Как станет очевидно, в данной области остается еще много неясного. Объективные трудности изучения этой проблемы вызваны тем, что практически отсутствуют исследования в одной и той же популяции, которые были бы проведены параллельно и на мужчинах, и на женщинах. За исключением шейки матки, для других органов человека данные о циркуляции ВПЧ крайне ограничены. Результаты, публикуемые разными исследовательскими коллективами, нередко трудно сопоставимы из-за различий методических подходов. Эти различия могут касаться приемов сбора образцов, чувствительности используемого метода детекции ВПЧ, количества типов ВПЧ, выявление которых позволяет осуществлять применяемый в конкретной лаборатории тест, и т. д.

#### **ВПЧ-инфекция ротовой полости**

В популяционном исследовании, проведенном в США и охватившем более 5,5 тыс. мужчин и женщин (14–69 лет), присутствие в эпителиальных клетках ротовой полости ВПЧ того или иного типа было установлено в 6,9 % случаев; этот показатель для мужчин достоверно превысил аналогичный показатель для женщин – 10,1 и 3,6 % соответственно ( $p < 0,001$ ). Пики кривых зависимости показателя от возраста оказались сходными для лиц мужского и женского пола: они приходились на возрастные интервалы 30–34 и 60–64 года. Помимо принадлежности к мужскому полу факторами, независимо ассоциированными с ВПЧ-положительным результатом, по данным этого исследования также оказались большее число сексуальных партнеров на протяжении всей жизни и факт курения на момент обследования (более 10 сигарет в день) [15].

Что касается инфекции ВПЧ типов высокого онкогенного риска, то она выявляется в эпителии ротовой полости у мужчин весьма редко [12, 16]. Согласно данным проспективного исследования, охватившего 1626 мужчин в возрасте от 18 до 73 лет, проведенного в США, Мексике и Бразилии, в течение первого года наблюдения 1,7 % обследуемых заразились *de novo* онкогенным ВПЧ, в том числе 0,6 % – ВПЧ-16. Средняя продолжительность заражения онкогенными ВПЧ составила 6,3 мес, а отдельно ВПЧ-16 – 7,3 мес [16]. Продолжая работу с этим контингентом мужчин, исследователи показали, что при заражении эпителия ротовой полости ВПЧ-16 вирус персистировал в нем в среднем не менее 12 мес в 30,8 % случаев, не менее 24 мес – в 10 % случаев и ни в одном случае – 36 мес и более;

в старших возрастных группах длительность новой ВПЧ-инфекции эпителия ротовой полости достоверно возрастала [17].

Причины более высоких показателей зараженности ВПЧ эпителия ротовой полости мужчин по сравнению с женщинами остаются неясными. В качестве возможных объяснений предлагаются, в частности, следующие: женщины обладают более высоким уровнем приобретенного иммунитета вследствие ВПЧ-инфицирования шейки матки; мужчины больше рискуют, так как часто имеют большее число сексуальных партнеров, чем женщины [12].

#### **Анальная ВПЧ-инфекция**

Внимание исследователей к обнаружению ВПЧ в анальном канале у мужчин традиционно превосходит таковое к аналогичным исследованиям на женщинах, причем работы, проводимые на группах мужчин, чаще ограничиваются лицами гомосексуальной ориентации, инфицированными вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) [12].

Что касается ВИЧ-негативных мужчин, то и у них в эпителии анального канала ВПЧ обнаруживается нередко. Так, A.G. Nyitray и соавт., проведя с помощью полимеразной цепной реакции детекцию в общей сложности 37 типов ВПЧ в эпителии 1305 гетеросексуальных мужчин и 176 гомосексуалистов (те и другие – ВИЧ-негативные), сообщили о вирус-позитивности 12,2 % среди первых и 47,2 % – среди вторых. Факторами повышенного риска заражения анального канала ВПЧ оказались большое число сексуальных партнеров, диагноз гепатита В, принадлежность к более молодой возрастной группе, а также отказ от использования презерватива при анальных контактах [18].

На основании материалов эпидемиологических исследований, проводившихся в рамках программы НМ (Human Papillomavirus Infection in Men) в США, Мексике и Бразилии, была выявлена общая тенденция для ВИЧ-негативных индивидуумов: ВПЧ-позитивность клеток анального эпителия обнаруживается у мужчин гомосексуальной ориентации приблизительно вдвое чаще, чем у женщин, а у женщин – вдвое чаще, чем у мужчин гетеросексуальной ориентации [12]. В рамках той же программы была зафиксирована значительно более высокая частота  $\beta$ -папилломавирусов (так называемых кожных ВПЧ) у мужчин из старших возрастных групп по сравнению с молодыми мужчинами [19]. В связи с этим остаются открытыми вопросы о путях заражения эпителия анального канала такими ВПЧ и о возможных онкологических последствиях этой инфекции.

Что касается персистенции ВПЧ типов высокого онкогенного риска в клетках эпителия анального канала, то, согласно весьма ограниченным данным,

клиренс ВПЧ-16 у мужчин гетеросексуальной ориентации происходит существенно быстрее, чем у гомосексуалистов [20]. Очевидно, именно этим объясняется значительно более высокая частота заболеваемости раком анального канала среди лиц, принадлежащих ко второй группе.

### Генитальная ВПЧ-инфекция

В этом разделе, как и в двух предыдущих, мы будем опираться преимущественно на результаты эпидемиологических исследований, выполненных в рамках программы НІМ в США и Латинской Америке. Согласно им, генитальная ВПЧ-инфекция у мужчин обнаруживается достоверно чаще, чем у женщин, а возраст, имеющий четкую отрицательную корреляцию с генитальным заражением ВПЧ у женщин, по-видимому, совсем не влияет на зараженность ВПЧ мужчин [21, 22]. ВПЧ типов высокого и низкого онкогенного риска обнаруживаются у женщин с примерно одинаковой частотой (14–15 и 18 % соответственно), тогда как у мужчин зараженность ВПЧ типов низкого риска достоверно преобладает над таковой онкогенными ВПЧ (39 и 30 % соответственно). Как у мужчин, так и у женщин генитальные ВПЧ выявляются с разной частотой в разных частях половой системы: у мужчин зараженность мочеиспускательного канала обычно ниже, чем зараженность ствола полового члена; у женщин самые высокие показатели зафиксированы для шейки матки и вагины и меньшие — для вульвы, что, по-видимому, обусловлено уникально высокой уязвимостью к данной инфекции клеток в зоне трансформации цервикального канала (т. е. в области преобразования слизистой оболочки шейки матки на месте стыка многослойного плоского и железистого эпителия) [12].

Вероятность заражения *de novo* генитальными ВПЧ, как и следовало ожидать из изложенного выше, существенно различается у мужчин и женщин. У мужчин она не уменьшается с возрастом, тогда как у женщин значительно снижается [12, 23].

В связи с этим открытыми остаются важные вопросы. Чем вызвано то, что темп заражения новыми генитальными ВПЧ остается неизменен на протяжении всей жизни у мужчин, но снижается у женщин? Почему в условиях, когда генитальные ВПЧ обнаруживаются у мужчин чаще, чем у женщин, показатели заболеваемости раком соответствующих локализаций варьируют столь значительно для мужчин и для женщин, а также для разных отделов половой системы у лиц одного и того же пола? Так, для РШМ в популяции, в которой не ведется регулярный скрининг, этот показатель может достигать ~135/100 000, а для рака анального канала, вульвы и полового члена — ~1/100 000 [12]. В чем заключается влияние локального эпителиального окружения (например, зоны

трансформации цервикального или анального канала по сравнению с клеточным окружением кератинизированного плоского эпителия) на заражение ВПЧ, развитие иммунного ответа и темп прогрессии в направлении к образованию раковой опухоли? Требуется объяснения также тот факт, что в генитальной сфере мужчин помимо ВПЧ рода  $\alpha$ , как онкогенных, так и низкого онкогенного риска, обнаружены разнообразные ВПЧ, принадлежащие к родам  $\beta$  и  $\gamma$ , роль которых в онкогенезе неясна [24, 25].

### Карциномы различных локализаций, ассоциированные с вирусом папилломы человека

Как отмечено выше, доля новых случаев ВПЧ-положительных онкологических заболеваний мужчин значительно варьирует в зависимости от географического региона. Попытка дать усредненные мировые оценки частот ВПЧ-положительных карцином различных локализаций относительно всех карцином соответствующей локализации была предпринята в 2008 г. [14]. Результаты ее оказались следующими. Среди всех 12,7 млн новых случаев онкологических заболеваний 610 тыс. (4,8 %) были отнесены к категории ВПЧ-ассоциированных; среди них 570 тыс. новых случаев были выявлены у женщин (9,4 %) и 39 тыс. — у мужчин (0,6 %). ВПЧ, по-видимому, являются этиологическими агентами практически в 100 % случаев РШМ (тем не менее описаны крайне редкие случаи ВПЧ-отрицательного РШМ [26]), 88 % случаев анального рака, 70 % случаев рака вагины, 50 % случаев рака полового члена и 43 % карцином вульвы; большинство всех этих опухолей вызвано ВПЧ 2 основных типов — 16-го и 18-го. Затруднения встретились при оценке доли ВПЧ-положительных карцином головы и шеи, поскольку в этом случае показатель обнаружил сильную положительную корреляцию с употреблением табака и алкоголя; мировой показатель для рака этой локализации составил 26 %, однако в Северной Америке, Японии и Австралии он достиг 50 %.

В ряде стран Европы, а также в США отмечена тенденция к увеличению заболеваемости мужчин злокачественными новообразованиями тех локализаций, часть которых ассоциирована с ВПЧ, — головы и шеи (включая опухоли основания языка, миндалин и других отделов ротоглотки), анального канала, полового члена [12, 27, 28]. Что касается онкологической заболеваемости в России, то в таблице мы приводим данные за 2010–2015 гг. о приросте числа тех вновь выявленных форм рака, для которых установлена ассоциация с ВПЧ или предполагается ее возможность [10]; данные взяты избирательно из опубликованной сводки [29]. В таблице представлены и аналогичные показатели для женщин. Очевидно, что за этот период времени в России возрос

риск заболеть раком полости рта, ротоглотки и прямой кишки (включая анальный рак) как для мужчин, так и для женщин; риск для мужчин заболеть раком полового члена; риск для женщин заболеть РШМ. Возрос также риск заболеть раком мочевого пузыря для лиц обоих полов, резко увеличился риск для женщин заболеть раком молочной железы; очень сильно (на 36,8 %) вырос риск для мужчин заболеть раком предстательной железы. Таким образом, наметившаяся в России тенденция к изменению показателей онкологической заболеваемости для форм рака, которые доказанно или предположительно ассоциированы с ВПЧ, в целом согласуется с мировой. В связи с этим очевидна актуальность поиска путей предупреждения этих форм новообразований.

*Компоненты прироста числа вновь выявленных заболеваний злокачественными новообразованиями в России за период с 2010 по 2015 г. (в % к исходному уровню)*

| Локализация опухоли    | Мужчины       |                        | Женщины       |                        |
|------------------------|---------------|------------------------|---------------|------------------------|
|                        | общий прирост | прирост риска заболеть | общий прирост | прирост риска заболеть |
| Полость рта            | 19,4          | 6,2                    | 27,9          | 19,7                   |
| Ротоглотка             | 18,5          | 5,0                    | 26,6          | 16,6                   |
| Пищевод                | 10,4          | –3,0                   | 2,1           | –2,9                   |
| Прямая кишка           | 14,3          | 2,5                    | 12,4          | 4,4                    |
| Трахея, бронхи, легкое | 3,7           | –9,1                   | 15,4          | 7,4                    |
| Молочная железа        | —             | —                      | 16,4          | 7,9                    |
| Предстательная железа  | 47,8          | 36,8                   | —             | —                      |
| Половой член           | 21,4          | 9,8                    | —             | —                      |
| Мочевой пузырь         | 15,3          | 4,5                    | 19,6          | 12,5                   |
| Шейка матки            | —             | —                      | 13,5          | 7,7                    |
| Яичник                 | —             | —                      | 7,3           | –0,14                  |

### Заражение вирусом папилломы человека

Пути передачи ВПЧ при гетеросексуальных контактах неоднократно освещались в литературе; основным является генитально-генитальный контакт [10, 12, 30]. Существуют и иные способы передачи: анально-генитальный, орально-генитальный, ману-

ально-генитальный, заражение через секс-игрушки, самозаражение, т. е. перенос инфекции из одного органа в другой внутри одного организма. Динамика заражения ВПЧ определяется как особенностями организма человека, так и факторами, зависящими от вируса.

В контексте настоящего обзора важным представляется следующий факт: по результатам мета-анализа, который охватил 2972 супружеские пары, процент мужчин, зараженных тем же ВПЧ, что и их ВПЧ-положительная сексуальная партнерша (36 %), был значительно ниже, чем процент женщин, зараженных тем же ВПЧ, что и их ВПЧ-положительный партнер (55 %). Это может свидетельствовать о большей резистентности эпителиальных клеток полового члена к ВПЧ-инфекции, чем клетки эпителия шейки матки, или о меньшей продолжительности такой инфекции у мужчин [30].

### Осведомленность мужчин о вирусе папилломы человека

В 3 странах, в которых осуществляется тестирование на ВПЧ типов высокого риска в рамках скрининговых программ по профилактике РШМ, – США, Великобритании и Австралии – были проведены компьютерные опросы с целью выяснения степени осведомленности населения о ВПЧ и о программах их детекции. На добровольной основе около 1,5 тыс. мужчин и женщин в возрасте от 18 до 70 лет ответили на вопросы анкеты. Средний уровень знаний в данной области оказался низким, причем мужчины ответили на поставленные вопросы достоверно хуже женщин [31]. Ввиду растущей актуальности профилактики помимо РШМ также других ВПЧ-ассоциированных форм рака медицинские работники, которые провели данное исследование, указали на необходимость усилить просветительскую работу о ВПЧ среди мужчин.

### Заключение

Согласно данным зарубежных исследователей, инфицированность ВПЧ и скорость клиренса различны у мужчин и женщин; уязвимость разных органов к заражению ВПЧ неодинакова. Иммунный ответ на повторное заражение ВПЧ у женщин выражен сильнее, чем у мужчин. Естественная циркуляция ВПЧ у мужчин остается областью, в которой целесообразны дальнейшие исследования.

**Благодарность.** Автор выражает признательность к.м.н. В.Д. Ермаковой, сотруднику отдела патологической анатомии опухолей человека ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, за прочтение рукописи и обсуждение затронутой в ней темы.

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

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancer – a brief historical account. *Virology* 2009;384(2):260–5. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.046. PMID: 19135222.
2. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res* 1976;36(2 Pt 2):794. PMID: 175942.
3. Durst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80(12):3812–5. PMID: 6304740.
4. Schwarz E., Freese U.K., Gissmann L. et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314(6006):111–4. PMID: 2983228.
5. zur Hauzen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690–8. PMID: 10793105.
6. zur Hauzen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry* 2008;73(5):498–505. DOI: 10.1134/S0006297908050027. PMID: 18605974.
7. de Villiers E.M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 2013;445(1–2):2–10. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.023. PMID: 23683837.
8. Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401(1):70–9. DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.002. PMID: 20206957.
9. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 64. Human Papillomaviruses. Lyon, 1995.
10. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 90. Human Papillomaviruses. Lyon, 2007.
11. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 100. A review of human carcinogens. Part B. Biological agents. Lyon, 2011.
12. Giuliano A.R., Nyitray A.G., Kreimer A.R. et al. EUROGIN 2014 Roadmap: differences in HPV infection natural history, transmission, and HPV-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J Cancer* 2015;136(12):2752–60. DOI: 10.1002/ijc.29082. PMID: 25043222.
13. Hartwig S., Syrjanen S., Dominiak-Felden G. et al. Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe: a review. *BMC Cancer* 2012;12:30. DOI: 10.1186/1471-2407-12-30. PMID: 22260541.
14. de Martel C., Ferlay J., Franceschi S. et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012;13(6):607–15. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70137-7. PMID: 22575588.
15. Gillison M.L., Broutian T., Pickard R.K. et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA* 2012;307(7):693–703. DOI: 10.1001/jama.2012.101. PMID: 22282321.
16. Kreimer A.R., Pierce Campbell C.M., Lin H.-Y. et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet* 2013;382(9895):877–87. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60809-0. PMID: 23827089.
17. Pierce Campbell C.M., Kreimer A.R., Lin H.-Y. et al. Long-term persistence of oral human papillomavirus type 16: The HPV Infection in Men (HIM) study. *Cancer Prev Res (Phila)* 2015;8(3):190–6. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0296. PMID: 25575501.
18. Nyitray A.G., Carvalho da Silva R.J., Baggio M.L. et al. Age-specific prevalence of and risk factors for anal human papillomavirus (HPV) among men who have sex with women and men who have sex with men: The HPV in Men (HIM) study. *J Infect Dis* 2011;203(1):49–57. DOI: 10.1093/infdis/jiq021. PMID: 21148496.
19. Sichero L., Nyitray A.G., Nunes E.M. et al. Diversity of human papillomavirus in the anal canal of men: The HIM study. *Clin Microbiol Infect* 2015;21(5):502–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.12.023. PMID: 25698660.
20. Nyitray A.G., Carvalho da Silva R.J., Baggio M.L. et al. Six-month incidence, persistence, and factors associated with persistence of anal human papillomavirus in men: the HPV in men study. *J Infect Dis* 2011;204(11):1711–22. DOI: 10.1093/infdis/jir637. PMID: 21964400.
21. Giuliano A.R., Lazcano-Ponce E., Villa L.L. et al. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(8):2036–43. DOI: 10.1158/1055-9965. PMID: 18708396.
22. Dunne E.F., Unger E.R., Sternberg M. et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA* 2007;297(8):813–9. DOI: 10.1001/jama.297.8.813. PMID: 17327523.
23. Giuliano A.R., Lee J.H., Fulp W. et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet* 2011;377(9769):932–40. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62342-2. PMID: 21367446.
24. Sichero L., Pierce Campbell C.M., Ferreira S. et al. Broad HPV distribution in the genital region of men from the HPV infection in men (HIM) study. *Virology* 2013;443(2):214–7. DOI: 10.1016/j.virol.2013.04.024. PMID: 23722104.
25. Sichero L., Pierce Campbell C.M., Ferreira S. et al. High genital prevalence of cutaneous human papillomavirus DNA on male genital skin: the HPV Infection in Men Study. *BMC Infect Dis* 2014;14:677. DOI: 10.1186/s12879-014-0677-y. PMID: 25857319.
26. Morrison C., Catania F., Wakely P.Jr., Nuovo G.J. Highly differentiated keratinizing squamous cell cancer of the cervix: a rare, locally aggressive tumor not associated with human papillomavirus or squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25(10):1310–5. PMID: 11688467.
27. Grulich A.E., Poynten I.M., Machalek D.A. et al. The epidemiology of anal cancer. *Sex Health* 2012;9(6):504–8. DOI: 10.1071/SH12070. PMID: 22958581.
28. Chaturvedi A.K. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head and Neck Pathol* 2012;6(Suppl 1):S16–24. DOI: 10.1007/s12105-012-0377-0. PMID: 22782220.
29. Давыдов М.М., Аксель Е.М. Стандартизованные показатели онкоэпидемиологической ситуации 2015 г. Россия. *Евразийский онкологический журнал* 2017;5(2):298–317.
30. Reiter P.L., Pendergraft W.F. 3<sup>rd</sup>, Brewer N.T. Meta-analysis of human papillomavirus infection concordance. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(11):2916–31. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0576. PMID: 20833971.
31. Dodd R.H., McCaffery K.J., Marlow L.A. et al. Knowledge of human papillomavirus (HPV) testing in the USA, the UK and Australia: an international survey. *Sex Transm Infect* 2014;90(3):201–7. DOI: 10.1136/sextrans-2013-051402. PMID: 24412997.

# МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ К АНТИ-PD-1 ТЕРАПИИ

Я. А. Жуликов<sup>1</sup>, И. В. Самойленко<sup>2</sup>, Л. В. Демидов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);  
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

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

**Контакты:** Игорь Вячеславович Самойленко i.samoylenko@ronc.ru

Появление в клинической практике ингибиторов иммунных контрольных точек стало революцией в лечении метастатической меланомы кожи. Однако блокада PD-1 позволяет добиться объективного ответа лишь у 30–40 % пациентов. К настоящему времени известно множество механизмов первичной резистентности меланомы к иммунотерапии, связанных с особенностями как опухоли, так и опухолевого микроокружения. Как правило, ответ на анти-PD-1 терапию является длительным, но вторичная резистентность формируется у 25 % пациентов, имевших объективный ответ на данный вид лечения. В этом обзоре описаны основные механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии, а также возможные пути их преодоления.

**Ключевые слова:** меланома, иммунотерапия, анти-PD-1/PD-L1 терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-34-46

## MECHANISMS OF RESISTANCE TO ANTI-PD-1 THERAPY IN METASTATIC CUTANEOUS MELANOMA

Ya. A. Zhulikov<sup>1</sup>, I. V. Samoylenko<sup>2</sup>, L. V. Demidov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sechenov University, Bldg. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

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

The appearance of modulators immune synapse in clinical practice has become a revolution in metastatic skin melanoma treatment. However, blockade PD-1 allows to achieve objective response in only 30–40 % of patients. Recently, many mechanisms of primary resistance of melanoma to immunotherapy studied, they related both to the characteristics of the tumor and the tumor microenvironment. The response to anti-PD-1 therapy usually is durable, but acquired resistance emerges in 25 % of patients, who had an objective response to this treatment. This review will describe the main mechanisms of resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic skin melanoma and possible ways of their overcoming.

**Key words:** melanoma, cancer immunotherapy, anti-PD-1/PD-L1 treatment

### Введение

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек — блокаторов CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), PD-1 (programmed death 1) и его лиганда (PD-L1) — произвело революцию в лечении метастатической меланомы кожи и других злокачественных новообразований [1, 2]. Несмотря на высокую клиническую эффективность, у 50–60 % пациентов имеется первичная резистентность к анти-PD-1 терапии [3, 4]. Следует отметить, что при оценке ответа на терапию по критериям RECIST у 5 % пациентов с ранним прогрессированием наблюдается псевдопрогрессирование, обычно связанное с инфильтрацией опухоли цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL), впоследствии переходящее в объ-

ективный ответ [5]. На данный момент выделены предиктивные маркеры эффективности анти-PD-1 терапии: относительное количество лимфоцитов  $\geq 17,5$  %, наличие CD8<sup>+</sup> Т-клеток в опухолевом инфильтрате, а также прогностические маркеры: уровень лактатдегидрогеназы  $\leq 2,5$  нормы, отсутствие висцеральных метастазов или висцеральные метастазы только в легких [6]. Интересно, что имеется много данных о молекулярно-генетических маркерах опухоли, а также опухолевого микроокружения, связанных с первичной резистентностью меланомы к анти-PD-1 терапии. Однако нет ни одного рекомендованного маркера для отбора пациентов, нуждающихся в анти-PD-1 терапии. Наиболее обсуждаемым является вопрос о необходимости определения

экспрессии PD-L1 на поверхности опухолевых клеток. Результаты клинических исследований доказали, что экспрессия PD-L1 более чем 5 % опухолевых клеток связана с более высокой эффективностью анти-PD-1 терапии метастатической меланомы кожи [3, 7, 8]. Изучение маркеров первичной резистентности и разработка новых диагностических панелей открывают перспективы создания рациональных комбинаций анти-PD-1 с другими препаратами, а также выделения категории пациентов, у которых данный вид терапии потенциально неэффективен [9].

Как правило, ответ на анти-PD-1 терапию является длительным и стойким. Тем не менее при медиане наблюдения 21 мес вторичная резистентность формируется у 25 % пациентов, и вероятность ее развития не зависит от наличия предшествующей терапии [10]. На данный момент имеются скудные данные по механизмам развития вторичной резистентности к анти-PD-1 терапии, а также по эффективности различных методов лечения таких пациентов. Однако эти знания могут помочь в поиске наиболее эффективных методов лечения данной категории больных и разработке мер, препятствующих развитию вторичной резистентности.

#### Формирование клеточного иммунного ответа

Для уничтожения опухолевой клетки CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцит последовательно должен пройти следующие этапы: активация, пролиферация, дифференцировка и цитотоксичность.

Первый этап проходит в лимфоузлах и характеризуется образованием активационного синапса между антигенпрезентирующей клеткой (АПК), как правило, дендритной (ДК), и наивным Т-лимфоцитом. Накопление знаний об ингибиторах иммунных контрольных точек привело к переосмыслению теории активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. В настоящее время принято считать, что оптимальными условиями для их активации является наличие 2 активационных сигналов [11].

В образовании первого активационного сигнала участвуют комплекс МНС-I-антиген (major histocompatibility complex I type) на поверхности АПК и TCR (T-cell receptor), CD3, CD8 на поверхности Т-лимфоцита. Результатом этого взаимодействия является активация MAPK/ERK, p38 MAPK и PI3K/AKT/mTOR сигнальных путей, регулирующих пролиферацию и дифференцировку CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита. Вторым активационным сигналом является взаимодействие CD28 на поверхности Т-клетки и CD80/86 на поверхности АПК, приводящее к активации PI3K/AKT/mTOR сигнального пути. Таким образом, происходит амплификация активационных эффектов, что облегчает активацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита (рис. 1). Изменение работы любого из вышеописанных

взаимодействий приводит к нарушению активации Т-лимфоцита.

Завершается стадия активации после появления на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита ингибирующих молекул (CTLA-4, LAG3, Tim3) [12]. После этого происходит IL-2-зависимая ауто- и паракринная, стимулируемая Т-хелперами 1-го типа, пролиферация и дифференцировка CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в CTL. Этот этап длится несколько дней [13].

Заключительным этапом формирования клеточного иммунного ответа являются взаимодействие CTL с опухолевой клеткой и цитотоксичность. В формировании данного синапса участвуют TCR, CD3, CD8 на поверхности Т-лимфоцита и комплекс МНС-I-антиген на поверхности опухолевой клетки. После их взаимодействия происходят активация ZAP-70, фосфорилирование LAT, активация PKC (протеинкиназа C), RAC1, PLCγ1 и DYN (dynein), что обеспечивает поляризацию и перемещение centrosомы к области синапса. Завершается этот этап выбросом цитолитических гранул в область синаптической щели и уничтожением клетки-мишени (рис. 2) [14].

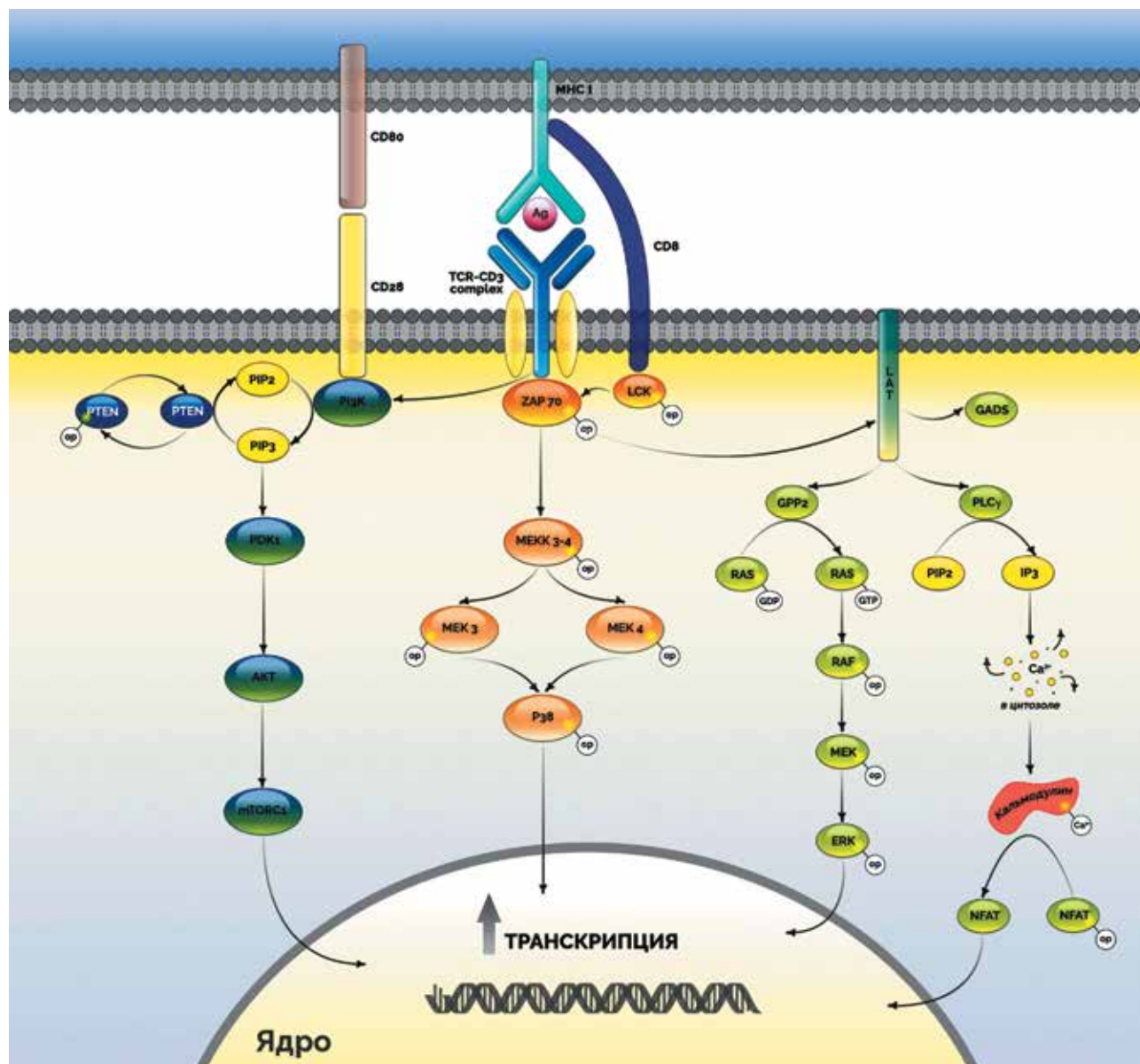
Знание молекулярных основ формирования клеточного иммунного ответа необходимо для понимания механизмов действия анти-PD-1 препаратов и развития резистентности к ним.

#### Функции PD-1/PD-L1

PD-1 является членом семейства CD28. Конститутивная экспрессия PD-1 наблюдается на поверхности CD8 и CD4 Т-лимфоцитов, NK-клеток, В-клеток, моноцитов [15]. Ключевую роль в индуцированной экспрессии PD-1 играет транслокация в ядро NFAT, происходящая после активации Т-лимфоцита [16, 17]. Другими индукторами экспрессии PD-1 являются интерфероны (ИФН) I типа [17, 18].

PD-L1 (programmed death ligand 1) и PD-L2 относятся к семейству белков B7. PD-L1 конститутивно экспрессируется на низком уровне ДК и другими профессиональными и непрофессиональными АПК — эндотелием, клетками иммунопrivилегированных органов, а также опухолевыми клетками. Экспрессия PD-L1 индуцируется провоспалительными цитокинами, в том числе ИФН I и II типов, TNFα (tumor necrosis factor α), VEGF (vascular endothelial growth factor) [19]. В опухолевых клетках экспрессия PD-L1 может повышаться за счет различных механизмов: активация PI3K/AKT/mTOR в глиобластомах, амплификация 9p24.1 в лимфомах, активирующие мутации в генах *BRAF* и *NRAS* в меланомах кожи [20–22].

При взаимодействии PD-1 на поверхности Т-клетки и PD-L1 на АПК происходит ингибирование активирующих сигналов, поступающих от комплекса TCR, CD3, CD8 и CD28 (рис. 3). Таким образом завершается фаза активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов,



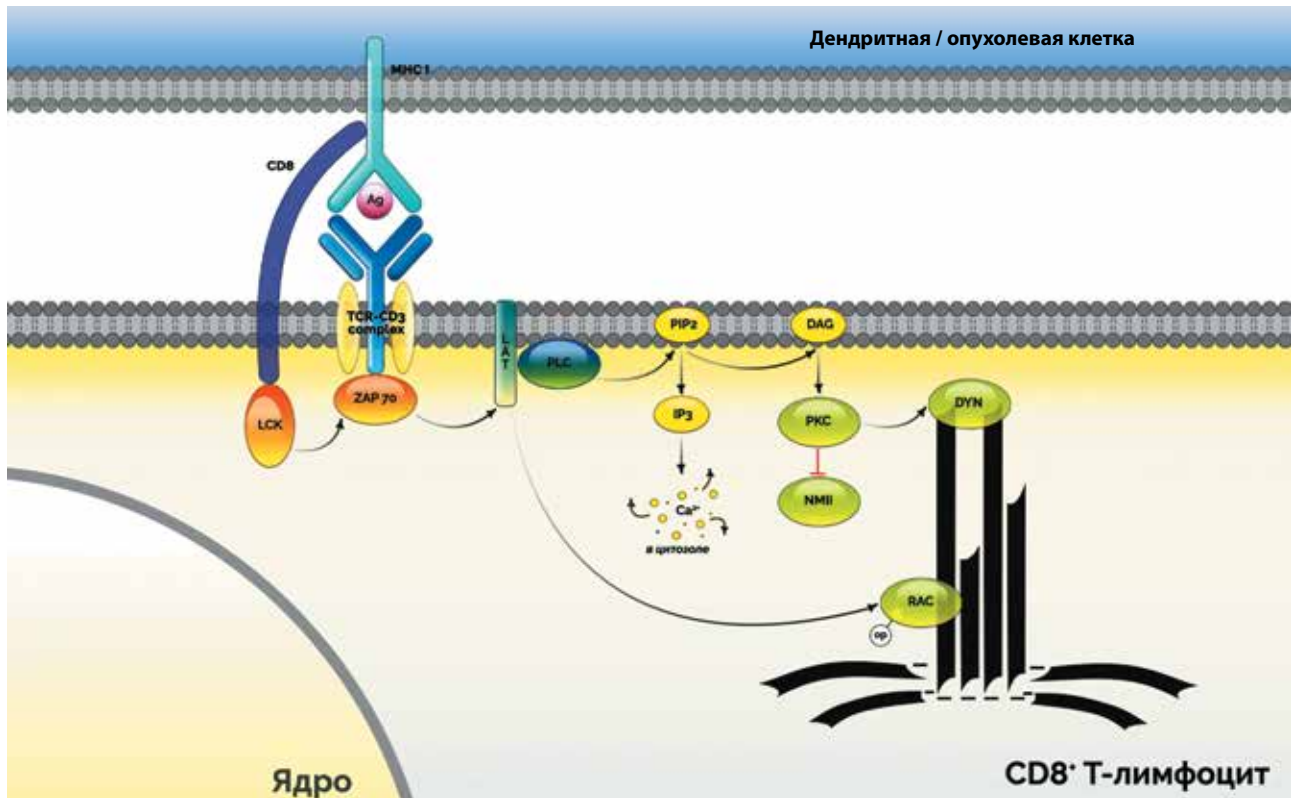
**Рис. 1.** Активационный иммунный синапс. Первый активационный сигнал — взаимодействие комплекса TCR, CD3, CD8 на поверхности T-лимфоцита с MHC-I-Ag на поверхности АПК. Результатом этого взаимодействия является активация внутриклеточной киназы ZAP-70. Взаимодействие CD8 с MHC-I приводит к активации Lck-киназы, также фосфорилирующей ZAP-70. Впоследствии ZAP-70 фосфорилирует LAT, который становится центром для активации нижележащих белков, таких как PLC (фосфолипаза C), комплекс GRB2, GADS и др. Активированная PLC гидролизует PIP2 (фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат) до IP3 (инозитол-1,4,5-трифосфат) и DAG (диацилглицерол). IP3 взаимодействует с  $Ca^{2+}$ -каналами эндоплазматической сети, что приводит к повышению уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле.  $Ca^{2+}$  связывается с кальмодулином, комплекс  $Ca^{2+}$  — кальмодулин активирует Ca-нейрин, впоследствии дефосфорилирующий и активирующий NFAT (nuclear factor of activated T cells). NFAT транслируется в ядро и повышает экспрессию IL-2 и PD-1. LAT также фосфорилирует и активирует белки сигнальных путей MAPK/ERK, p38 MAPK и PI3K/AKT/mTOR, стимулирующих пролиферацию, выживаемость и дифференцировку CD8<sup>+</sup> T-лимфоцита. Второй активационный сигнал — взаимодействие CD28 на поверхности T-лимфоцита и CD80/86 на поверхности АПК, которое приводит к активации сигнального пути PI3K/AKT/mTOR в T-клетке

что обеспечивает иммунную толерантность на периферическом уровне [17, 19].

Взаимодействие PD-1 на поверхности T-клеток и PD-L1 на опухолевых клетках ингибирует Lck и PLC, играющие ключевую роль в реализации цитолитического потенциала CTL. Кроме того, PD-L1 может взаимодействовать с CD80, экспрессируемым

на поверхности CD8<sup>+</sup> T-лимфоцитов и ДК, что позволяет ингибировать цитолитическую функцию CTL даже при проведении анти-PD-1 терапии [23].

Блокада PD-1 доказала свою эффективность в лечении метастатической меланомы в нескольких клинических исследованиях [3, 4, 6]. Однако у 45 % предлеченных и 25 % пациентов, не получавших ранее



**Рис. 2.** Цитолитический иммунологический синапс. В формировании данного синапса участвуют TCR, CD3, CD8 на поверхности T-лимфоцита и комплекс MHC-I-антиген на поверхности опухолевой клетки. Последовательно происходят активация ZAP-70, фосфорилирование LAT, активация PLC $\gamma$ 1. PLC $\gamma$ 1 расщепляет PIP2 на DAG и IP3, что играет ключевую роль в полимеризации цитросомы. DAG активирует изоформы PKC (PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , PKC $\zeta$  и PKC $\eta$ ). PKC $\eta$  ингибирует NM II (nonmuscle myosin II), способствуя его накоплению на заднем (+) конце цитросомы, что создает толкающую силу. Также активация PKC $\eta$  приводит к накоплению в области синапса DYN (динеина), тянущего цитросому за передний (-) конец области синапса. После того как цитросома оказывается в области синапса, происходит выброс цитолитических гранул в синаптическую щель и уничтожение клетки-мишени

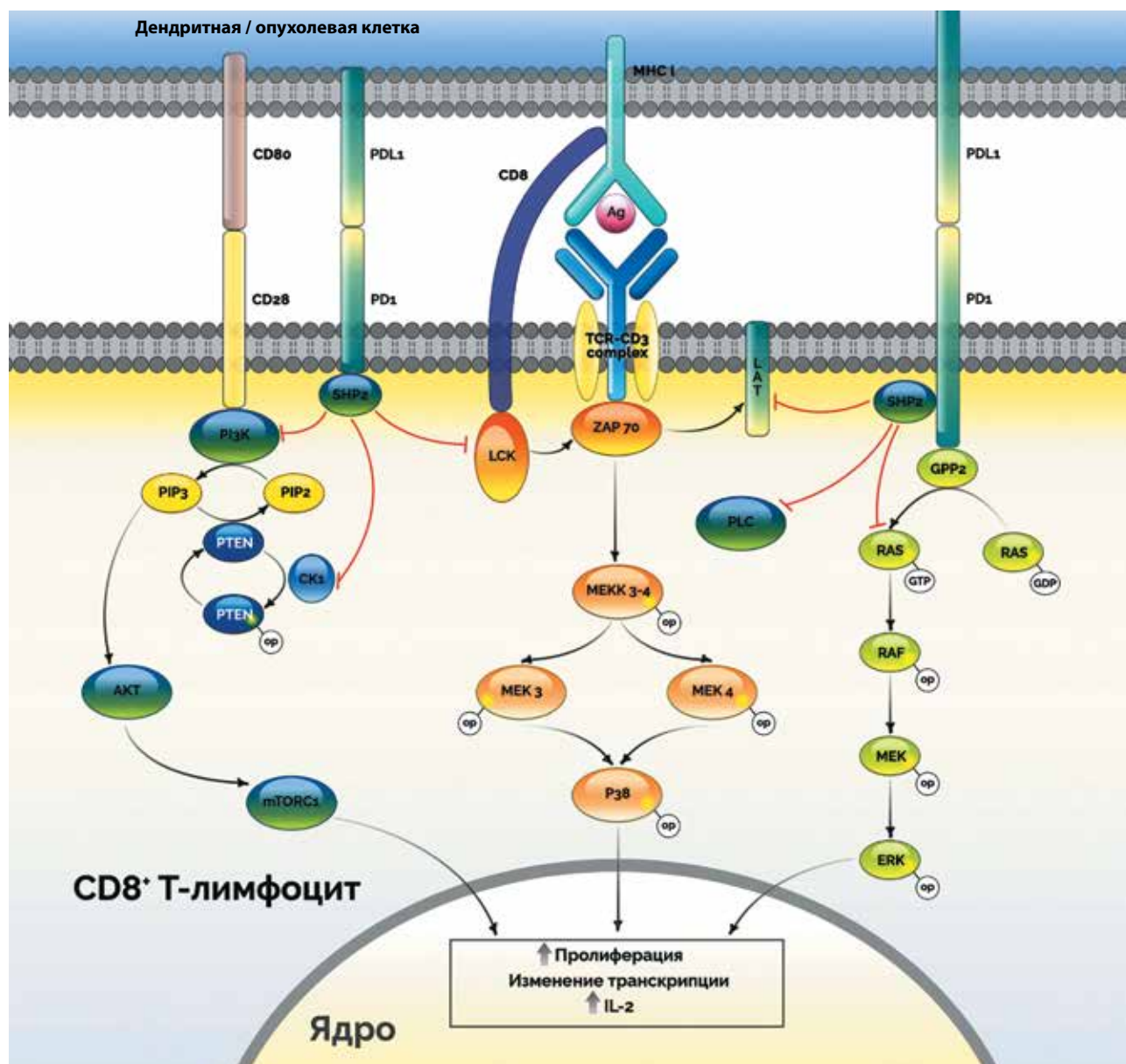
терапию по поводу метастатической меланомы кожи, наблюдается прогрессирование заболевания до первого контрольного обследования [6]. Механизмы первичной резистентности можно условно разделить на 2 группы: события, происходящие в клетках опухоли и микроокружения, хотя они тесно связаны друг с другом. К первой группе можно отнести: активирующие мутации в гене *BRAF*, потерю *PTEN*, активацию WNT-каскада, секрецию VEGF и противовоспалительных цитокинов, гиперэкспрессию CD155. Исследование W. Hugo и соавт. показало, что в меланоме с первичной резистентностью к анти-PD-1 терапии гиперэкспрессированы гены: иммуносупрессорных цитокинов (*IL10*, *VEGFA*, *VEGFC*), хемоаттрактантов моноцитов и макрофагов (*CCL2*, *CCL7*, *CCL8* и *CCL13*), мезенхимальные (*AXL*, *ROR2*, *WNT5A*, *LOXL2*, *TWIST2*, *TAGLN*, *FAP*) [24]. Ко второй группе событий можно отнести экспрессию CTLA-4, Tim3, LAG3, TIGIT, IDO1 клетками микроокружения [25].

#### Наличие активирующих мутаций *BRAF V600*

Согласно данным Cancer Genome Atlas, активирующие мутации в гене *BRAF* имеются в 52 % всех

меланоме кожи [26]. Большинство мутаций расположены в киназном домене и повышают активность *BRAF*. Наиболее часто встречается замена валина на глутамин в кодоне 600 (*BRAF V600E*). М. Mandalà и соавт. выделили несколько основных механизмов подавления клеточного иммунного ответа опухолевыми клетками с мутацией *BRAF V600E*: секреция иммуносупрессивных цитокинов (IL1 $\beta$ , IL6, IL10, VEGFA); изменение опухолевого микроокружения с иммунокомпетентного на иммуносупрессивный тип; снижение экспрессии MHC-I и меланоцитарных дифференцировочных генов (MDAs) клетками меланомы [27].

Две независимые группы исследователей через 2 нед с начала приема *BRAF*-ингибиторов (*BRAF*i) наблюдали повышение экспрессии опухолевыми клетками MDAs (MART-1, gp100, TRP-1 и TRP-2), MHC-I, PD-L1, а также увеличение содержания в опухолевом инфильтрате CD8<sup>+</sup> Т-клеток и снижение миелоидных супрессорных клеток (MDSC) и Treg [28, 29]. Интересно, что MEK-ингибиторы (MEKi) подавляют пролиферацию CD8<sup>+</sup> Т-клеток *in vivo*, но на мышиных моделях применение MEKi увеличивает количество активированных CD8<sup>+</sup> TILs (tumor-infiltrating



**Рис. 3.** Влияние взаимодействия PD-1 и PD-L1 на активацию CD8 T-лимфоцита. Взаимодействие PD-1 со своим лигандом приводит к активации SHP2-фосфатазы, дефосфорилирующей и инактивирующей Lck, а также стабилизирующей дефосфорилированную форму PTEN. В результате ингибируются сигнальные каскады PI3K/AKT/mTOR и MAPK в CD8<sup>+</sup> T-лимфоците. Также PD-1 подавляет активность PLC $\beta$ 1 и Ras, но не влияет на активность p38, поэтому не вызывает глобальное торможение сигналов, исходящих от TCR [19]

lymphocytes). Кроме того, при совместном применении анти-PD-1 и MEKi наблюдались более длительные ответы, чем при приеме MEKi в монотерапии [30]. Изменения опухолевого микроокружения, вызываемые применением BRAFi и комбинации BRAFi с MEKi, вызывают интерес к их совместному использованию с ингибиторами иммунных контрольных точек. Первой попыткой стало исследование эффективности комбинации ипилимумаба (анти-CTLA-4) и вемурафениба (BRAFi) для лечения метастатической меланомы кожи. Однако применение этой схемы терапии было ассоциировано с высокой

частотой аутоиммунных гепатитов и перфораций кишечника, поэтому исследование было завершено на I фазе [31]. Анти-PD-1/PD-L1 реже вызывают иммуноопосредованные нежелательные явления, чем анти-CTLA-4. Поэтому применение комбинации анти-PD-1/PD-L1 с BRAFi  $\pm$  MEKi кажется перспективным направлением в терапии метастатической меланомы кожи. На данный момент идет несколько исследований, изучающих эффективность применения этих комбинаций для лечения метастатической меланомы кожи с активирующими мутациями в гене *BRAF* (NCT02910700, NCT02357732, NCT02967692).

### Роль сигнального пути WNT в резистентности меланомы к анти-PD-1 терапии

Сигнальный путь WNT (Wingless and INT) играет важную роль в прогрессии злокачественных новообразований различных локализаций, регулируя пролиферацию, дифференцировку, адгезию, эпителиально-мезенхимальный переход, инвазию, а также экспрессию многочисленных цитокинов опухолевыми клетками [32]. Активация данного сигнального пути наблюдается примерно в 30 % меланом кожи [33]. Имеется 2 независимых механизма активации сигнального пути WNT: канонический ( $\beta$ -катенин-зависимый) и неканонический (связанный с PKC, RAC1, RhoA) [32].

К настоящему времени доказана взаимосвязь между наличием  $\beta$ -катениновой подлинки опухоли и первичной резистентностью меланомы к анти-PD-1 терапии. В исследовании S. Spranger и соавт. у 48 % пациентов с метастатической меланомой кожи, у которых отсутствовали TILs, был активирован сигнальный путь WNT [34]. В последующих экспериментах на мышиных моделях было обнаружено, что в группе *BRAF V600E/PTEN*  $-/-$  с недеградируемым  $\beta$ -катенином в инфильтрате отсутствовали  $CD8^+$  Т-лимфоциты, в отличие от группы мышей *BRAF V600E/PTEN*  $-/-$  [34]. Наиболее вероятным механизмом этого является активация свободным  $\beta$ -катенином ATF3 (activation transcription factor 3) – ингибитора транскрипции

CCL4 (macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ , MIP-1 $\beta$ ) [35]. Результат – нарушение антигенпрезентации от BATF3-ДК к  $CD8^+$  Т-лимфоцитам. Интересно, что внутриопухолевая инъекция активированных ДК приводила к появлению  $CD8^+$  Т-лимфоцитов в опухолевом инфильтрате [34].

Гиперэкспрессия *WNT5A* и включение неканонического сигнального пути WNT в опухолевых клетках повышает их метастатическую способность и способствует прогрессии заболевания, а также положительно коррелирует с первичной резистентностью меланомы к анти-PD-1 терапии [24, 36]. Доказано, что *WNT5A*, связываясь со своим рецептором на поверхности ДК, повышает экспрессию IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygenase-1) [37].

Таким образом, блокада канонического пути WNT или ATF3 в клетках меланомы кожи может повысить эффективность анти-PD-1 терапии.

### Сигнальный каскад PI3K/AKT/mTOR

Сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR регулирует пролиферацию, метаболизм, рост, выживаемость клеток, аутофагию. Также один из эффектов активации PI3K/AKT/mTOR – повышение экспрессии противовоспалительных цитокинов и различных хемоаттрактантов, в том числе CCL2 и фактора роста эндотелия А (VEGFA). Наиболее часто активация PI3K/AKT/mTOR в клетках меланомы связана со снижением

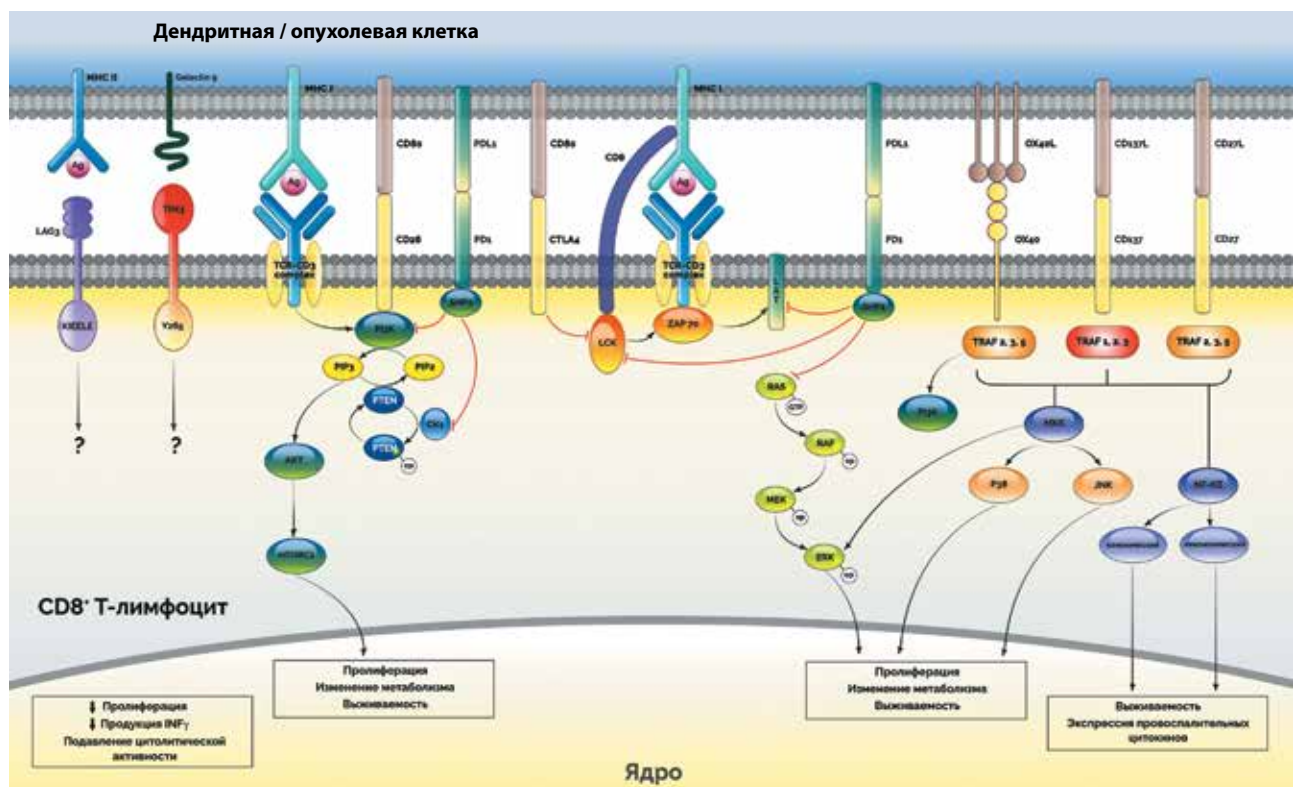


Рис. 4. Различные костимулирующие и коингибирующие взаимодействия, регулирующие Т-клеточный иммунный ответ (объяснение в тексте)

экспрессии *PTEN*. Потеря *PTEN* наблюдается в 30 % меланом кожи, наиболее часто совпадает с *BRAF*-мутацией [38]. Анализ подгруппы из 39 пациентов, получавших ниволумаб или пембролизумаб по поводу метастатической меланомы кожи, показал, что пациенты с экспрессией *PTEN* в  $\geq 10$  % опухолевых клеток получают большее преимущество от терапии анти-PD-1 препаратами, чем пациенты с отсутствием *PTEN* в опухолевых клетках ( $p = 0,029$ ), независимо от пола, расы, уровня лактатдегидрогеназы, стадии заболевания [39].

Эффективность одновременного ингибирования PI3K/АКТ и блокирования PD-1 была доказана на мышинных моделях меланомы с делецией *PTEN*. Одновременная блокада CTLA-4, PD-L1 и PI3K $\gamma$  увеличивала количество полных ответов с 0 до 30 % при использовании клеточной линии 4T1 и с 20 до 80 % при использовании линии B16-GMCSF по сравнению с группой без ингибитора PI3K $\gamma$  [40].

На сегодняшний день иницировано одно исследование Ib фазы по совместному применению ингибитора PI3K $\delta$  (INCB050465) и пембролизумаба в терапии различных злокачественных новообразований (NCT02646748).

#### Секреция VEGF

VEGF входит в семейство факторов роста эндотелия и включает 7 протеинов VEGF A–E, плацентарный фактор роста (PlGF) 1 и 2 [41]. Роль VEGFA в подавлении клеточного иммунного ответа хорошо изучена. VEGFA снижает экспрессию E-селектина, VCAM1 и ICAM1 клетками эндотелия, затрудняя миграцию Т-лимфоцитов в опухолевый очаг [42].

Результаты нескольких исследований показали, что высокая экспрессия VEGFA опухолевыми клетками способствует накоплению Treg [43] и MDSC (myeloid suppressor stem cells) [44] в микроокружении опухоли, а также нарушает созревание ДК на мышинных моделях, приводя к формированию иммуносупрессорного микроокружения.

Анализ транскриптома метастатических меланом пациентов перед анти-PD-1 терапией доказал, что высокая экспрессия VEGFA и VEGFC ассоциирована с первичной резистентностью к данному лечению [24]. Ведутся многочисленные исследования эффективности использования комбинаций анти-PD-1/PD-L1 с антиангиогенными препаратами в терапии метастатического светлоклеточного рака почки.

#### Экспрессия других ингибиторов и активаторов иммунных контрольных точек

После взаимодействия с АПК на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов повышается экспрессия многочисленных молекул, стимулирующих или ингибирующих активацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита. Следова-

тельно, блокады одного ингибирующего сигнала от взаимодействия PD-1 и PD-L1 может быть недостаточно для реализации стойкого противоопухолевого иммунного ответа из-за активации других иммунных контрольных точек (рис. 4).

#### CTLA-4

CTLA-4 входит в семейство белков B7. Впервые был обнаружен в библиотеке ДНК мышинных CTLs. Пик экспрессии CTLA-4 на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов наблюдается через 48 ч после активации. Сродство CTLA-4 к CD80 и CD86 выше, чем у CD28. Кроме того, связывание CTLA-4 с CD80/86 приводит к активации фосфатазы PP2A (protein phosphatase 2), дефосфорилирующей и инактивирующей LAT – ключевой белок в TCR-сигнальном каскаде [45]. Таким образом завершается фаза активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита.

Поскольку CTLA-4 и PD-1 регулируют формирование клеточного иммунного ответа на разных уровнях, применение комбинаций препаратов, блокирующих эти рецепторы, является рациональным. На данный момент имеются результаты исследования III фазы CHECKMATE 067 по применению комбинации ипилимумаба и ниволумаба в лечении метастатической меланомы. Подгрупповой анализ этого исследования показал отсутствие статистически значимого различия в медиане выживаемости без прогрессирования у пациентов с PD-L1-позитивными опухолями (экспрессия PD-L1 на поверхности  $\geq 5$  % опухолевых клеток) между группами комбинированной терапии и ниволумаба. В подгруппе с PD-L1-негативными опухолями было достигнуто статистически значимое преимущество комбинированной терапии по сравнению с ниволумабом: медиана выживаемости без прогрессирования 11,2 мес против 5,3 мес [3].

#### LAG3

LAG3 является гомологом CD4 и связывается с МНС-II. Экспрессия LAG3 наблюдается на поверхности NK-клеток, В-клеток, ДК, а также активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Имеются данные о связи LAG3 с истощением пула CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в очагах хронических вирусных инфекций, а также в меланоме кожи, светлоклеточных опухолях почки, опухолях яичников [46]. Блокирование LAG3 на поверхности Т-лимфоцитов приводит к повышению экспрессии ими IL-2, IL-4, ИФН $\gamma$ . Механизмы, объясняющие эти эффекты, неизвестны [47]. На данный момент запущено несколько исследований, изучающих эффективность монотерапии анти-LAG3 препаратами и их комбинации с анти-PD-1 в лечении различных злокачественных новообразований (NCT01968109) [48].

### Tim3

Tim3 экспрессируется на поверхности активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, Т-хелперов 1-го типа, макрофагов [49]. Лигандом Tim3 является галектин 9. Пути внутриклеточной передачи сигналов от Tim3 на сегодняшний день не описаны. Подавление взаимодействия Tim3–галектин 9 приводит к развитию различных аутоиммунных заболеваний у мышей [50]. Повышение экспрессии Tim3 на поверхности TILs во время анти-PD-1 терапии является маркером развивающейся резистентности на моделях аденокарциномы легкого с мутациями *EGFR T790M/L858R* и *KRAS*. Совместная блокада Tim3 и PD-1 была эффективна на мышинных моделях аденокарциномы легкого с резистентностью к анти-PD-1 терапии [50]. Таким образом, одновременная блокада PD-1 и LAG3/Tim3 может повысить эффективность иммунотерапии меланомы и замедлить развитие вторичной резистентности.

### TIGIT

TIGIT (T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) был обнаружен у лиц, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), его экспрессия на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов была взаимосвязана с маркерами прогрессирования ВИЧ. TIGIT экспрессируется на поверхности Treg, CTLs, NK-клеток, его лигандами являются CD155 и CD112. CD155 обладает самым высоким сродством к TIGIT. Гиперэкспрессия CD155, по некоторым данным, наблюдается у 90 % метастатических меланом кожи [51]. После связывания TIGIT со своим лигандом активируется внутриклеточный ITIM-домен, впоследствии активирующий фосфатазу SHIP-1, что приводит к дефосфорилированию и инактивации Lck. Таким образом, взаимодействие TIGIT с CD155 на поверхности опухолевой клетки снижает цитолитический потенциал CTL, обладая синергичным действием с PD-L1 *in vitro* [52].

TIGIT и его лиганды – CD155, CD112, а также молекулы-двойники с противоположными функциями – CD226, CD96 регулируют активность NK- и Т-клеток. Увеличение влияния CD155/CD112 и TIGIT приводит к ингибированию противоопухолевого иммунного ответа и может лежать в основе первичной резистентности к анти-PD-1 терапии. Доказано, что CD8<sup>+</sup>TIGIT<sup>+</sup> Т-лимфоциты дисфункциональны, в то время как TIGIT<sup>+</sup> Treg обладают высокой супрессорной активностью [53]. Совместное блокирование CD155/TIGIT с PD-1/PD-L1 является перспективным направлением в иммунотерапии меланомы.

### Члены суперсемейства TNFR

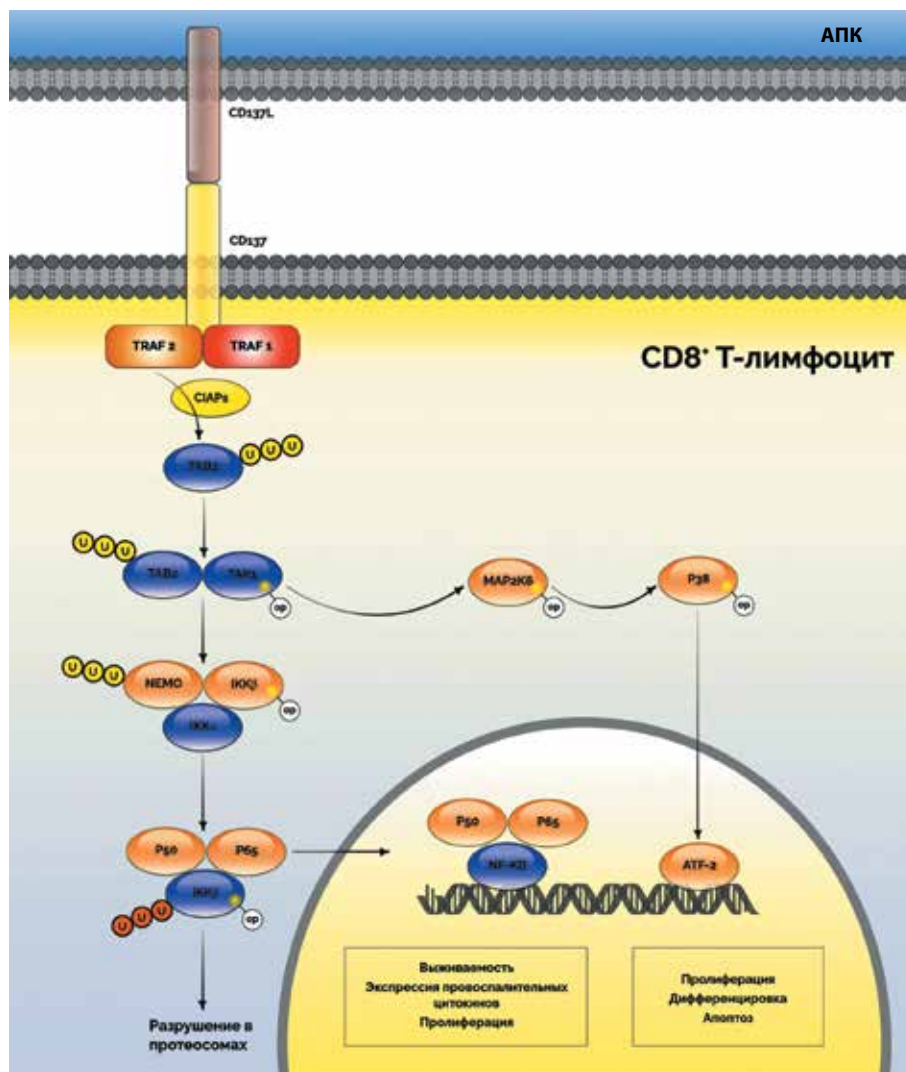
Суперсемейство TNFR (tumor necrosis factor receptor) включает 27 членов. Наиболее интересными ми-

шенями для иммунотерапии являются 4-1BB, OX-40, CD27, их экспрессия наблюдается на поверхности NK- и Т-клеток. Взаимодействие данных белков с соответствующими им лигандами приводит к активации CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита (рис. 5) [54].

4-1BB (CD137) имеет 1 лиганд – CD137L, который экспрессируется макрофагами, активированными В-лимфоцитами и ДК. Запуск внутриклеточных каскадов, контролируемых 4-1BB, стимулирует пролиферацию и повышает выживаемость CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Интересно, что экспрессия CD137 в опухолевом микроокружении выше, чем в нормальных тканях. Одним из возможных объяснений данного факта является HIF1 $\alpha$  (hipoxia-inducible factor 1 $\alpha$ ) – зависимая индукция экспрессии CD137. Это позволяет рассматривать комбинирование активаторов 4-1BB с анти-PD-1/PD-L1 препаратами как перспективную область иммуноонкологии [55].

OX-40 (CD134), так же как и CD137, является активирующим рецептором, появляется на поверхности CD4 и CD8 Т-лимфоцитов через 24–48 ч после их активации. OX-40 имеет 1 лиганд – CD252 (OX-40L), экспрессирующийся на поверхности АПК, эндотелиальных и NK-клеток. Взаимодействие OX-40 и OX-40L приводит к повышению пролиферации и выживаемости CD8<sup>+</sup> Т-клеток, что необходимо для формирования клеток памяти [56]. Доклинические модели показывают, что в зависимости от цитокинового состава в микроокружении активация OX-40 может стимулировать пролиферацию и активность Treg либо снижать их супрессорную активность [57, 58]. Синергизм агонистов OX-40 и анти-PD-1 препаратов является предпосылкой для исследования эффективности комбинации этих препаратов в лечении злокачественных новообразований различных локализаций. С одной стороны, взаимодействие OX-40 со своим лигандом активирует пролиферацию и выживаемость CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, в том числе экспрессирующих на поверхности PD-1. С другой стороны, OX-40 повышает экспрессию ИФН $\gamma$ , который индуцирует экспрессию PD-1 на поверхности CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцита [59].

CD27 является активирующей молекулой, конститутивно экспрессируется на поверхности активированных CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и клеток памяти, NK- и NKT-клеток, а также В-лимфоцитов и Treg и имеет 1 лиганд – CD70. Взаимодействие CD27 и CD70 повышает пролиферацию и выживаемость CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [60]. На данный момент в клинических исследованиях изучается эффективность применения агонистического антитела к CD27 – варилумаба в комбинации с различными иммуноонкологическими препаратами.



**Рис. 5.** Ранний этап трансдукции активационного сигнала от CD137. Взаимодействие членов суперсемейства TNFR со своими лигандами приводит к образованию гетеродимеров и активации TRAFs-белков (tumor necrosis factor receptor-associated factors). Комплексы, содержащие TRAF2, способны взаимодействовать с убиквитинлигазой E3, запуская полиубиквитинирование белков-мишеней. Эти события приводят к активации канонического и неканонического NF-κB сигнального пути, а также MAPK. Результатом этого являются пролиферация, ингибирование апоптоза и стимулирование дифференцировки CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов [54]

### IDO1

IDO1 — внутриклеточный гемсодержащий фермент, катализирующий превращение триптофана в кинуренин. В норме IDO1 экспрессируется эндотелием плаценты, зрелыми ДК, а также в лимфоидных органах и играет важную роль в предотвращении отторжения аллогенного плода во время беременности [61]. Экспрессия IDO1 также может наблюдаться в клетках некоторых злокачественных новообразований, в том числе меланомы.

Экспрессия IDO1 приводит к истощению триптофана в опухолевом микроокружении. Накопление триптофан-дефицитных транспортных РНК в цитоплазме активирует стресс-ассоциированную киназу — GCN2 (general control non-depressible 2), фосфорилирующую и инактивирующую трансляционный

фактор инициации (eIF2) [62]. Индукция экспрессии IDO1 в клетках линии HELA с помощью ИФНγ приводила к снижению содержания фосфорилированных форм 4EBP1 и S6K1, что говорит о подавлении активности сигнального пути PI3K/AKT/mTOR. Обработка клеток ингибитором IDO1 индоксимодом приводила к реактивации PI3K/AKT/mTOR в клетках HELA [63]. Как было написано выше, активация этого сигнального пути играет критическую роль на этапе активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

Повышение соотношения кинуренин/триптофан в крови пациентов с метастатической меланомой кожи ассоциировано с низкой общей выживаемостью [64].

На сегодняшний день имеются результаты II фазы клинического испытания ингибитора IDO эпакдастата в комбинации с пембролизумабом в лечении

метастатической меланомы кожи, частота объективного ответа составила 56 %. На основании этих данных запущена III фаза клинического испытания эпакдистата.

#### Механизмы вторичной резистентности к анти-PD-1 терапии

На сегодняшний день основными предполагаемыми механизмами развития вторичной резистентности меланомы кожи к анти-PD-1 терапии являются: дисфункция интерферонового пути в клетках опухоли (мутации в JAK1-2), мутации в  $\beta$ 2-микроглобулине (B2M), экспрессия других иммунных чекпойнтов. К сожалению, для данной группы пациентов доступно мало эффективных терапевтических опций.

JAK/STAT сигнальный путь в настоящий момент считается одним из наиболее значимых путей, приводящих к пролиферации и дифференцировке клеток врожденного и приобретенного иммунитета [65]. ИФН I и II типов являются активаторами этого сигнального пути. Семейство JAK-киназ включает JAK1, JAK2, JAK3, TYK2 [66]. После активации JAK1 и JAK2 происходят фосфорилирование и активация STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1), который в последующем образует гомодимер, транслируется в ядро и связывается с промоторами IRF (interferon responsive factor). Это приводит к повышению экспрессии множества генов, в том числе MHC-I, TAP1 (transporter associated with antigen processing 1). Снижение активности JAK/STAT пути в клетках меланомы затрудняет антигенпрезентацию CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам, тем самым подавляя клеточный иммунный ответ. Мутации в JAK1 связаны с резистентностью ко всем 3 типам ИФН, в то время как мутации в JAK2 ассоциированы с резистентностью только к ИФН $\gamma$  [67].

B2M является одним из 4 доменов MHC-I. Одной из функций B2M является транспорт MHC-I из эндоплазматической сети к клеточной мембране. Возможны 2 пути инактивации B2M: потеря части хромосомы 15 и мутации в B2M [68].

Наиболее исследуемыми путями преодоления вторичной резистентности к анти-PD-1 терапии являются применение лучевого лечения и онколитических вирусов.

Применение лучевого лечения способно вернуть чувствительность меланомы кожи к анти-PD-1 терапии [69]. Основной механизм этого эффекта — повышение секреции ИФН $\beta$  Т-лимфоцитами, что приводит к увеличению экспрессии MHC-I опухолевыми клетками [70].

В настоящее время изучается эффективность совместного применения онколитических вирусов

и анти-PD-1 препаратов, в том числе у пациентов, резистентных к иммунотерапии. В 2015 г. FDA (Food and Drug Administration) одобрила применение TVEC (talimogene laherparepvec) для лечения метастатической меланомы кожи. TVEC — герпес-вирус человека 1-го типа с встроенным в геном GM-CSF. Помимо непосредственного онколитического действия TVEC оказывает массу других местных и системных эффектов: увеличение экспрессии на поверхности опухолевых клеток DAMPs и PAMPs (damage and pathogen associated molecular patterns), что вместе с GM-CSF, интегрированным в геном вируса, привлекает клетки врожденного иммунитета и увеличивает секрецию ими ИФН I типа. Результатом этого является повышение экспрессии MHC-I на поверхности опухолевых клеток и их апоптоз, а также стимулирование созревания ДК, что может опосредовать системный эффект. На данный момент идет несколько клинических исследований по изучению эффективности совместного применения ипилимумаба с TVEC (NCT01740297) и ниволумаба с TVEC (NCT02263508) у пациентов с метастатической меланомой кожи [71].

#### Заключение

Появление ингибиторов иммунных контрольных точек стало революцией в лечении метастатической меланомы. Однако частота объективного ответа на ниволумаб составляет 30–40 %. На данный момент описаны многочисленные механизмы резистентности меланомы кожи к анти-PD-1 терапии, которые могут быть использованы для создания генетической тестовой панели для отбора когорты пациентов, которым назначать анти-PD-1 терапию нецелесообразно из-за ее потенциальной неэффективности. Многие из описанных выше механизмов первичной резистентности к анти-PD-1 терапии также являются и вторичными механизмами резистентности к BRAFi. Детальное изучение их пересечения может помочь решить вопрос об оптимальной последовательности таргетной и иммунотерапии в лечении метастатической меланомы у пациентов с активирующими мутациями в гене *BRAF*, а также о возможности их сочетания.

Круг злокачественных новообразований, для лечения которых одобрены препараты, блокирующие PD-1, постоянно растет, что позволяет ожидать увеличения количества пациентов с вторичной резистентностью к данному виду терапии. Появляются данные о повышении экспрессии других ингибирующих активность CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов молекул у этих пациентов. В ближайшие годы произойдет увеличение количества новых иммуноонкологических препаратов, что повысит эффективность иммунотерапии меланомы и других злокачественных новообразований.

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

- Mellman I., Coukos G., Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480(7378):480–9. DOI:10.1038/nature10673. PMID: 22193102.
- Kaufman H.L., Kirkwood J.M., Hodi F.S. et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(10):588–98. DOI: 10.1038/nrclinonc.2013.153. PMID: 23982524.
- Larkin J., Hodi F.S., Wolchok J.D. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015;373(13):1270–1. DOI: 10.1056/NEJMc1509660. PMID: 26398076.
- Weber J.S., D'Angelo S.P., Minor D. et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015;16(4):375–84. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)70076-8. PMID: 25795410.
- Khoja L., Kibiro M., Metser U. et al. Patterns of response to anti-PD-1 treatment: an exploratory comparison of four radiological response criteria and associations with overall survival in metastatic melanoma patients. *Br J Cancer* 2016;115(10):1186–92. DOI: 10.1038/bjc.2016.308. PMID: 27701388.
- Ji R.R., Chasalow S.D., Wang L. et al. An immune-active tumor microenvironment favors clinical response to ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61(7):1019–31. DOI: 10.1007/s00262-011-1172-6. PMID: 22146893.
- Topalian S.L., Taube J.M., Anders R.A., Pardoll D.M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2016;16(5):275–87. DOI: 10.1038/nrc.2016.36. PMID: 27079802.
- Fusi A., Festino L., Botti G. et al. PD-L1 expression as a potential predictive biomarker. *Lancet Oncol* 2015;16(13):1285–7. DOI: 10.1016/S1470-2045(15)00307-1. PMID: 26433815.
- Walker L.S. EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis. *Immunol Lett* 2017;184:43–50. DOI: 10.1016/j.imlet.2017.02.007. PMID: 28216262.
- Ribas A., Hamid O., Daud A. et al. Association of pembrolizumab with tumor response and survival among patients with advanced melanoma. *JAMA* 2016;315(15):1600–9. DOI: 10.1001/jama.2016.4059. PMID: 27092830.
- Stefanová I., Hemmer B., Vergelli M. et al. TCR ligand discrimination is enforced by competing ERK positive and SHP-1 negative feedback pathways. *Nat Immunol* 2003;4(3):248–54. DOI: 10.1038/ni895. PMID: 12577055.
- Andrews L.P., Marciscano A.E., Drake C.G., Vignali D.A. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev* 2017;276(1):80–96. DOI: 10.1111/imr.12519. PMID: 28258692.
- Liao W., Lin J.X., Leonard W.J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013;38(1):13–25. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.01.004. PMID: 23352221.
- de la Roche M., Asano Y., Griffiths G.M. Origins of the cytolytic synapse. *Nat Rev Immunol* 2016;16(7):421–32. DOI: 10.1038/nri.2016.54. PMID: 27265595.
- Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 2008;26:677–704. DOI: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. PMID: 18173375.
- Oestreich K.J., Yoon H., Ahmed R., Boss J.M. NFATc1 regulates PD-1 expression upon T cell activation. *J Immunol* 2008;181(7):4832–9. PMID: 18802087.
- Jin H.T., Ahmed R., Okazaki T. Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;350:17–37. DOI: 10.1007/82\_2010\_116. PMID: 21061197.
- Cho H.Y., Lee S.W., Seo S.K. et al. Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN- $\alpha$ -induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 2008;1779(12):811–9. DOI: 10.1016/j.bbagr.2008.08.003. PMID: 18771758.
- Boussiotis V.A. Molecular and biochemical aspects of the PD-1 checkpoint pathway. *N Engl J Med* 2016;375(18):1767–78. DOI: 10.1056/NEJMr1514296. PMID: 27806234.
- Green M.R., Monti S., Rodig S.J. et al. Integrative analysis reveals selective 9p24.1 amplification, increased PD-1 ligand expression, and further induction via JAK2 in nodular sclerosing Hodgkin lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma. *Blood* 2010;116(17):3268–77. DOI: 10.1182/blood-2010-05-282780. PMID: 20628145.
- Parsa A.T., Waldron J.S., Panner A. et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13(1):84–8. DOI: 10.1038/nm1517. PMID: 17159987.
- Atefi M., Avramis E., Lassen A. et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3446–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2797. PMID: 24812408.
- Butte M.J., Keir M.E., Phamduy T.B. et al. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 co-stimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007;27(1):111–22. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.05.016. PMID: 17629517.
- Hugo W., Zaretsky J.M., Sun L. et al. Genomic and transcriptomic features of response to Anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell* 2016;165(1):35–44. DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.065. PMID: 26997480.
- Dempke W.C.M., Fenchel K., Uciechowski P., Dale S.P. Second- and third-generation drugs for immuno-oncology treatment – the more the better? *Eur J Cancer* 2017;74:55–72. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.01.001. PMID: 28335888.
- Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015;161(7):1681–96. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.044. PMID: 26091043.
- Mandalà M., De Logu F., Merelli B. et al. Immunomodulating property of MAPK inhibitors: from translational knowledge to clinical implementation. *Lab Invest* 2017;97(2):166–75. DOI: 10.1038/labinvest.2016.132. PMID: 27991907.
- Frederick D.T., Piris A., Cogdill A.P. et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1225–31. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1630. PMID: 23307859.

29. Wilmott J.S., Long G.V., Howle J.R. et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18(5):1386–94. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2479. PMID: 22156613.
30. Ebert P.J., Cheung J., Yang Y. et al. MAP kinase inhibition promotes T cell and anti-tumor activity in combination with PD-L1 checkpoint blockade. *Immunity* 2016;44(3):609–21. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.01.024. PMID: 26944201.
31. Ribas A., Hodi F.S., Callahan M. et al. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N Engl J Med* 2013;368(14):1365–6. DOI: 10.1056/NEJMc1302338. PMID: 23550685.
32. Xue G., Romano E., Massi D., Mandalà M. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in melanoma: Preclinical rationale and novel therapeutic insights. *Cancer Treat Rev* 2016;49:1–12. DOI: 10.1016/j.ctrv.2016.06.009. PMID: 27395773.
33. Larue L., Delmas V. The WNT/ $\beta$ -catenin pathway in melanoma. *Front Biosci* 2006;11:733–42. PMID: 16146765.
34. Spranger S., Bao R., Gajewski T.F. Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature* 2015;523(7559):231–5. DOI: 10.1038/nature14404. PMID: 25970248.
35. Ramos R.N., Piaggio E., Romano E. Mechanisms of resistance to immune checkpoint antibodies. *Handb Exp Pharmacol* 2017. DOI: 10.1007/164\_2017\_11. PMID: 28315073.
36. Da Forno P.D., Pringle J.H., Hutchinson P. et al. WNT5A expression increases during melanoma progression and correlates with outcome. *Clin Cancer Res* 2008;14(18):5825–32. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5104. PMID: 18794093.
37. Holtzhausen A., Zhao F., Evans K.S. et al. Melanoma-derived Wnt5a promotes local dendritic-cell expression of IDO and immunotolerance: opportunities for pharmacologic enhancement of immunotherapy. *Cancer Immunol Res* 2015;3(9):1082–95. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0167. PMID: 26041736.
38. Vredeveld L.C., Possik P.A., Smit M.A. et al. Abrogation of BRAFV600E-induced senescence by PI3K pathway activation contributes to melanomagenesis. *Genes Dev* 2012;26(10):1055–69. DOI: 10.1101/gad.187252.112. PMID: 22549727.
39. Peng W., Chen J.Q., Liu C. et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov* 2016;6(2):202–16. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0283. PMID: 26645196.
40. De Henau O., Rausch M., Winkler D. et al. Overcoming resistance to checkpoint blockade therapy by targeting PI3K $\gamma$  in myeloid cells. *Nature* 2016;539(7629):443–7. DOI: 10.1038/nature20554. PMID: 27828943.
41. Lyons J.M. 3<sup>rd</sup>, Schwimer J.E., Anthony C.T. et al. The role of VEGF pathways in human physiologic and pathologic angiogenesis. *J Surg Res* 2010;159(1):517–27. DOI: 10.1016/j.jss.2008.12.014. PMID: 19577260.
42. Bouzin C., Brouet A., De Vriese J. et al. Effects of vascular endothelial growth factor on the lymphocyte-endothelium interactions: identification of caveolin-1 and nitric oxide as control points of endothelial cell anergy. *J Immunol* 2007;178(3):1505–11. PMID: 17237399.
43. Shetty S., Weston C.J., Oo Y.H. et al. Common lymphatic endothelial and vascular endothelial receptor-1 mediates the transmigration of regulatory T cells across human hepatic sinusoidal endothelium. *J Immunol* 2011;186(7):4147–55. DOI: 10.4049/jimmunol.1002961. PMID: 21368224.
44. Klose R., Krzywinska E., Castells M. et al. Targeting VEGF-A in myeloid cells enhances natural killer cell responses to chemotherapy and ameliorates cachexia. *Nat Commun* 2016;7:12528. DOI: 10.1038/ncomms12528. PMID: 27538380.
45. Parry R.V., Chemnitz J.M., Frauwirth K.A. et al. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol Cell Biol* 2005;25(21):9543–53. DOI: 10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005. PMID: 16227604.
46. Takaya S., Saito H., Ikeguchi M. Upregulation of immune checkpoint molecules, PD-1 and LAG-3, on CD4+ and CD8+ T cells after gastric cancer surgery. *Yonago Acta Med* 2015;58(1):39–44. PMID: 26190896.
47. Goldberg M.V., Drake C.G. LAG-3 in cancer immunotherapy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;344:269–78. DOI: 10.1007/82\_2010\_114. PMID: 21086108.
48. Kyi C., Postow M.A. Immune checkpoint inhibitor combinations in solid tumors: opportunities and challenges. *Immunotherapy* 2016;8(7):821–37. DOI: 10.2217/imt-2016-0002. PMID: 27349981.
49. Yu M., Lu B., Liu Y. et al. Tim-3 is up-regulated in human colorectal carcinoma and associated with tumor progression. *Mol Med Rep* 2017;15(2):689–95. DOI: 10.3892/mmr.2016.6065. PMID: 28035413.
50. Koyama S., Akbay E.A., Li Y.Y. et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016;7:10501. DOI: 10.1038/ncomms10501. PMID: 26883990.
51. Bevelacqua V., Bevelacqua Y., Candiello S. et al. Nectin like-5 overexpression correlates with the malignant phenotype in cutaneous melanoma. *Oncotarget* 2012;3(8):882–92. DOI: 10.18632/oncotarget.594. PMID: 22929570.
52. Inozume T., Yaguchi T., Furuta J. et al. Melanoma cells control antimelanoma CTL responses via interaction between TIGIT and CD155 in the effector phase. *J Invest Dermatol* 2016;136(1):255–63. DOI: 10.1038/JID.2015.404. PMID: 26763445.
53. Kurtulus S., Sakuishi K., Ngiow S.F. et al. TIGIT predominantly regulates the immune response via regulatory T cells. *J Clin Invest* 2015;125(11):4053–62. DOI: 10.1172/JCI81187. PMID: 26413872.
54. Melero I., Hirschhorn-Cymerman D., Morales-Kastresana A. et al. Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells. *Clin Cancer Res* 2013;19(5):1044–53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2065. PMID: 23460535.
55. Hellmann M.D., Friedman C.F., Wolchok J.D. Combinatorial cancer immunotherapies. *Adv Immunol* 2016;130:251–77. DOI: 10.1016/bs.ai.2015.12.005. PMID: 26923003.
56. Mahmood T., Yang P.C. OX40L-OX40 interactions: a possible target for gastrointestinal autoimmune diseases. *N Am J Med Sci* 2012;4(11):533–6. DOI: 10.4103/1947-2714.103311. PMID: 23181223.
57. Gough M.J., Crittenden M.R., Sarff M. et al. Adjuvant therapy with agonistic antibodies to CD134(OX40) increases local control after surgical or radiation therapy of cancer in mice. *J Immunother* 2010;33(8):798–809. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181ee7095. PMID: 20842057.
58. Ruby C.E., Yates M.A., Hirschhorn-Cymerman D. et al. Cutting edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right. *J Immunol* 2009;183(8):4853–7. DOI: 10.4049/jimmunol.0901112. PMID: 19786544.
59. Linch S.N., McNamara M.J., Redmond W.L. OX40 agonists and

- combination immunotherapy: putting the pedal to the metal. *Front Oncol* 2015;5:34. DOI: 10.3389/fonc.2015.00034. PMID: 25763356.
60. Ramakrishna V., Sundarapandian K., Zhao B. et al. Characterization of the human T cell response to *in vitro* CD27 costimulation with varlilumab. *J Immunother Cancer* 2015;3:37. DOI: 10.1186/s40425-015-0080-2. PMID: 26500773.
  61. Moon Y.W., Hajjar J., Hwu P., Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J Immunother Cancer* 2015;3:51. DOI: 10.1186/s40425-015-0094-9. PMID: 26674411.
  62. Zhai L., Spranger S., Binder D.C. et al. Molecular pathways: targeting IDO1 and other tryptophan dioxygenases for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2015;21(24):5427–33. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0420. PMID: 26519060.
  63. Metz R., Rust S., Duhadaway J.B. et al. IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology* 2012;1(9):1460–8. DOI: 10.4161/onci.21716. PMID: 23264892.
  64. Weinlich G., Murr C., Richardsen L. et al. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology* 2007;214(1):8–14. DOI: 10.1159/000096906. PMID: 17191041.
  65. O'Shea J.J., Plenge R. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immune-mediated disease. *Immunity* 2012;36(4):542–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.03.014. PMID: 22520847.
  66. Levy D.E., Darnell J.E. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(9):651–62. DOI: 10.1038/nrm909. PMID: 12209125.
  67. Zaretsky J.M., Garcia-Diaz A., Shin D.S. et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2016;375(9):819–29. DOI: 10.1056/NEJMoa1604958. PMID: 27433843.
  68. Sucker A., Zhao F., Real B. et al. Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression. *Clin Cancer Res* 2014;20(24):6593–604. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0567. PMID: 25294904.
  69. Dovedi S.J., Adlard A.L., Lipowska-Bhalla G. et al. Acquired resistance to fractionated radiotherapy can be overcome by concurrent PD-L1 blockade. *Cancer Res* 2014;74(19):5458–68. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1258. PMID: 25274032.
  70. Wang X., Schoenhals J.E., Li A. et al. Suppression of type I IFN signaling in tumors mediates resistance to anti-PD-1 treatment that can be overcome by radiotherapy. *Cancer Res* 2017;77(4):839–50. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3142. PMID: 27821490.
  71. Marchini A., Scott E.M., Rommelaere J. Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade. *Viruses* 2016;8(1):9. DOI: 10.3390/v8010009. PMID: 26751469.

## СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛУЧЕВОЙ ТЕРАПИИ ПРИ РАКЕ ШЕЙКИ МАТКИ

В.С. Кряжева, М.А. Чекалова, В.В. Кузнецов

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

Контакты: Варвара Сергеевна Кряжева [salvaje2005@yandex.ru](mailto:salvaje2005@yandex.ru)

Распространенность рака шейки матки (РШМ) за последние годы значительно возросла. Основной причиной смерти больных РШМ IIБ–IV стадий являются рецидивы и метастазы опухоли, чаще всего с поражением тазовых и поясничных лимфатических узлов. Ультразвуковая диагностика занимает одно из ведущих мест в современной онкогинекологии благодаря таким достоинствам, как неинвазивность, безвредность метода, возможность многократных исследований, доступность и относительно невысокая цена. В настоящее время в ультразвуковой диагностике появляется все больше новых, дополнительных методик, направленных на повышение качества и информативности изображения. Одной из таких методик является эластография, позволяющая оценить эластичность тканей путем оценки жесткости образования в режиме реального времени неинвазивным способом. Несмотря на то, что отдельные исследования указывают на достижения современных технологий, отсутствуют сведения, при каких ситуациях применение их наиболее информативно или, наоборот, нецелесообразно из-за имеющихся пределов метода. Иными словами, существует потребность формирования алгоритма использования ультразвуковых методик для достижения оптимального результата при оценке эффективности проводимой терапии РШМ.

**Ключевые слова:** ультразвуковая диагностика, эластография, рак шейки матки, лучевая терапия, лучевая диагностика

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-47-52

### MODERN METHODS OF ASSESSING THE EFFECTIVENESS OF RADIATION THERAPY IN CERVICAL CANCER

V.S. Kryazheva, M.A. Chekalova, V.V. Kuznetsov

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

Cervical cancer (CC) in recent years has increased significantly. The main cause of death in patients with CC IIБ–IV stages are the recurrence and metastasis of tumors, often with involvement of pelvic and lumbar lymph nodes. Ultrasound diagnosis is one of the leading places in modern oncology, because of such advantages as non-invasive, harmless method, the possibility of multiple studies, the availability and relatively low price of the study. Currently, ultrasound appears more new, additional methods aimed at improving the quality and information content of the image. One of such methods is elastography, to assess the elasticity of tissue by assessing the hardness of the formation in real time non-invasive manner. Despite the fact that separate research points to advances in modern technology, there is no information under what situations their use is most informative, or impractical, due to existing limits of the method. In other words, there is a need for the formation of algorithm of using ultrasonic techniques to achieve optimum results when assessing the effectiveness of treatment of CC.

**Key words:** ultrasound diagnostic, elastography, cervical cancer, radiation therapy, monitoring

#### Введение

Распространенность рака шейки матки (РШМ) за последние годы значительно возросла, данное заболевание является основной причиной смерти от онкогинекологической патологии в мире. РШМ занимает 2-е ранговое место в структуре онкогинекологической патологии и 5-е ранговое место в структуре всех опухолей у женщин [1]. Ежегодно в мире регистрируют 528 тыс. больных РШМ и 266 тыс. умерших от этого заболевания. В возрастной группе

15–39 лет среди всех злокачественных новообразований у женщин доля злокачественных опухолей шейки матки максимальна и составляет 22,3 %, в возрастной группе 40–54 года данный показатель снижается до 10 % и занимает 2-е место после рака молочной железы. Настораживает прирост заболеваемости РШМ в России с 12,4 на 100 тыс. женского населения в 1989 г. до 15,1 на 100 тыс. в 2015 г. (8,26 %) [2]. За 10-летний период (2005–2015 гг.) наблюдаются рост показателя активного выявления

РШМ на 28,3 % (показатель 2015 г. составил 37,4 %), выявления в I–II стадиях на 7,6 % (63,9 %), а также снижение показателя выявления пациенток с РШМ III стадии на 12,4 % (25,2 %), IV стадии на 8,7 % (9,4 %) [3].

Общий стандартизованный показатель смертности от РШМ с 1989 по 2014 г. существенно не изменился. Величина показателя колебалась в пределах 5,1–5,2. При этом «грубый» показатель смертности от РШМ в возрастной группе 15–29 лет с 1994 г. вырос с 0,4 до 0,9 на 100 тыс. женского населения; 30–44 года – с 4,7 до 8,0; 45–59 лет – с 10,8 до 12,9. Максимальный уровень смертности от РШМ (стандартизованный показатель) наблюдался в 2015 г. в Республике Бурятия (12,5), Магаданской области (11,9), республиках Тыва (9,4), Алтай (9,0), Забайкальском крае [4, 5]. На конец 2015 г. под динамическим наблюдением в онкологических учреждениях России находились 174 822 больных РШМ, из них 65,3 % – 5 лет и более [3].

Основной причиной смерти пациенток РШМ ПВ–IV стадий являются рецидивы и метастазы опухоли, чаще всего с поражением тазовых и поясничных лимфатических узлов. В крупном метаанализе Т.Н. Kim и соавт. (2017), включающем 1322 пациентки, показано, что наиболее часто встречались регионарные рецидивы и отдаленные метастазы (59,5 %), затем следовали локорегионарные рецидивы (21,5 %) и параметральные рецидивы (10,7 %), при этом 5-летняя выживаемость в группе с отдаленными метастазами и рецидивами была наиболее низкой по сравнению с другими группами и составила 12,6 % [6]. L. Elit и соавт. (2003) в своем обзоре приводят данные о том, что общая 5-летняя выживаемость пациенток с локальным рецидивом после хирургического лечения составляет 42 %, а с локорегионарными и регионарными рецидивами – 10 % [7].

Возникновение рецидивов РШМ обусловлено, как правило, несколькими факторами: стадией заболевания, степенью распространенности опухолевого процесса, глубиной инвазии в подлежащие ткани, морфологическим вариантом опухоли, возрастом и общим состоянием пациентки [4].

По данным Р. Zola и соавт. (2012), самым мощным предиктором выживаемости пациенток, которым проведено лечение по поводу местно-распространенного РШМ, является стадия заболевания. При отсутствии распространения опухолевого процесса за пределы малого таза и при выполнении хирургического стадирования показатели 4-летней безрецидивной и общей выживаемости при проведении химиолучевой терапии (ХЛТ) цисплатином 1 раз в неделю составляют при II стадии РШМ 64,2 и 68,1 %, а при III стадии – 51,4 и 55,4 % соответственно. Показатели выживаемости намного меньше у пациен-

ток с РШМ III стадии, если для оценки поражения парааортальных лимфатических узлов применяются методы томографии, а не операция. В таких наблюдениях безрецидивная и общая выживаемость равняются 37,7 и 42,7 % соответственно [8]. Результаты многофакторного анализа свидетельствуют о том, что возраст, общее состояние пациенток, состояние парааортальных и тазовых лимфатических узлов, размер опухоли значительно коррелируют со временем начала прогрессирования заболевания. При моделировании выживаемости кроме этих факторов ведущее значение имеют клиническая стадия и двухстороннее поражение параметральной клетчатки [8].

По данным К.И. Жордания и соавт. (2009), при инвазии опухоли шейки матки менее 1 мм метастазы и рецидивы не возникают, при глубине инвазии опухоли до 3 мм метастазы обнаруживаются у 0,3 % больных, а при инвазии от 3 до 5 мм – у 13 % пациенток. При этом частота рецидивов у больных РШМ при стадии IA2 составляет 11,1 % [9].

Е.А. Гуськовой и соавт. (2015) проведен ретроспективный анализ, включающий 1048 пациенток с РШМ I–IV стадий, рецидив заболевания выявлен в 236 случаях, при этом в половине наблюдений (62,3 %) рецидивы диагностированы в течение первых 1,5 лет. Частота возникновения рецидивов при I стадии составила 8,3 %, при II – 21,3 %, при III – 29,1 %, при IV – 43,5 % [10].

#### Варианты лечения инвазивного рака шейки матки

Не менее важным фактором, определяющим безрецидивную выживаемость, является проведенное лечение РШМ. Традиционными методами лечения инвазивного РШМ являются хирургическое, лучевая терапия (ЛТ), химиотерапия (ХТ) и сочетание этих методов.

Сочетанная ЛТ (СЛТ) применяется для лечения пациенток с РШМ всех стадий, но прямые показания существуют при ПВ и III стадиях болезни [11–15].

Как самостоятельный метод радикального лечения РШМ СЛТ применяют в 67 % наблюдений. Основным принципом реализации СЛТ является сочетание дистанционного облучения тазовых лимфатических узлов и первичного очага опухоли и внутриволостного лучевого воздействия, направленного непосредственно на первичный опухолевый очаг [14, 16].

Эффективность ЛТ пациенток с РШМ связана с уровнем суммарной очаговой дозы на область первичного опухолевого очага. По мере увеличения уровня поглощенных доз происходит повышение показателей выживаемости больных. Однако по достижении доз свыше 90 Гр дальнейшее увеличение их уровня уже не сопровождается улучшением выживаемости [17, 18].

По данным Ю.М. Крейниной и соавт. (2011), при применении СЛТ в режиме двухэтапного облучения

и цикловой неоадьювантной ХТ (НАХТ) с использованием препаратов платины (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин), таксанов (паклитаксел, доцетаксел), гемцитабина, циклофосфана, блеомицина в стандартных терапевтических дозах у женщин с верифицированным РШМ ПА–ПВ стадий 5-летняя общая выживаемость достигает  $69,6 \pm 9,8 \%$ , безрецидивная выживаемость в целом составляет  $64,9 \pm 8,3 \%$ , что на 15–20 % превышает результаты радикальной СЛТ [19].

Применение конкурентной ХЛТ на основе цисплатина позволило улучшить отдаленные результаты лечения пациенток с местно-распространенным РШМ: увеличение общей выживаемости на 6 %, снижение частоты рецидивов на 8 % [20].

Рецидивы после радикальной СЛТ чаще проявляются в виде параметральных инфильтратов или метастазов в лимфатических узлах таза. Сроки появления рецидивов и метастазов и их частота существенно не зависят от возраста пациенток. Показатели возникновения рецидивов в различных возрастных группах (до 29 лет, от 30 до 44 лет, от 45 до 59 лет и старше 60 лет) были практически одинаковыми. Решающее значение в развитии рецидивов и метастазов имели стадия заболевания и морфологическое строение опухоли [21].

По данным М. Morris и соавт. (1999), у пациенток с РШМ IB–IV стадий безрецидивная 5-летняя выживаемость составила от 40 до 67 % в зависимости от стадии. В группах ЛТ и ХЛТ 5-летняя общая выживаемость составила соответственно 58 и 73 %. Частота развития отдаленных метастазов в группе ХЛТ была значительно меньше – 13 % по сравнению с 33 % в группе ЛТ, что привело к снижению риска смерти пациенток с РШМ на 48 % по сравнению с ЛТ [22].

В исследовании Л.А. Коломиец и соавт. (2013) показано, что использование НАХТ у пациенток с местно-распространенным РШМ достоверно снижает уровень рецидивов и метастазов в первые 2 года после проведенного лечения, достоверно увеличивает показатели 3-летней безрецидивной и общей выживаемости при удовлетворительном качестве жизни пациенток [23].

Ведение пациенток с рецидивами болезни после первичного лечения должно быть основано на соматическом статусе пациента, локализации рецидива или метастазов и предшествующей терапии. При рецидивах РШМ после первичного хирургического лечения могут применяться различные хирургические вмешательства – от удаления рецидивной опухоли до тазовой экзисцерации. Радикальное облучение также является эффективным способом терапии локального рецидива после первичного хирургического лечения [24].

При метастатическом характере прогрессирования заболевания проводится ХТ или ХЛТ. После радикальной ЛТ в случае возникновения рецидива возможно выполнение расширенной экстирпации матки с придатками или тазовой экзисцерации. Выбор лечебной тактики зависит от таких факторов, как локализация рецидива, вовлечение в опухолевый процесс мочевого пузыря или прямой кишки и степень распространения опухоли в малом тазу [25].

#### **Возможности методов визуализации при мониторинге эффективности лечения рака шейки матки**

В настоящее время существуют различные методы визуальной диагностики РШМ и рецидивов опухоли. Для оценки эффективности терапии в специализированных учреждениях проводятся комплексная ультразвуковая диагностика, включающая современные методики, магнитно-резонансная томография (МРТ), компьютерная томография (КТ) с внутривенным контрастированием, определение уровня онкомаркера SCC в сыворотке крови [25].

Ультразвуковая диагностика занимает одно из ведущих мест в современной онкогинекологии благодаря таким достоинствам, как неинвазивность, безвредность метода, возможность многократных исследований, доступность и относительно невысокая цена.

В работах Л.А. Ашрафяна и соавт. (2012), О.В. Астафьевой и Т.Е. Горбушиной (2015), посвященных оценке эффективности ХЛТ и НАХТ по поводу местно-распространенного РШМ II или III стадии, при ультразвуковом мониторинге отмечались достоверно значимое уменьшение объемов шейки матки, изменение структуры и повышение эхогенности опухоли в процессе лечения у всех пациенток. Исследование внутриопухолевого кровотока при динамическом наблюдении оказалось высокоэффективным. В процессе эхографического мониторинга в режимах цветного и энергетического доплеровского картирования отмечалось уменьшение количества цветовых локусов на единицу площади ( $\text{см}^2$ ) или объема ( $\text{см}^3$ ) в зоне ранее определяемой опухолевой трансформации у пациенток со всеми формами заболевания [26, 27].

По данным исследования Л.А. Ашрафяна и соавт. (2015), результаты комплексного ультразвукового обследования 199 больных местно-распространенным РШМ, получающих НАХТ, показали уменьшение объема первичной опухоли более чем на 50 % после 2 курсов НАХТ, что свидетельствует о достаточно высокой эффективности этого метода терапии. Полный регресс опухоли, так же как и прогрессирование заболевания, после 2 курсов НАХТ не зафиксирован ни в одном наблюдении. У всех пациенток

оценен характер кровотока в динамике по данным цветного и энергетического доплеровского картирования. Внутриопухолевый кровоток визуализировался в 100 % случаев и характеризовался наличием большого количества хаотично расположенных цветовых локусов с различной степенью интенсивности окраски, как в центре, так и по периферии опухоли (синдром «пылающего костра»). Вместе с тем одними из достоверных критериев эффективности НАХТ, установленной при спектральной доплерометрии, являются снижение максимальной систолической скорости в маточных артериях и повышение индекса резистентности в восходящей ветви маточной артерии и опухолевых сосудах [28].

В. Lemieszczuk и соавт. (1993) показали, что высокая информативность отмечена при ультразвуковой диагностике рецидивов РШМ. По их данным, точность ультразвукового метода составила 77 %, чувствительность — 100 %, специфичность — 62 % при частоте ложноположительных результатов 23 % [29].

В настоящее время в ультразвуковой диагностике появляется все больше новых, дополнительных методик, направленных на повышение качества и информативности изображения. Одной из таких методик является эластография, позволяющая оценить эластичность тканей путем оценки жесткости образования в режиме реального времени неинвазивным способом.

Как показывают исследования отечественных авторов (С.О. Чуркиной (2011), В.Е. Гажоновой и соавт. (2014) и др.), включение эластографии в диагностику злокачественных опухолей матки достоверно повышает чувствительность метода с 74 до 92 %, специфичность — с 94 до 98 %, точность — с 89 до 96 %, прогностичность положительного результата — с 83 до 95 %, прогностичность отрицательного — с 90 до 96 % [30, 31].

В исследовании О.А. Вакау и Т.С. Golovko (2015), включавшем 87 пациенток с патологией шейки матки (11 — цервицит, 14 — дисплазия различной степени, 62 — РШМ), чувствительность эластографии при обнаружении инвазии опухоли в параметральную клетчатку составила 91,4 %, специфичность — 96,2 %, точность — 93,5 %, при инвазии в стенки влагалища показатели были равны 83,3; 88,4 и 85,4 % соответственно, а при переходе опухоли на тело матки — 85,3; 95,2 и 88,7 % соответственно [32].

В зарубежных источниках также приводятся данные о высокой информативности эластографии и эластометрии.

В исследовании R. Lu et al. (2014) о возможностях эластометрии в дифференциальной диагностике злокачественных новообразований шейки матки показано, что коэффициент жесткости (SR) варьировал в пределах 4,85–8,91; чувствительность, специфичность и информативность составили 90,9; 90,0 и 90,5 % соответственно [33].

По данным японских исследователей S. Mabuchi и соавт. (2015), SR в опухолевой ткани был значительно выше, чем в нормальной, и в среднем составлял 3,4. При этом после проведения ЛТ он снижался до уровня нормальной ткани (около 1,0). Также авторы отмечали, что при остаточной опухоли данный коэффициент не изменялся [34].

Y. Xu и соавт. (2017) оценивали динамику SR у 47 больных РШМ при первичном обращении, в процессе ХЛТ и сразу после лечения. По результатам исследования достоверно показано, что в опухоли шейки матки до начала лечения SR составляет 3,92–4,14, а при полном ответе на проведенное лечение SR в шейке матки составляет 0,96–1,1, что соответствует неизменной ткани шейки матки [35].

В настоящее время применение МРТ и КТ с целью оценки эффективности ЛТ РШМ приобретает все большее значение. Во многих работах как отечественных, так и зарубежных авторов приводится сравнение ультразвукового метода с МРТ и КТ. По результатам крупного европейского мультицентрового исследования E. Epstein и соавт. (2013), чувствительность трансвагинального ультразвукового исследования (ТВУЗИ) в определении границ опухоли шейки матки была выше, чем МРТ [36].

F. Moloney и соавт. (2016) сравнивали МРТ и ТВУЗИ, и ТВУЗИ показало более высокую чувствительность (86 %) в обнаружении параметральной инфильтрации, чем МРТ (40 %) [37].

Вместе с тем Н.А. Рубцова и соавт. (2013) отмечают, что при локальных рецидивах РШМ чувствительность и точность ТВУЗИ и МРТ равнозначны и составляют 99 и 96 % соответственно, при этом ложноотрицательный результат установлен только у 1 пациентки. Ложноположительные результаты при ТВУЗИ и МРТ встречались с одинаковой частотой — у 2 пациенток, что было обусловлено инфильтративно-воспалительными изменениями, ошибочно расцененными как опухолевый инфильтрат. Что касается локорегионарных рецидивов в параметральной клетчатке, по ходу подвздошных сосудов с переходом на стенку таза и регионарных рецидивов РШМ, ультразвуковое исследование уступало МРТ. Специфичность и точность ультразвукового метода составили 71 и 95 % соответственно [38].

В работах Л.К. Дигаи и Н.А. Шаназарова (2010), а также Н.Г. Трухачевой и соавт. (2015) сравнение МРТ и ультразвукового исследования в качестве индикатора оценки эффективности ЛТ показало, что МРТ более точно отображает размеры опухоли и, соответственно, динамику заболевания. Наиболее информативным является исследование, проведенное через 2 мес и более после окончания лечения, максимальное уменьшение размеров новообразования было зафиксировано через 3 мес после лечения. Реакция

лимфатических узлов после ХЛТ была наиболее выраженной в сроки от 3 до 6 мес, при этом максимальные изменения были зафиксированы в группах наружных подвздошных и параректальных/парацервикальных лимфатических узлов [39, 40].

В исследовании Н.В. Кривоносовой и соавт. (2010) проводилась оценка качества лечения по данным МРТ и клинического обследования у 76 пациенток, страдающих РШМ II–IV стадий. При полной регрессии опухоли отмечалось восстановление нормальной анатомической структуры шейки матки и проксимального участка влагалища, что определялось на основании восстановления однородного сигнала низкой интенсивности от стромы, визуализации ровной слизистой оболочки, часто на фоне картины уменьшения шейки матки в размерах. При частичной ремиссии отмечались уменьшение размеров и появление более четких контуров опухоли. В процессе динамического наблюдения прогрессирование заболевания — увеличение размеров на 25 % и более или появление новых поражений — отмечено у 2 (6 %) больных. Рецидивы заболевания были выявлены у 3 (9 %) пациенток [41].

Л.С. Мкртчян и соавт. (2011) оценили роль МРТ и других методов исследования у 82 пациенток с диагнозом РШМ после ЛТ и ХЛТ: рецидив опухоли в малом тазу был зарегистрирован в 25 наблюдениях, при этом в 2 случаях рецидивная опухоль выявлена при физикальном осмотре, в 1 — при ультразвуковом исследовании и в 22 — с помощью МРТ. Авторы приводят данные о том, что чувствительность МРТ без применения контрастных препаратов в диагностике рецидивов РШМ равна 90–91 %, при этом специфичность метода относительно невысока и составляет 22–38 %, однако при введении контрастного препарата специфичность повышается до 67 % [42].

КТ эффективна в выявлении рецидивов РШМ благодаря таким преимуществам, как отсутствие дефекации артефакта движения и меньшее количество противопоказаний, чем для МРТ [43]. Тем не менее с помощью КТ порой бывает трудно отличить рецидив опухоли от постлучевого фиброза [44].

### Заключение

Таким образом, имеющиеся в настоящее время в отечественной и зарубежной специальной литературе данные свидетельствуют о возможностях использования ультразвукового исследования параллельно с другими методами визуализации для оценки эффективности лечения РШМ. Однако не разработаны семиотические критерии, применимые в широкой врачебной практике. Нет понимания, на какие ультразвуковые признаки следует обращать внимание в первую очередь при проведении мониторинга эффективности лечения РШМ. Несмотря на то, что отдельные исследования указывают на достижения современных технологий, отсутствуют сведения о том, при каких ситуациях применение их наиболее информативно или, наоборот, нецелесообразно из-за имеющихся пределов метода. Иными словами, существует потребность в формировании алгоритма использования ультразвуковых методик для достижения оптимального результата при оценке эффективности проводимой терапии РШМ.

Знание четких ультразвуковых признаков, определяющих эффективность лечения, прогрессирование и рецидивы РШМ, крайне важно для своевременной диагностики, выбора метода лечения и его коррекции. Широкая доступность и экономичность ультразвукового исследования способствуют успешному внедрению данного метода диагностики в повседневную практику врача.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. М.: Медицинское информационное агентство, 2012. С. 143.
2. Состояние онкологической помощи населению России в 2016 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2017. С. 236.
3. Петрова Г.В. Рак шейки матки. Динамика основных статистических показателей. В сб.: I Национальный конгресс «Онкология репродуктивных органов: от профилактики и раннего выявления к эффективному лечению». М., 2016. С. 134.
4. Клиническая онкогинекология. Под ред. В.П. Козаченко. М.: Бином, 2016. С. 18–21.
5. Прилепская В.Н. Профилактика рака шейки матки: методы ранней диагностики и новые скрининговые технологии. Гинекология 2007;9(1):1–45.
6. Kim T.H., Kim M.H., Kim B.J. et al. Prognostic importance of the site of recurrence in patients with metastatic recurrent cervical cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2017;98(5):1124–31. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2017.03.029. PMID: 28721896.
7. Elit L., Fyles A.W., Devries M.C. et al. Follow-up for women after treatment for cervical cancer: a systematic review. Gynecol Oncol 2009;114(3):528–35. DOI: 10.1016/j.ygyno.2009.06.001. PMID: 19560188.
8. Zola P., Tripodi E., Zanfagnin V. et al. Лечение раннего рака шейки матки: выживаемость, осложнения и экономические аспекты. Сибирский онкологический журнал 2012;(3):14–21.
9. Паяниди Ю.Г., Жордания К.И., Толокнов Б.О. и др. Онкология для практикующих врачей. М., 2009. С. 43.
10. Гуськова Е.А., Неродо Г.А., Гуськова Н.К. и др. Факторы, влияющие на частоту рецидивирования рака шейки матки. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований 2015;10(1):87–91.

11. Бохман Я.В. Руководство по онкогинекологии. СПб.: Фолиант, 2002. 542 с.
12. Избранные лекции по клинической онкологии. Под ред. акад. РАМН В.И. Чиссова, проф. С.Л. Дарьяловой. М., 2000. С. 30–131.
13. Кузнецов В.В., Козаченко В.П., Барин В.В. и др. Злокачественные новообразования женской репродуктивной системы. Энциклопедия клинической онкологии: Руководство для практических врачей. РЛС, 2005. С. 398–454.
14. Марьина Л.А., Чехонадский В.Н., Кравец О.А. Использование источников с высокой мощностью дозы для внутриполостного облучения онкогинекологических больных. В сб.: Радиология. Лучевая диагностика и лучевая терапия на пороге третьего тысячелетия. М., 2000. С. 384.
15. Титова В.А., Горбунова В.В., Харченко Н.В. Современные аспекты лучевой терапии гинекологического рака. В сб.: Радиология. Лучевая диагностика и лучевая терапия на пороге третьего тысячелетия. М., 2000. С. 570–571.
16. Костромина К.Н. Современное состояние и перспективы развития лучевой терапии гинекологического рака. Медицинская радиология и радиационная безопасность 2001;46(1):48–51.
17. Горбунова В.В. Оптимизация сочетанной лучевой терапии местнораспространенного рака шейки матки и рецидивов рака яичников с химиотерапией в терапевтическом режиме. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2002.
18. Кандакова Е.Ю. Сочетанная лучевая терапия местнораспространенного рака шейки матки у больных репродуктивного возраста в условиях индукционной полихимиотерапии. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2001. 28 с.
19. Крейнина Ю.М., Титова В.А., Скобелева Т.Ф. Современные принципы планирования и реализации лучевой терапии в консервативном лечении местно-распространенного рака шейки матки. Опухоли женской репродуктивной системы 2011;(1):106–12.
20. National Comprehensive Cancer Network. NCCN Guidelines Cervical Cancer. Version 2.2015. URL: <https://education.nccn.org/node/64364>.
21. Лучевая терапия рецидивов рака шейки матки: методические рекомендации НИИ им. Н.Н. Петрова. Л., 1978. 11 с.
22. Morris M., Eifel P.J., Lu J. et al. Pelvic radiation with concurrent chemotherapy compared with pelvic and para-aortic radiation for high-risk cervical cancer. N Engl J Med 1999;340(15):1137–43. DOI: 10.1056/NEJM199904153401501. PMID: 10202164.
23. Чуркусаева О.Н., Коломиец Л.А. Неoadъювантная химиотерапия при лечении местнораспространенного рака шейки матки. Сибирский онкологический журнал 2013;(2):21–3.
24. Чиссов В.И., Давыдов М.И. Онкология. Национальное руководство. М., 2014. 452 с.
25. Алешикова О.И. Лучевые и молекулярно-биологические критерии оценки эффективности неoadъювантной химиотерапии местнораспространенного рака шейки матки (IIb–IIb стадий). Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2007. С. 2–20.
26. Астафьева О.В., Горбушина Т.Е. Допплерометрия маточных и внутриопухолевых сосудов для клинической оценки эффективности химиолучевого лечения рака шейки матки. Радиология-практика 2015;(6):6–13.
27. Ашрафян Л.А., Антонова И.Б., Ивашина С.В. и др. Современные ультразвуковые методы в оценке эффективности неoadъювантной полихимиотерапии у больных раком шейки матки и раком яичников. Вестник РНЦРР МЗ РФ 2012;(12):1–14.
28. Ашрафян Л.А., Алешикова О.И., Бабаева И.Б. и др. Оценка результатов неoadъювантной химиотерапии местно-распространенного рака шейки матки IIb–IIb стадий при комплексной ультразвуковой диагностике. Опухоли женской репродуктивной системы 2015;11(2):76–81.
29. Lemieszczuk B., Bidzinski M., Zielinski J., Sikorowa L. Clinical value of transvaginal, sonographically guided fine needle aspiration biopsy of parametria in recurrent cervical carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol 1993;14 Suppl:68–76. PMID: 8200378.
30. Чуркина С.О. Возможности соноэластографии в гинекологии. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2011. 10 с.
31. Тажонова В.Е., Белозерова И.С., Воронцова Н.А. и др. Соноэластография в диагностике рака эндометрия. Акушерство и гинекология 2014;(1):54.
32. Bakay O.A., Golovko T.S. Use of elastography for cervical cancer diagnostics. Exp Oncol 2015;37(2):139–45. PMID: 26112943.
33. Lu R., Xiao Y., Liu M., Shi D. Ultrasound elastography in the differential diagnosis of benign and malignant cervical lesions. J Ultrasound Med 2014;33(4):667–71. DOI: 10.7863/ultra.33.4.667. PMID: 24658946.
34. Mabuchi S., Sasano T., Kuroda H. et al. Real-time tissue sonoelastography for early response monitoring in cervical cancer patients treated with definitive chemoradiotherapy: preliminary results. J Med Ultrason (2001) 2015;42(3):379–85. DOI: 10.1007/s10396-015-0616-6. PMID: 26576790.
35. Xu Y., Zhu L., Liu B. et al. Strain elastography imaging for early detection and prediction of tumor response to concurrent chemo-radiotherapy in locally advanced cervical cancer: feasibility study. BMC Cancer 2017;17(1):427. DOI: 10.1186/s12885-017-3411-5. PMID: 28629386.
36. Epstein E., Testa A., Gaurilcikas A. et al. Early-stage cervical cancer: tumor delineation by magnetic resonance imaging and ultrasound – a European multicenter trial. Gynecol Oncol 2013;128(3):449–53. DOI: 10.1016/j.ygyno.2012.09.025. PMID: 23022593.
37. Moloney F., Ryad D., Twomey M. et al. Comparison of MRI and high-resolution transvaginal sonography for the local staging of cervical cancer. J Clin Ultrasound 2016;44(2):78–84. DOI: 10.1002/jcu.22288. PMID: 26294324.
38. Рубцова Н.А., Сеницын В.Е., Новикова Е.Г. МРТ в диагностике рецидивных опухолей у больных раком эндометрия и шейки матки. Диагностическая интервенционная радиология 2013;(1):17–26.
39. Дигай Л.К., Шаназаров Н.А. Роль магнитно-резонансной томографии и ультразвуковой диагностики в оценке эффективности лечения рака шейки матки. Тюменский медицинский журнал 2010;(3-2):46–7.
40. Трухачева Н.Г., Фролова И.Г., Коломиец Л.А. и др. МРТ в оценке эффективности химиолучевого лечения местнораспространенного рака шейки матки. Сибирский онкологический журнал 2015;(5):84–91.
41. Кривоносова Н.В., Поморцев А.В., Астафьева О.В. и др. Магнитно-резонансная томография в диагностике и оценке результатов комбинированного и химиолучевого лечения рака шейки матки. Кубанский научный медицинский вестник 2010;(6):64–9.
42. Мкртчян Л.С., Прошин А.А., Крикунова Л.И. и др. Роль магнитно-резонансной томографии в диагностике рецидивов рака шейки матки. Опухоли женской репродуктивной системы 2011;(2):49–55.
43. Sugimura K., Okizuka H. Postsurgical pelvis: treatment follow-up. Radiol Clin North Am 2002;40(3):659–80. PMID: 12117198.
44. Heron C.W., Husband J.E., Williams M.P. et al. The value of CT in the diagnosis of recurrent carcinoma of the cervix. Clin Radiol 1988;39(5):496–501. PMID: 3053000.

# ДИССЕМИНИРОВАННЫЕ ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ У ПАЦИЕНТОВ С ЛЮМИНАЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.А. Рябчиков<sup>1</sup>, О.А. Безнос<sup>1</sup>, И.А. Дудина<sup>2</sup>, И.К. Воротников<sup>1</sup>, Д.А. Денчик<sup>1</sup>,  
С.В. Чулкова<sup>1</sup>, О.А. Талипов<sup>1</sup>, Н.Н. Тупицын<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);  
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

**Контакты:** Денис Анатольевич Рябчиков dr.denisr@mail.ru

**Введение.** Существуют многочисленные подтверждения того, что диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге пациентов с первичным раком молочной железы (РМЖ), в том числе и на ранних стадиях, являются предшественниками последующих отдаленных метастазов. Поэтому ДОК могут служить дополнительным маркером для оценки прогноза и понимания канцерогенеза, но существующие данные противоречивы.

**Цель исследования** — определить частоту выявления ДОК в костном мозге у пациентов с люминальным РМЖ, а также их связь с некоторыми клиническими и иммунофенотипическими параметрами.

**Материалы и методы.** Биоптаты костного мозга 65 пациентов с первичным люминальным РМЖ изучены на предмет наличия ДОК посредством акустического фокусирующего цитометра Attune. Впервые в России была повышена чувствительность метода обнаружения ДОК в костном мозге до уровня  $1 \times 10^{-7}$  миелокариоцитов.

**Результаты.** В костном мозге ДОК обнаружены у 40 % пациентов, вместе с тем полученный результат не коррелировал ни со стадией опухолевого процесса, ни со степенью злокачественности. Уровень CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов у пациентов с ДОК в костном мозге был достоверно ниже и составил 39,2 % против 48,1 % у пациентов, не имеющих ДОК ( $p = 0,011$ ). Содержание миелокариоцитов при ДОК-положительном статусе было в 1,6 раза ниже, чем при отсутствии ДОК ( $p = 0,007$ ). Другие параметры миелограммы не имели статистически значимых различий. Более того, не было обнаружено существенных корреляций между наличием ДОК в костном мозге и иммунофенотипом опухоли молочной железы (HLA-I:  $p = 0,74$ ; HLA-DR:  $p = 0,93$ ; CD71:  $p = 0,46$ ).

**Заключение.** Наличие ДОК в костном мозге в большей степени связано с показателями миелограммы и субпопуляцией лимфоцитов костного мозга, чем с клиническими характеристиками опухоли.

**Ключевые слова:** диссеминированные опухолевые клетки, костный мозг, люминальный рак молочной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57

## DISSEMINATED TUMOR CELLS OF LUMINAL BREAST CANCER PATIENTS

D.A. Ryabchikov<sup>1</sup>, O.A. Beznos<sup>1</sup>, I.A. Dudina<sup>2</sup>, I.K. Vorotnikov<sup>1</sup>, D.A. Denchik<sup>1</sup>, S.V. Chulkova<sup>1</sup>, O.A. Talipov<sup>1</sup>, N.N. Tupitsyn<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University);  
Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

**Introduction.** There is ample evidence that disseminated tumor cells (DTC), which are found in the bone marrow (BM) of patients with breast cancer (BC), including early stages, are progenitors of subsequent distant metastasis. Therefore, BM-DTC represent an additional tool for understanding carcinogenesis and estimating prognosis. Nevertheless, the existing data are controversial.

**The purpose of the study** — to determine the frequency of DTC detection in BM of patients with luminal BC and also its relationship with some clinical and immunophenotypic parameters.

**Materials and methods.** BM biopsies of 65 luminal BC patients were analyzed for the presence of DTC by Attune Acoustic Focusing Cytometer. For the first time in Russia, the sensitivity of the DTC detection method in the BM to the level of  $1 \times 10^{-7}$  myelocaryocytes was increased.

**Results.** In BM, DTC were detected in 40 % of patients, and this finding did not correlate with stage of BC and degree of malignancy. The level of CD8<sup>+</sup> lymphocytes in patients with DTC in the BM was significantly lower and amounted to 39,2 % versus 48,1 % in patients without DTC ( $p = 0,011$ ). The content of myelocaryocytes with DTC-positive status was 1,6 times lower than in the absence of DTC ( $p = 0,007$ ). Other parameters of the myelogram did not differ significantly. Moreover, no significant correlations were found between the presence of DTC in BM and the breast tumor immunophenotype (HLA-I:  $p = 0,74$ ; HLA-DR:  $p = 0,93$ ; CD71:  $p = 0,46$ ).

**Conclusion.** The presence of BM-DTC is more interrelated with myelogram and subpopulation of BM lymphocytes than with the clinical characteristics of tumor.

**Key words:** disseminated tumor cells, bone marrow, luminal breast cancer

### Введение

В последние десятилетия методики диагностики и лечения онкологических заболеваний, в том числе и рака молочной железы (РМЖ), значительно улучшились, но независимо от успешности терапии первичной опухоли  $\approx 25\%$  пациентов с локализованным РМЖ без участия лимфатических узлов в будущем столкнутся с системным рецидивом заболевания [1]. Следовательно, микрометастатическое гематогенное распространение, по-видимому, происходит без вовлечения региональных лимфатических узлов и вопрос о необходимости лимфаденэктомии в каждом конкретном случае должен рассматриваться индивидуально [2]. Доказано, что в организме существуют другие участки, где опухолевые клетки способны сохраняться долгое время. Специально для описания этого состояния при лейкозах был введен термин «минимальная остаточная (резидуальная) болезнь». Изначально при данном состоянии в организме у пациента остается небольшое количество лейкоэмических клеток костного мозга во время и после лечения, а также в период ремиссии. Позднее понятие минимальной остаточной болезни было расширено: сейчас оно также используется для описания состояния, при котором опухолевые клетки обнаруживаются после клинико-морфологической ремиссии при РМЖ [3].

Исследованиями подтверждено, что именно диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) находятся в костном мозге у пациентов с РМЖ и являются предшественниками последующих метастазов и перспективными маркерами [4, 5]. Мы считаем, что анализ ДОК, их микроокружения, особенностей первичной опухоли позволит лучше понять неизученное явление «опухолевого покоя», характеризующееся клинико-морфологической ремиссией между резекцией первичной опухоли и гематогенным метастатическим рецидивом РМЖ, который может произойти более чем через 10 лет [6, 7].

**Цель исследования** — определить частоту выявления ДОК в костном мозге у пациенток с люминальным РМЖ, а также связь этих клеток с некоторыми клиническими и иммунофенотипическими параметрами.

### Материалы и методы

Материалами исследования стали образцы костного мозга, которые были получены при пункции грудины (стеральной пункции) во время плановой операции, проведенной в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В отдельных случаях использованы одномоментные пункции грудины и гребня подвздошной кости. В исследование вошли 65 пациенток с диагнозом РМЖ люминального А или В типа, хирургическое вмешательство

которым было проведено не позднее 2015 г. Иммунологические исследования костного мозга, а также подсчет клеток миелограммы и их анализ проведены в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для определения иммунологических характеристик костного мозга и наличия в нем ДОК использовали как стандартные цитологические методы, так и иммунофлуоресцентный анализ с применением моноклональных антител к цитокератинам CAM 5.2 (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция).

В проведенном исследовании впервые в России мы применили метод проточной цитометрии, что позволило увеличить пороговое значение до  $1 \times 10^{-7}$  миелокариоцитов. С этой целью мы использовали высокоскоростной проточный цитометр Attune с революционной технологией акустической фокусировки клеток для многопараметрического анализа клеточной суспензии [8].

### Результаты

У 26 из 65 пациентов с люминальным РМЖ были обнаружены ДОК, в нашем исследовании частота выявления таких клеток в костном мозге составила 40 %. По данным мировой литературы, этот показатель варьирует от 13,2 до 42 % в зависимости от методов исследования и критериев включения пациентов [9].

S. Braun и соавт. (2005) провели крупный анализ 9 независимых исследований, целью которого было изучение прогностической значимости присутствия ДОК в костном мозге у пациентов с РМЖ [4]. Оказалось, что пациенты с ДОК-положительным статусом имели более крупные по размеру и в большинстве случаев рецептор-негативные опухоли, а также у них чаще выявлялись метастазы в лимфатических узлах ( $p < 0,001$  для всех переменных). По результатам этого анализа наличие ДОК в костном мозге было расценено как важный прогностический неблагоприятный фактор: показатели общей, безрецидивной и обусловленной заболеванием выживаемости были значительно ниже в исследуемой группе. Другой крупный метаанализ, проведенный I. Funke и соавт. (1998), также выявил прямую корреляцию ДОК-положительного статуса с безрецидивной выживаемостью [10].

В 2005 г. О.В. Крохиной и соавт. на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России было выявлено, что частота обнаружения ДОК в костном мозге у пациенток с РМЖ составляет 45,3 % [11]. Авторы установили взаимосвязь между наличием ДОК и рецепторным статусом опухоли: при отсутствии рецепторов эстрогенов и прогестерона ДОК были обнаружены у 84,6 % пациенток, при наличии рецепторов эстрогенов — у 28,6 %, при наличии рецепторов прогестерона — у 25 %. Статистически

достоверной связи между ДОК-положительным статусом и степенью злокачественности, степенью дифференцировки, размером опухолевого узла, маммографическими признаками распространенности опухоли, наличием лимфогенных метастазов установлено не было. А. Molino и соавт. (1997) не обнаружили связи между поражением костного мозга и такими прогностическими факторами, как размер опухоли, метастазы в лимфатические узлы и гормональный статус [12].

В проведенном нами исследовании не было установлено статистически значимой связи ДОК-положительного статуса опухоли с ее размером, стадией РМЖ и степенью злокачественности. Интересно отметить, что минимальная частота обнаружения ДОК наблюдалась при I степени злокачественности (25 %), а максимальная — при II степени злокачественности (43,1 %). Сравнение уровня экспрессии Ki-67 с частотой выявления ДОК в костном мозге не показало статистически значимой разницы: у пациентов с ДОК-положительным статусом средний уровень экспрессии Ki-67 составил  $38,8 \pm 5,2$  %, с ДОК-отрицательным —  $38,5 \pm 4,1$  % ( $p = 0,97$ ). Полученные данные указывают на то, что клинико-морфологические характеристики опухоли не являются определяющими для диссеминации опухолевых клеток в костный мозг, но при этом их наличие является важным независимым фактором.

Именно поэтому следующий этап работы был посвящен сравнению уровней Т- и В-лимфоцитов, NK-клеток и их субпопуляций в костном мозге у пациентов с люминальным РМЖ в зависимости от статуса ДОК. В результате оказалось, что единственной субпопуляцией костномозговых лимфоцитов, статистически значимо связанной с ДОК, были клетки CD8<sup>+</sup>. Их уровень у пациентов с ДОК в костном мозге был достоверно ниже и составил 39,2 % против 48,1 % у пациентов, не имеющих ДОК, при  $p = 0,011$  (табл. 1). Этим обусловлено достоверно более высокое значение иммунорегуляторного индекса у пациентов с ДОК-положительным статусом ( $p = 0,025$ ). Полученные данные могут иметь важное научное и клиническое значение.

В исследовании Е.В. Артамоновой (2003) продемонстрировано, что иммунофенотипические особенности клеток РМЖ взаимосвязаны с уровнями местных иммунных реакций (субпопуляциями интратуморальных лимфоцитов), клиническим течением и прогнозом заболевания [13]. В работе показано, что инфильтрация опухоли клетками иммунной системы происходит главным образом за счет Т-лимфоцитов (CD4 и CD8) и отрицательно коррелирует с размером опухоли, наличием регионарных метастазов и стадией заболевания. F. Pages и соавт. (2009) также доказали, что наличие CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов в первичных

опухолях молочной железы коррелирует с уменьшением метастатической инвазии и повышением общей выживаемости [14]. В нашем исследовании не выявлена корреляция между наличием ДОК и уровнями инфильтрации первичной опухоли плазмочитами, Т-, CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-клетками, общей лейкоцитарной инфильтрацией (CD45) и макрофагальной инфильтрацией (CD163).

Роль данных клеток в костном мозге была изучена позже: в нескольких исследованиях показано, что костномозговые CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>- и Т-клетки выполняют защитную роль, предотвращая появление метастатических очагов [15]. Это подтверждает гипотезу об иммунологической памяти и опухолевом покое в костном мозге, в то же время результаты наших изысканий наводят на мысль о том, что ДОК и CD8<sup>+</sup>-лимфоциты находятся в постоянном взаимодействии. Благодаря этому взаимодействию возможны как появление отдаленного метастазирования и прогрессирование заболевания (преобладание эффектов ДОК), так и полный контроль и ремиссия РМЖ (преобладание эффектов CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов).

Мы не обнаружили статистически значимой связи между другими субпопуляциями лимфоцитов в костном мозге или в первичной опухоли и наличием ДОК. Но в зарубежных и отечественных источниках встречается информация, указывающая на корреляцию между уровнями CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-, CD19<sup>+</sup>- и CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>-лимфоцитов и клиническими и молекулярно-генетическими характеристиками первичной опухоли [16–20]. Наши данные представлены в табл. 1.

В дальнейшем нами были изучены иммунофенотип опухоли и уровень ее инфильтрации различными клетками иммунной системы у пациентов с люминальным РМЖ при ДОК-положительном и ДОК-отрицательном статусах. На сегодняшний день совершенно точно известно, что потеря молекул HLA-I при опухолевой прогрессии — один из главных механизмов «ускользания» опухолевых клеток от иммунного ответа Т-киллеров [21]. В нашем исследовании мы оценили соотношение маркеров HLA-1, HLA-DR, CD71 при люминальном А и В, HER2-позитивном и трижды негативном типах РМЖ, а затем попытались установить их связь со статусом ДОК пациента с люминальным РМЖ (табл. 2). Однако ни по одному из анализируемых параметров статистически значимых различий не получено. При сравнении соотношений маркеров HLA-1, HLA-DR, CD71 со статусом ДОК пациентов с РМЖ люминальных А и В типов статистически значимых различий также не было найдено. Безусловно, эта тема требует более глубокого изучения, но на данном этапе предварительно можно сказать, что наличие ДОК не зависит от степени экспрессии HLA-DR, HLA-1, CD71.

**Таблица 1.** Средние уровни различных субпопуляций лимфоцитов в костном мозге в зависимости от статуса ДОК

| Показатель | Статус ДОК    | n  | Среднее | p     |
|------------|---------------|----|---------|-------|
| CD16CD56   | отрицательный | 16 | 8,7706  | >0,05 |
|            | положительный | 9  | 8,2367  |       |
| CD3        | отрицательный | 20 | 62,3125 | >0,05 |
|            | положительный | 13 | 60,1508 |       |
| CD4        | отрицательный | 21 | 38,4671 | >0,05 |
|            | положительный | 15 | 43,3020 |       |
| CD8        | отрицательный | 20 | 48,1825 | 0,011 |
|            | положительный | 16 | 39,2144 |       |
| CD4/CD8    | отрицательный | 19 | 0,8821  | 0,025 |
|            | положительный | 15 | 1,2040  |       |
| CD4CD25    | отрицательный | 20 | 3,1390  | >0,05 |
|            | положительный | 14 | 3,6636  |       |
| CD19       | отрицательный | 19 | 16,5932 | >0,05 |
|            | положительный | 13 | 18,2162 |       |
| CD19CD5    | отрицательный | 21 | 8,4867  | >0,05 |
|            | положительный | 12 | 7,4850  |       |

**Примечание.** Здесь и в табл. 2: n — число пациентов; p — вероятность ошибки; ДОК — диссеминированные опухолевые клетки.

На следующем этапе исследования было проведено сравнение миелограмм в зависимости от наличия ДОК в костном мозге и выявлено статистически значимое различие по уровню миелокариоцитов. У пациенток с ДОК-положительным статусом этот уровень был в 1,6 раза ниже и составил  $57,5 \pm 6,5$  тыс/мкл против  $94,9 \pm 11,6$  тыс/мкл у больных с ДОК-отрицательным статусом ( $p = 0,007$ ). Остальные показатели и их соотношения не имели статистически значимой разницы у пациентов с различными статусами ДОК.

### Заключение

Общие результаты указывают на ценность определения статуса ДОК у пациентов с люминальным РМЖ, а также на возможность использования этого показателя в качестве терапевтической мишени для лечения заболевания и профилактики его рецидивов.

Статистически значимой связи между статусом ДОК и клиническими характеристиками опухоли выявлено не было. Частота обнаружения ДОК составила 40 % и не отличалась при люминальных А и В типах опухоли, что указывает на более глубокие молекулярно-генетические и иммунологические взаимоотношения между ДОК костного мозга, иммунной системой организма и первичной опухолью.

При изучении микроокружения ДОК в костном мозге мы пришли к выводу, что баланс между  $CD8^+$ -лимфоцитами и ДОК — один из возможных механизмов персистирования ДОК и опухолевого покоя. В связи с этим стратегией будущего в лечении и профилактике РМЖ станет терапия, нацеленная на уничтожение ДОК и активацию  $CD8^+$ -лимфоцитов в костном мозге.

У пациентов с разными статусами ДОК не были обнаружены статистически значимые различия в экспрессии первичной опухолью HLA-DR, HLA-I, CD71, а также в степени инфильтрации костного мозга клетками иммунной системы. Данная тема требует более глубокого изучения и проведения новых клинических исследований.

Наши исследования подтвердили значимость ДОК у пациентов с люминальным РМЖ и расширили представления о понимании механизмов канцерогенеза и отдаленного метастазирования. Следует отметить, что наличие ДОК в костном мозге в большей степени зависит от показателей костномозгового микроокружения и уровня  $CD8^+$ -лимфоцитов, чем от клинических характеристик и особенностей самой опухоли. В перспективе (при достижении 5-летней выживаемости пациентов) планируется изучение вышеописанной исследуемой группы на предмет зависимости показателей отдаленной выживаемости от статуса ДОК и иммунофенотипа опухоли.

**Таблица 2.** Распределение образцов люминального РМЖ в зависимости от наличия ДОК и экспрессии HLA-DR, HLA-I, CD71

| Статус            | HLA-DR                 |                        | HLA-I                  |                        | CD71                   |                        |
|-------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
|                   | негативный<br>(n = 25) | позитивный<br>(n = 16) | негативный<br>(n = 26) | позитивный<br>(n = 16) | негативный<br>(n = 25) | позитивный<br>(n = 16) |
| ДОК-отрицательный | 64 %                   | 36 %                   | 38,5 %                 | 61,5 %                 | 36 %                   | 64 %                   |
| ДОК-положительный | 62,5 %                 | 37,5 %                 | 43,8 %                 | 56,3 %                 | 25 %                   | 75 %                   |
| p                 | 0,93                   |                        | 0,74                   |                        | 0,46                   |                        |

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

1. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: An overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687–717. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0.
2. Воротников И.К., Чхиквадзе Н.В., Рябчиков Д.А. и др. Лимфаденэктомия при раке молочной железы: за и против. *Злокачественные опухоли* 2016;(2):37–42. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-2-37-42.
3. Hartkopf A.D., Wallwiener M., Hahn M. et al. Simultaneous Detection of Disseminated and Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer Patients. *Cancer Res Treat* 2016;48(1):115–24. DOI: 10.4143/crt.2014.287.
4. Braun S., Vogl F.D., Naume B. et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:793–802. DOI: 10.1056/NEJMoa050434.
5. Beznos O.A., Artamonova E.V., Tupitsyn N.N. Disseminated tumor cell subpopulations: approaches to identification and clinical significance. *Haematopoiesis Immunology* 2016; 14(1):73–9.
6. Uhr J.W., Pantel K. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:12396–400. DOI: 10.1073/pnas.1106613108.
7. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002;2:563–72. DOI: 10.1038/nrc865.
8. Давыдов М.И., Тупицын Н.Н., Григорьева Т.А. и др. Метод проточной цитометрии в оценке минимального поражения костного мозга у больных раком. *Иммунология гемопоза* 2014;12(1):8–17.
9. Wölfl U., Müller V., Pantel K. Disseminated tumor cells in breast cancer: detection, characterization and clinical relevance. *Future Oncol* 2006; 2(4):553–61. DOI: 10.2217/14796694.2.4.553.
10. Funke I., Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastasis: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol* 1998;16(2):557–66. DOI: 10.1200/JCO.1998.16.2.557.
11. Крохина О.В., Летягин В.П., Тупицын Н.Н. и др. Иммуноморфологическая диагностика микрометастазов рака молочной железы в костный мозг. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2005;(1):70–3.
12. Molino A., Pelosi G., Turazza M. et al. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:23–30. PMID: 9116315.
13. Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования опухолевых клеток в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2003.
14. Pages F., Galon J., Dieu-Nosjean M.C. et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010;29:1093–102. DOI: 10.1038/onc.2009.416.
15. Capietto A.-H., Faccio R. Immune regulation of bone metastasis. *Bonekey Rep* 2014;3:600. DOI: 10.1038/bonekey.2014.95.
16. Григорьева Т.А., Безнос О.А., Тупицын Н.Н. Субпопуляции лимфоцитов костного мозга больных раком молочной железы. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2015;(2): 52–5. DOI: 10.17650/1994-4098-2015-11-2-52-55.
17. Biylgi O., Karagöz B., Türken O. et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells and thyroid autoantibodies in breast cancer patients. *Cent Eur J Immunol* 2014;39(3):338–44. DOI: 10.5114/ceji.2014.45945.
18. Bedri S., Mohamed M., Sarwath H., Sastry K. Characterization and quantification of tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* 2014;2(Suppl 1):P9. DOI: 10.1186/2051-1426-2-S1-P9.
19. Rathore A.S., Kumar S., Konwar R. et al. An Indian CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> & CD8<sup>+</sup> tumour infiltrating lymphocytes (TILs) are predictors of favourable survival outcome in infiltrating ductal carcinoma of breast. *J Med Res* 2014;140(3):361–9. PMID: PMC4248382.
20. Ellinidi V.N., Anikeeva N.V., Goncharova O.A., Krasnozhen D.A. Natural killer cells (CD56, CD16) as a factor of local antitumor immunity in breast cancer. *Voprosy onkologii* 2005;51(4):447–9. PMID: 16308976.
21. Kaneko K., Ishigami S., Kijima Y. et al. BMC Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *Cancer* 2011;11:454. DOI: 10.1186/1471-2407-11-454.

# КОМПЛЕКСНАЯ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ РАННЕГО ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА ОРГАНОСОХРАНЯЮЩЕГО ОПЕРАТИВНОГО ЛЕЧЕНИЯ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА

И.С. Шорманов<sup>1</sup>, М.С. Лось<sup>2</sup>, К.С. Титов<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России;  
Россия, 150000 Ярославль, ул. Революционная, 5;

<sup>2</sup>ГБУЗ Ярославской области «Областная клиническая больница»; Россия, 150062 Ярославль, ул. Яковлевская, 7;

<sup>3</sup>ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента  
здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

**Контакты:** Марина Сергеевна Лось 922099@mail.ru

**Введение.** В настоящее время ведется постоянный поиск новых эффективных методов защиты от ишемического повреждения, происходящего в момент создания тепловой ишемии при органосохраняющих операциях на почке и несущего в себе риск свести на нет функциональные результаты лечения.

**Цель исследования** — улучшение функциональных результатов хирургического лечения, сокращение числа койко-дней.

**Материалы и методы.** Нами проведено клиническое исследование перенесших органосохраняющие операции на почке по поводу почечно-клеточного рака по элективным показаниям. В исследование включены 69 пациентов. Время тепловой ишемии  $14,2 \pm 2,4$  мин. В 1-й группе ( $n = 34$ ) проводилась стандартная послеоперационная терапия, во 2-й группе ( $n = 35$ ) в послеоперационном периоде проводили комплексную терапию: ежедневные сеансы гипербарической оксигенации (всего 5 сеансов) совместно с пероральным приемом  $\alpha$ -токоферола ацетата в течение месяца. Проведены исследования изменений показателей общего анализа крови (степени лейкоцитоза, скорости оседания эритроцитов, лимфоцитоза, лейкоцитарного индекса интоксикации), скорости клубочковой фильтрации, состояния иммунитета, периферического кровообращения, функции почек, качества жизни.

**Результаты.** Данная схема послеоперационной реабилитации у пациентов с почечно-клеточным раком способствует активации противовоспалительного и иммунного ответа на оперативное лечение, более быстрому и полному восстановлению кровоснабжения и функции оперированного органа.

**Выводы.** Комплексное послеоперационное влияние гипербарической оксигенации и  $\alpha$ -токоферола позволяет снизить частоту послеоперационных осложнений и сократить сроки госпитализации.

**Ключевые слова:** резекция, рак почки, противоишемическая защита

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-58-63

## COMPLEX ANTI-ISCHEMIC THERAPY OF THE EARLY POSTOPERATIVE PERIOD OF ORGAN-PRESERVING OPERATIONAL TREATMENT OF RENAL CELLULAR CANCER

I.S. Shormanov<sup>1</sup>, M.S. Los<sup>2</sup>, K.S. Titov<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Yaroslavl State Medical University, Ministry of Health of Russia; 5 Revolyutsionnaya St., Yaroslavl 150000, Russia;

<sup>2</sup>Yaroslavl Regional Clinical Hospital; 7 Yakovlevskaya St., Yaroslavl 150062, Russia;

<sup>3</sup>A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia

**Introduction.** Currently it is a constant search for new and effective methods of protection against ischemic injury in limb-salvage surgery on kidneys.

**Objective** — improvement of functional results of surgical treatment, reducing the time of hospitalization.

**Materials and methods.** We conducted a clinical trial involving 69 patients. Time “warm ischemia” —  $14,2 \pm 2,4$  min. All performed on the kidney sparing surgery for renal cell carcinoma for elective indications. After surgery, the study group ( $n = 35$ ) held sessions of hyperbaric oxygenation parallel receiving  $\alpha$ -tocopherol acetate. The control group included 34 patients. The analysis of inflammatory changes in indicators of total blood test, glomerular filtration rate, the state of immunity, peripheral circulation, renal function, the assessment of quality of life was performed.

**Results.** The scheme of post-operative rehabilitation of patients with renal cell carcinoma helps to activate the anti-inflammatory and immune response to surgical treatment, more rapid and complete restoration of blood flow and function of organ operated.

**Conclusion.** This reduces the incidence of postoperative complications and period of hospitalization.

**Key words:** partial nephrectomy, kidney cancer, anti-ischemic protection

### Введение

В век развития органосохраняющей хирургии создание «сухого» операционного поля является важнейшим техническим элементом, позволяющим корректно выполнить резекцию почки. Чаще всего применяется методика тепловой ишемии, которая является «провокатором» острого ишемического повреждения [1, 2]. Выраженность изменений прямо пропорциональна времени прекращения кровотока. В настоящее время кроме реализации возможности сокращения периода тепловой ишемии основными способами противоишемической защиты являются локальное охлаждение (обкладывание льдом, перфузия холодным раствором) [3, 4] и применение фармакологических препаратов, обладающих противоишемическим и антигипоксическим действием (стероидных гормонов, антиоксидантов, блокаторов кальциевых каналов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторов, диуретиков и др.) [5–10]. Повышение противоишемической толерантности органов возможно с помощью адаптации клеток к дефициту кислорода путем проведения нескольких сеансов дыхания газовой смесью, обедненной кислородом (10–12 %), или кратковременного 2–3-кратного пережатия питающих орган кровеносных сосудов (на 3–5 мин) с периодами реперфузии, выполненными непосредственно перед основным периодом ишемии [11]. Современным направлением исследований по сохранению функции почки является клеточная терапия (использование различных типов стволовых клеток). Разрабатываются новые классы антиоксидантов (так называемые митохондриально-ориентированные), способные избирательно накапливаться в функционирующих митохондриях в концентрации, превышающей в 1000 раз их концентрацию в цитоплазме, и обеспечивать защиту в гораздо меньших дозах, чем традиционные антиоксиданты [12]. Однако данные методы имеют или ограниченную клиническую эффективность, или технические неудобства в исполнении, или экономическую нерентабельность, что диктует постоянный поиск новых альтернативных методов защиты.

**Цель исследования** — улучшение результатов органосохраняющих операций (ОСО) при раке почки путем применения комплексной послеоперационной

терапии (КПТ), включающей гипербарическую оксигенацию и прием  $\alpha$ -токоферола ацетата.

### Материалы и методы

В клиническое исследование включили данные 69 пациентов со светлоклеточным почечно-клеточным раком в стадии T1N0M0, которым выполнена ОСО по электроактивным показаниям. В послеоперационном периоде пациенты были разделены на 2 группы. Пациентам 1-й группы ( $n = 34$ ) проводилась стандартная послеоперационная терапия (СПТ), включающая назначение анальгетиков, антибиотиков, гемостатиков и переливание эритроцитарной массы по показаниям. Больным 2-й группы ( $n = 35$ ) наряду с СПТ проводили КПТ: 5 сеансов гипербарической оксигенации в камере БЛКС-301 (Россия) под давлением 2,0–2,4 атм в течение 60 мин ежедневно начиная с 4-го дня после операции и 10 % масляный раствор  $\alpha$ -токоферола ацетата *per os* в дозе 150 мг/сут в течение месяца начиная со 2-го дня после операции.

### Результаты

В ответ на оперативное вмешательство в 1-й день послеоперационного периода происходит увеличение скорости оседания эритроцитов (СОЭ) и лейкоцитов практически в 2 раза, лейкоцитарного индекса интоксикации (ЛИИ) — в 4 раза. В дальнейшем степень лейкоцитоза к 14-м суткам наблюдения увеличивалась у пациентов 1-й группы, во 2-й группе данный показатель не отличался от уровня первых суток ( $p > 0,05$ ), разница в показателях между группами статистически достоверная ( $p < 0,05$ ). К 28-м суткам количество лейкоцитов полностью нормализовалось в обеих группах ( $p > 0,05$ ) (табл. 1).

Показатель СОЭ в 1-е сутки после операции превышал нормальные значения в 2 раза. К 14-му дню послеоперационного периода его рост продолжался и составил 75,6 % в 1-й группе и 45 % во 2-й по сравнению с показателями первых суток послеоперационного периода. Разница между группами статистически достоверная ( $p < 0,05$ ). К окончанию наблюдения СОЭ снизилась в обеих группах, но не достигла дооперационных значений ( $p < 0,05$ ), однако во 2-й группе изучаемый показатель на 1-е сутки после операции

**Таблица 1.** Динамика содержания лейкоцитов в периферической крови,  $\times 10^9$  г/л

| До операции    | 1-е сутки         | 14-е сутки           |                       | 28-е сутки          |                     |
|----------------|-------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|
|                |                   | СПТ                  | КПТ                   | СПТ                 | КПТ                 |
| $7,2 \pm 0,16$ | $12,5 \pm 0,29^*$ | $13,7 \pm 0,13^{**}$ | $12,8 \pm 0,14^{***}$ | $7,4 \pm 0,24^{**}$ | $6,9 \pm 0,17^{**}$ |

**Примечание.** Здесь и в табл. 2–9: КПТ — комплексная послеоперационная терапия; СПТ — стандартная послеоперационная терапия.

\*Достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к дооперационным значениям; \*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к 1-м суткам послеоперационного периода; \*\*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) между показателями 1-й и 2-й групп.

Таблица 2. Динамика СОЭ после ОСО на почке, мм/ч

| До операции | 1-е сутки    | 14-е сутки   |                 | 28-е сутки  |                  |
|-------------|--------------|--------------|-----------------|-------------|------------------|
|             |              | СПТ          | КПТ             | СПТ         | КПТ              |
| 8,7 ± 0,41  | 16,4 ± 1,14* | 28,8 ± 1,7** | 23,8 ± 1,5**/** | 15,9 ± 1,1* | 13,2 ± 0,64**/** |

\*Достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к дооперационным значениям; \*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к 1-м суткам послеоперационного периода; \*\*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) показателей групп 1 и 2.

был статистически достоверно ниже такового в 1-й группе ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Уровень ЛИИ (табл. 3) снизился уже на 5-е сутки в обеих группах, но во 2-й группе (с КПТ) это снижение было на 15,8 % более активным ( $p < 0,05$  между группами). Полная нормализация ЛИИ произошла к 7-м суткам в обеих группах.

Во 2-й группе на 7-е сутки после операции нормальные показатели лейкоцитурии определялись у 67 % против 35 % в 1-й группе. Массивная лейкоцитурия наблюдалась у 9 % пациентов 2-й группы против 21 % в 1-й группе.

С помощью ультразвуковой доплерографии было выявлено увеличение индекса резистентности (RI) и индекса пульсации (PI) междолевых сосудов паренхимы почки на 7-е сутки после оперативного лечения во 2-й группе на 35,6 % и в 1-й группе на 31,4 % соответственно ( $p < 0,05$ ), в дальнейшем отмечено более активное снижение индексов во 2-й

группе на 10-е и 14-е сутки ( $p < 0,05$  между группами) (табл. 4).

К 28-м суткам кровотоков нормализовался в обеих группах в зоне резекции (на уровне междолевых сосудов). Ангиофосцинтиграфия в этот период наблюдения выявила выраженное нарушение (на 30 %) почечного кровотока в 1-й группе ( $p < 0,05$ ).

В обеих группах снижения скорости клубочковой фильтрации не отмечалось ни в одном из наблюдений как в до-, так и в послеоперационном периоде. Среднее значение показателя перед ОСО составило  $106,4 \pm 3,29$  мл/мин, в 1-е сутки —  $101,8 \pm 4,52$  мл/мин. На 7-е сутки послеоперационного периода показатель скорости клубочковой фильтрации в 1-й группе составил  $108,6 \pm 4,34$  и  $109,4 \pm 5,23$  мл/мин во 2-й.

При оценке показателей раздельной функции почек по данным динамической ангиофосцинтиграфии через месяц после операции было выявлено, что время достижения пика концентрации радиоизотопного

Таблица 3. Динамика ЛИИ после ОСО на почке

| До операции | 1-е сутки   | 5-е сутки    |                 | 7-е сутки     |               |
|-------------|-------------|--------------|-----------------|---------------|---------------|
|             |             | СПТ          | КПТ             | СПТ           | КПТ           |
| 1,1 ± 0,14  | 4,3 ± 0,32* | 1,9 ± 0,09** | 1,6 ± 0,11**/** | 1,0 ± 0,05*** | 0,9 ± 0,04*** |

\*Достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к дооперационным значениям; \*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к 1-й группе; \*\*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к первым суткам послеоперационного периода.

Таблица 4. Динамика изменений индексов периферического сопротивления сосудов

| День наблюдения | RI            |                | PI            |                |
|-----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
|                 | СПТ           | КПТ            | СПТ           | КПТ            |
| До операции     | 0,59 ± 0,004  |                | 1,02 ± 0,04   |                |
| После операции: |               |                |               |                |
| 3–5-й           | 0,73 ± 0,004* | 0,74 ± 0,004*  | 1,28 ± 0,003* | 1,29 ± 0,002*  |
| 7-й             | 0,8 ± 0,002*  | 0,8 ± 0,002*   | 1,34 ± 0,002* | 1,34 ± 0,002*  |
| 10-й            | 0,68 ± 0,002* | 0,65 ± 0,002** | 1,26 ± 0,003* | 1,17 ± 0,003** |
| 14-й            | 0,64 ± 0,002* | 0,62 ± 0,003** | 1,18 ± 0,002* | 1,09 ± 0,003** |
| 28-й            | 0,59 ± 0,002  | 0,58 ± 0,003   | 1,02 ± 0,002  | 0,99 ± 0,002   |

Примечание. RI — индекс резистентности; PI — индекс пульсации.

\*Достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к дооперационным значениям; \*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) показателей групп 1 и 2.

препарата ( $T_{\max}$ ) в паренхиме органа было короче у тех пациентов, которым в послеоперационном периоде проводилась КПТ.  $T_{\max}$  не превышало 15 мин. Средний показатель во 2-й группе составил  $8,6 \pm 0,26$  мин, аналогичный показатель в 1-й группе максимально достигал 24,7 мин, в среднем  $15,2 \pm 0,89$  мин. Различия между группами статистически достоверны ( $p < 0,05$ ). Среднее значение продолжительности периода полувыведения радиоизотопа составило  $28,1 \pm 1,07$  мин у пациентов 2-й группы, у пациентов 1-й группы –  $37,9 \pm 1,78$  мин. Между группами в значениях данного параметра были выявлены статистически достоверные различия ( $p < 0,05$ ).

Уровень лимфоцитов в периферической крови снизился в 1-е сутки послеоперационного периода на 52,7 % ( $p < 0,05$ ). В дальнейшем во 2-й группе (с КПТ) к 14-м суткам данный показатель не отличался от дооперационных значений, а в 1-й группе (с СПТ) оставался ниже таковых на 19,3 % ( $p < 0,05$ ). Разница между группами составила 12,5 % ( $p < 0,05$ ). К 28-м суткам показатель не отличался от нормы в обеих группах ( $p > 0,05$ ) (табл. 5).

Динамика популяционного состава лимфоцитов, ответственных за активность клеточного иммунитета, отражена в табл. 6.

Функциональная активность лейкоцитов оценивалась по фагоцитарной активности нейтрофилов

и макрофагов (фагоцитарному индексу и фагоцитарному числу) (табл. 7).

Динамика показателей гуморального звена иммунной системы представлена в табл. 8.

Полученные результаты иммунограмм позволяют говорить об отсутствии у пациентов с локализованным раком почки выраженных нарушений в иммунной системе. Оперативное вмешательство приводит к изменениям в клеточном звене иммунитета. Проводимая КПТ позволяет скорректировать нарушения иммунной системы. При анализе дооперационных данных и показателей на 14-е сутки после операции получены следующие результаты ( $p < 0,05$ ): уровень Т-лимфоцитов повышался на 14 % в 1-й группе и 23 % во 2-й группе, Т-хелперов – на 40,8 и 24,5 % соответственно, иммунорегуляторного индекса – на 62,6 и 49,6 %, НК-клеток – на 8,7 и 46,6 %; уровень Т-супрессоров, наоборот, снижался на 46,2 и 16,9 %. Фагоцитарное число на фоне КПТ во 2-й группе к 14-м суткам увеличилось в 2 раза, в то время как у пациентов 1-й группы данный показатель снизился на 15 %. Фагоцитарный индекс в послеоперационном периоде имел ту же динамику: увеличение во 2-й группе (с КПТ) на 29,6 % и снижение на 24,1 % в 1-й группе (с СПТ).

На 7–14-е сутки после операции у 16 (47,1 %) больных 1-й группы возникла атака острого пиелонефрита,

Таблица 5. Динамика уровня лимфоцитов в послеоперационном периоде, %

| До операции     | 1-е сутки         | 14-е сутки          |                         | 28-е сутки           |                      |
|-----------------|-------------------|---------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
|                 |                   | СПТ                 | КПТ                     | СПТ                  | КПТ                  |
| $29,6 \pm 0,98$ | $15,6 \pm 0,52^*$ | $23,9 \pm 0,6^{**}$ | $27,3 \pm 0,68^{**/**}$ | $28,7 \pm 0,71^{**}$ | $31,1 \pm 0,38^{**}$ |

\*Достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к дооперационным значениям; \*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) по отношению к первым суткам послеоперационного периода; \*\*\*достоверная разница ( $p < 0,05$ ) показателей групп 1 и 2.

Таблица 6. Динамика показателей клеточного иммунитета, %

| Показатель                                | До операции     | 1-е сутки         | 7-е сутки         |                      | 14-е сутки        |                      |
|-------------------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|                                           |                 |                   | СПТ               | КПТ                  | СПТ               | КПТ                  |
| Т-лимфоциты                               | $64,4 \pm 0,12$ | $64,8 \pm 0,17$   | $72,7 \pm 0,6^*$  | $76,6 \pm 0,4^{**}$  | $73,4 \pm 0,5^*$  | $79,2 \pm 0,4^{**}$  |
| Т-хелперы CD4 <sup>+</sup>                | $37,5 \pm 1,4$  | $40,2 \pm 0,4$    | $53,6 \pm 0,5^*$  | $44,0 \pm 0,9^{**}$  | $52,8 \pm 0,3^*$  | $46,7 \pm 0,7^{**}$  |
| Т-супрессоры CD8 <sup>+</sup>             | $31,4 \pm 0,7$  | $23,3 \pm 1,2^*$  | $18,2 \pm 0,5^*$  | $25,1 \pm 0,6^{**}$  | $16,9 \pm 0,7^*$  | $26,1 \pm 0,3^{**}$  |
| Индекс CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> | $1,19 \pm 0,07$ | $1,73 \pm 0,06^*$ | $2,95 \pm 0,03^*$ | $1,75 \pm 0,03^{**}$ | $3,12 \pm 0,02^*$ | $1,79 \pm 0,05^{**}$ |
| НК-клетки CD16 <sup>+</sup>               | $10,3 \pm 0,5$  | $9,8 \pm 0,2$     | $11,3 \pm 0,3$    | $13,5 \pm 0,4^{**}$  | $11,2 \pm 0,3$    | $15,1 \pm 0,5^{**}$  |

\*Достоверная разница с дооперационными значениями ( $p < 0,05$ ); \*\*достоверная разница по отношению к группе 1 ( $p < 0,05$ ).

Таблица 7. Динамика показателей фагоцитарной активности лейкоцитов

| Показатель             | До операции | 1-е сутки   | 7-е сутки   |                 | 14-е сутки  |                 |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|-----------------|
|                        |             |             | СПТ         | КПТ             | СПТ         | КПТ             |
| Фагоцитарное число     | 3,38 ± 0,07 | 3,51 ± 0,04 | 3,54 ± 0,04 | 6,08 ± 0,09*/** | 2,9 ± 0,08* | 6,71 ± 0,05*/** |
| Фагоцитарный индекс, % | 59,4 ± 1,1  | 61,9 ± 0,7  | 60,3 ± 0,2  | 64,8 ± 0,7*/**  | 45,1 ± 0,6* | 77,0 ± 0,9*/**  |

\*Достоверная разница с дооперационными значениями ( $p < 0,05$ ); \*\*достоверная разница по отношению к 1-й группе ( $p < 0,05$ ).

проявляющаяся повышением температуры тела до фебрильных цифр, усилением болевого синдрома, а также изменением лабораторных показателей (увеличение количества лейкоцитов и СОЭ в периферической крови, а также лейкоцитурии) в разной степени, что потребовало повторного проведения антибактериальной терапии. Во 2-й группе данное осложнение возникло лишь у 7 (20 %) пациентов.

Средняя продолжительность госпитализации больных после ОСО на почке, получавших КПТ, составила  $18,1 \pm 0,4$  дня, что было на 2,5 дня короче аналогичного показателя в 1-й группе, который составил  $20,6 \pm 0,6$  дня.

Через месяц после операции всем пациентам проводилась оценка качества жизни по опроснику SF-36, выявившая изменение всех показателей ( $p < 0,05$ ) (табл. 9).

Во 2-й группе (с КПТ) показатели физического и социального функционирования, психологического здоровья статистически не отличались от таковых у пациентов, получавших СПТ ( $p > 0,05$ ). Более выраженные различия между группами были выявлены при изучении физического функционирования и общего здоровья — на 19,7 % ( $p < 0,05$ ) и 16,3 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Разница значений между группами для ролевого функционирования ( $p > 0,05$ ) и боли ( $p < 0,05$ ) в физической компоненте не превысила 10 %. При изучении психической составля-

ющей по опроснику SF-36 были выявлены максимальные колебания между группами в значениях жизнеспособности — 15,5 % ( $p < 0,05$ ). Разница в значениях эмоционального и социального функционирования, а также психологического здоровья составила 11,4 % ( $p < 0,05$ ), 9,6 % ( $p > 0,05$ ) и 15 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

### Обсуждение

Поиск средств для защиты почечной паренхимы является актуальной задачей современной урологии. Гипербарическая оксигенация и  $\alpha$ -токоферола ацетат давно используются в медицине, достаточно изучены показания и противопоказания к их применению, а также терапевтический эффект. Нами проведено исследование, направленное на послеоперационную реабилитацию больных, которые перенесли ОСО на почках. Для изучения влияния КПТ был проведен анализ динамики различных показателей, отражающих воспалительный, гемодинамический, функциональный, иммунологический аспекты данной проблемы, а также уровень качества жизни пациентов. Предлагаемая нами методика реабилитации больных после ОСО на почках имеет несколько преимуществ. Во-первых, она оказывает положительное влияние как на объективные, так и на субъективные изучаемые нами показатели послеоперационного периода при наличии

Таблица 8. Динамика показателей гуморального иммунитета

| Популяция      | До операции | 1-е сутки   | 7-е сутки   |                | 14-е сутки  |                |
|----------------|-------------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|
|                |             |             | СПТ         | КПТ            | СПТ         | КПТ            |
| IgM, г/л       | 1,48 ± 0,05 | 1,60 ± 0,04 | 1,31 ± 0,07 | 1,49 ± 0,06    | 1,43 ± 0,03 | 1,48 ± 0,05    |
| IgG, г/л       | 8,9 ± 0,25  | 9,3 ± 0,14  | 9,5 ± 0,4   | 9,4 ± 0,34     | 9,1 ± 0,35  | 8,9 ± 0,27     |
| IgA, г/л       | 1,37 ± 0,03 | 1,44 ± 0,04 | 1,46 ± 0,07 | 1,48 ± 0,06    | 1,42 ± 0,06 | 1,32 ± 0,05    |
| В-лимфоциты, % | 12,8 ± 0,38 | 13,4 ± 0,31 | 12,2 ± 0,67 | 13,2 ± 0,51    | 12,0 ± 0,63 | 12,1 ± 0,58    |
| ЦИК, г/л       | 5,6 ± 0,4   | 5,9 ± 0,12  | 5,2 ± 0,18  | 4,7 ± 0,17*/** | 4,8 ± 0,16* | 2,9 ± 0,13*/** |

Примечание. Ig — иммуноглобулин; ЦИК — циркулирующие иммунные комплексы.

\*Достоверные различия между группами ( $p < 0,05$ ); \*\*достоверные различия с дооперационными значениями ( $p < 0,05$ ).

Таблица 9. Оценка состояния качества жизни через месяц после операции (опросник SF-36)

| Показатель                                                       | До операции | 28-й день    |                 |
|------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|-----------------|
|                                                                  |             | СПТ          | КПТ             |
| Физическое функционирование                                      | 27,6 ± 1,27 | 19,1 ± 0,62* | 23,8 ± 0,47*/** |
| Рольное функционирование, обусловленное физическим состоянием    | 7,2 ± 0,05  | 4,7 ± 0,05*  | 4,9 ± 0,09*     |
| Интенсивность боли                                               | 8,8 ± 0,16  | 9,2 ± 0,18*  | 9,8 ± 0,21***   |
| Общее состояние здоровья                                         | 22,1 ± 0,46 | 17,4 ± 0,8*  | 20,8 ± 0,55*/** |
| Жизненная активность                                             | 19,4 ± 0,48 | 13,6 ± 0,67* | 16,1 ± 0,68*/** |
| Социальное функционирование                                      | 8,3 ± 0,22  | 4,7 ± 0,36*  | 5,2 ± 0,34*     |
| Рольное функционирование, обусловленное эмоциональным состоянием | 5,1 ± 0,08  | 3,9 ± 0,13*  | 4,4 ± 0,13***   |
| Психическое здоровье                                             | 22,7 ± 0,5  | 15,9 ± 0,94* | 18,7 ± 0,81*/** |

\*Различия с дооперационным показателем достоверны ( $p < 0,05$ ); \*\*различия между группами достоверны ( $p < 0,05$ ).

минимальных противопоказаний и побочных явлений. Во-вторых, она не является энергозатратной для медицинского персонала. В-третьих, достаточно экономична. К недостаткам методики можно отнести недостаточную оснащенность медицинских учреждений аппаратурой для проведения гипербарической оксигенотерапии.

### Выводы

Послеоперационная реабилитационная терапия после ОСО на почке необходима даже при электро-ных показаниях к операции. Она позволяет не только ускорить восстановление функции оперированного органа и избежать послеоперационных осложнений, но и улучшить качество жизни оперированных больных.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Онопко В.Ф., Леявин К.Б., Сусин С.А. Органосохраняющие операции на почке: пути профилактики послеоперационных осложнений. Клиническая онкология 2012; спец. выпуск (I):16–7.
- Аляев Ю.Г., Григорьев Н.А., Безруков Е.А. и др. Сравнительная характеристика лапароскопической и ретроперитонеоскопической резекции почки при опухоли. Материалы XIV конгресса Российского общества урологов. Саратов, 10–12 сентября 2014. С. 240–241.
- Gill I.S., Kavoussi L.R., Lane B.R. et al. Comparison of 1,800 laparoscopic and open partial nephrectomies for single renal tumors. J Urol 2007;178(1):41–6. DOI: 10.1016/j.juro.2007.03.038. PMID: 17574056.
- Russo P. Open partial nephrectomy: an essential operation with an expanding role. Curr Opin Urol 2007;17(1):309–15. DOI: 10.1097/MOU.0b013e328277f1a2. PMID: 17762622.
- Кирпатовский В.И., Надточий О.Н., Сыромятникова Е.В. Возможности пролонгации допустимых сроков ишемии почки при использовании разных вариантов противоишемической защиты. Урология 2003;(3):7–10.
- Hosgood S.A., Yates P.J., Nicholson M.L. 1400W reduces ischemia reperfusion injury in an ex-vivo porcine model of the donation after circulatory death kidney donor. World J Transplant 2014;4(4):299–305. DOI: 10.5500/wjt.v4.i4.299. PMID: 25540738. PMCID: PMC4274599.
- Mohamed Abd E., Lasheen N.N. Comparative study on the protective role of vitamin C and L-arginine in experimental renal ischemia reperfusion in adult rats. Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol 2014;6(3):153–65. PMID: 25349638. PMCID: PMC4208736.
- Wystrychowski W., Wystrychowski G., Zukowska-Szczecowska E. et al. Nephroprotective effect of pentoxifylline in renal ischemia-reperfusion in rat depends on the timing of its administration. Transplant Proc 2014;46(8):2555–7. DOI: 10.1016/j.transproceed.2014.09.052. PMID: 25380864.
- Wu K., Li H., Tian J. et al. Protective effect of baicalein on renal ischemia/reperfusion injury in the rat. Ren Fail 2015;37(2):285–91. DOI: 10.3109/0886022X.2014.991999. PMID: 25519209.
- Ziypak T., Halici Z., Alkan E. et al. Renoprotective effect of aliskiren on renal ischemia/reperfusion injury in rats: electron microscopy and molecular study. Ren Fail 2015;37(2):343–54. DOI: 10.3109/0886022X.2014.991327. PMID: 25524622.
- Lee H.T., Emala C.W. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors. Am J Physiol Renal Physiol 2000;278(3):F380–7. PMID: 10710542.
- Васильева А.К., Плотников Е.Ю., Зоров Д.Б. Защитное действие ингибиторов GSK-3 и митохондриально-ориентированного антиоксиданта SkQ1 при ишемии/реоксигенации в культуре клеток почки. Материалы II Международного молодежного медицинского конгресса. СПб., 2007. С. 45–46.

# СВЯЗЬ ДЕЛЕЦИЙ И ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ ГЕНА P53 С РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА К АРАНОЗЕ

А.В. Пономарев<sup>1</sup>, А.А. Солодовник<sup>1</sup>, А.С. Мкртчян<sup>2</sup>, Ю.П. Финашутина<sup>1</sup>, А.А. Турба<sup>2</sup>,  
В.А. Мисюрин<sup>1,2</sup>, А.В. Мисюрин<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

**Контакты:** Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

**Введение.** Одним из химиопрепаратов, применяемых для лечения меланомы, является араноза, препарат из класса производных нитрозомочевины — метилирующий ДНК агент. Действие аранозы связано с повреждением ДНК, после которого включаются механизмы апоптоза. Важную роль в этом процессе должен осуществлять белок p53, а различные нарушения данного белка могут приводить к лекарственной устойчивости.

**Цель исследования** — изучить мутационный статус белка p53 в клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека и оценить его связь с резистентностью клеточных линий к аранозе.

**Материалы и методы.** Исследование проводили на 14 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека. Методом МТТ-теста была определена ИК<sub>50</sub> аранозы для клеточных линий. С помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* оценили состояние короткого плеча хромосомы 17, на котором находится ген p53. С помощью секвенирования по Сэнгеру изучили наличие точечных мутаций в ДНК-связывающем домене гена p53.

**Результаты.** Клеточные линии метастатической меланомы кожи имели разную чувствительность к аранозе. Практически все клеточные линии были неоднородны по состоянию хромосомы 17. В 2 линиях были обнаружены точечные мутации в гене p53. При этом часть устойчивых клеточных линий почти не имели мутационных нарушений p53, а другая часть устойчивых линий, наоборот, несла множество нарушений гена p53.

**Выводы.** Для части клеточных линий метастатической меланомы кожи можно установить корреляцию резистентности с мутациями гена p53. Однако для других клеточных линий метастатической меланомы кожи резистентность, скорее всего, обусловлена и иными механизмами.

**Ключевые слова:** араноза, меланома, p53, мутации, флуоресцентная гибридизация *in situ*, секвенирование

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-64-69

## RELATIONSHIP BETWEEN DELETION AND POINT MUTATIONS OF P53 AND DRUG RESISTANCE TO ARANOZA IN HUMAN MELANOMA CELL LINES

A.V. Ponomarev<sup>1</sup>, A.A. Solodovnik<sup>1</sup>, A.S. Mkrtychyan<sup>2</sup>, Yu.P. Finashutina<sup>1</sup>, A.A. Turba<sup>2</sup>, V.A. Misyurin<sup>1,2</sup>,  
A.V. Misyurin<sup>1</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>“GenoTechnology” LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia

**Introduction.** Aranoza, nitrozourea derivative is a DNA-methylating agent that has been approved for treatment of patients with disseminated melanoma. Aranoza effect is based on DNA damage and then as a result apoptosis mechanisms start launching. The important role in this process must be played by p53 protein, and its different dysfunctions can result in drug resistance.

**Objective.** The purpose is to study p53 mutational status in cell lines of human skin metastatic melanoma and to estimate its connection with cell lines resistance to aranoza.

**Materials and methods.** The research was conducted on 14 cell lines of human skin metastatic melanoma. Aranoza IC<sub>50</sub> for cell lines was determined by MTT-test. The 17p chromosome's condition was estimated by fluorescence *in situ* hybridization. The presence of point mutations in DNA-binding domain of human p53 was researched by Sanger sequencing.

**Results.** Skin metastatic melanoma cell lines had different sensitivity to aranoza. Almost all cell lines were heterogeneous in the condition of 17<sup>th</sup> chromosome. P53 point mutations were found in 2 cell lines. But one part of resistant cell lines almost didn't have any mutational disorders of p53, another part of resistant lines on the contrary had plenty of p53 mutational disorders.

**Conclusion.** The correlation of resistance and p53 mutations can be established for one part of human skin metastatic melanoma cell lines. But for another part of human skin metastatic melanoma cell lines resistance most likely are driven by other mechanisms.

**Key words:** aranoza, melanoma, p53, mutations, fluorescence *in situ* hybridization, sequencing

## Введение

Как известно, образование и прогрессирование опухолей связаны с генетическими изменениями, происходящими в различных участках генома. В нашей работе был изучен мутационный статус белка p53 для метастатической меланомы — наиболее агрессивной опухоли кожи.

Белок p53 кодируется геном *TP53*, который расположен на коротком плече (p) хромосомы 17 и состоит из 11 экзонов. Ген *TP53* человека охватывает 20 кб и кодирует ядерный фосфопротеин (длина 393 аминокислоты). В качестве онкосупрессивного белка p53 действует как «страж генома». В норме «стрессорная» функция p53 неактивна до того момента, пока не произойдет ее активирование за счет повреждений ДНК или других геномных aberrаций. Белок p53 затем активирует свои нисходящие эффекторы для ареста клеточной пролиферации и ингибирования репликации поврежденной ДНК, чтобы провести процесс репарации. В случаях, если повреждение сложное, белок p53 может запускать программу апоптоза. Потеря функции «хранителя генома» позволяет продолжить репликацию клеток с поврежденной ДНК и, в свою очередь, приводит к накоплению генетических изменений, которые способствуют злокачественной прогрессии [1, 2].

В здоровых клетках часто не обнаруживается белок p53 из-за его быстрого убиквитинирования белком MDM2 и последующей протеасомной деградации [3]. Однако при повреждении ДНК и некоторых других стрессах, включая онкогенный стресс, количество p53 увеличивается вследствие его стабилизации [4]. Инактивация p53 является одной из значимых характеристик опухолевой клетки. Для p53 обнаружен широкий спектр различных мутаций, которые встречаются в  $\approx 50\%$  всех опухолей [5]. Еще одним механизмом ослабления реакции p53 на онкогенный стресс может быть повышенная экспрессия MDM2 [6, 7]. Хотя мутация гена-супрессора опухоли p53 является общей чертой для многих типов рака, мутационная инактивация p53 при меланоме встречается редко, а p53 дикого типа часто показывает высокие уровни экспрессии [8–11]. Кроме того, увеличение экспрессии p53 не является достаточным фактором для хорошего ответа на лечение меланомы [12]. Таким образом, можно предположить, что p53 дикого типа в меланоме по каким-то причинам не проявляет своих функций опухолевого супрессора [13].

Хромосомные изменения, в частности аллельные потери, практически на каждой хромосоме были описаны в первичной меланоме, а также в клеточных линиях, полученных из метастазов, демонстрируя множественные генетические изменения на разных участках генов и констатируя гетерогенную природу генетических изменений в меланоме [1, 14–16].

Мы исследовали участок на коротком плече хромосомы 17p, где находится ген *p53*, который подвергается делециям или мутациям при многих опухолях. Например, при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе делеции 17p связаны с худшим клиническим прогнозом [17].

Исследование проводили на культурах клеток, полученных из метастатической меланомы кожи. Мы допускаем, что в процессе культивирования в них могли произойти вторичные генетические изменения. Делеции гена *p53* могли бы быть одной из причин утраты функции p53 в клетках без точечных мутаций.

В связи с тем, что p53 вызывает арест пролиферации или гибель клеток при повреждениях ДНК, мы решили исследовать чувствительность клеточных линий метастатической меланомы кожи к аранозе, являющейся метилирующим ДНК агентом.

**Цель исследования** — изучить мутационный статус белка p53 в клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека и оценить его связь с резистентностью клеточных линий к аранозе.

## Материалы и методы

**Клеточные линии.** Исследования проводили на 14 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [18]. Были изучены клеточные линии mel Kor, mel Rac, mel Is, mel Si, mel Hn, mel R, mel Gi, mel H, mel Il, mel Ibr, mel Me, mel Mtp, mel Gus, mel Bgf. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина, пенициллин (25 000 Ед), стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

**Противоопухолевые препараты.** «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 500 мг» (араноза) производства филиала «Научпрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

**МТТ-тест.** Клетки снимали раствором Версена, отмывали от него полной средой и рассаживали в 96-луночные плоскодонные планшеты (SPL, США) по  $7 \times 10^3$  клеток в 180 мкл полной среды RPMI-1640 на лунку. Далее клетки помещали в термостат при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Через 24 ч в лунки с клетками добавляли исследуемый препарат в выбранных концентрациях. Клетки инкубировали с препаратом в течение 24 ч при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. После инкубации

в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромида (1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере с pH 7,4; Sigma Chemical Co., США) и оставляли еще на 4 ч при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. По окончании инкубации планшеты центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в лунки по 150 мкл диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) для растворения кристаллов формазана, после чего планшеты аккуратно встряхивали на шейкере для равномерного распределения раствора формазана. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций MultiskanEX (ThermoLabsystems, США) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Цитотоксичность (*Ц*) оценивали в % по формуле

$$Ц = (1 - O_o/O_k) \times 100 \%,$$

где *O<sub>к</sub>* — оптическая плотность в контрольных лунках; *O<sub>о</sub>* — оптическая плотность в опытных лунках.

Для оценки цитотоксического эффекта определяли ИК<sub>50</sub> — концентрацию вещества, вызывающую гибель 50 % клеток.

**Флуоресцентная гибридизация *in situ*** (fluorescence *in situ* hybridization, FISH). Для постановки FISH использовался зонд ONp53 (17p13)/SE17 (Kreatech, Германия), исследование проводилось согласно рекомендациям производителя.

**Секвенирование по Сэнгеру.** Секвенирование проводили с использованием набора реактивов BigDye-Terminator 3.1vCycleSequencingKit (Applied Biosystems, США) с учетом рекомендаций производителя. Проводилось секвенирование последовательности, кодирующей ДНК-связывающий домен белка p53. Для данной последовательности характерно наибольшее количество мутаций, нарушающих функции белка p53 [19]. Для проведения секвенирующей реакции в прямом направлении использовали следующие праймеры:

- праймеры для секвенирования экзона 5 и 6 — 5-6F5'-TGTTCACTTGTCCTGACT-3' и 5-6R5'-GGAGGGCCACTGACAACCA-3';
- праймеры для секвенирования экзона 7 — 7F5'-ACTGGCCTCATCTTGGGCCT-3' и 7R5'-GTCA-GAGGCAAGCAGAGGCT-3';
- праймеры для секвенирования экзона 8 — 8F5'-TAAATGGGACAGGTAGGACC-3' и 8R5'-TCCA-CCGCTTCTGTCTCCTGC-3'.

После проведения секвенирующих реакций продукты полимеразной цепной реакции очищали с помощью набора BigDyeXTerminatorPurificationKit (Applied Biosystems). Продукты секвенирующей реакции разделяли и анализировали с использованием гене-

тического анализатора ABIPRISM 310 (Applied Biosystems, США).

**Определение уровня экспрессии гена *TP53*.** Протокол определения представлен в нашем исследовании: из клеток производилось выделение РНК, далее ее конверсия в комплементарную ДНК и количественная ПЦР в реальном времени для оценки уровня экспрессии *TP53* по отношению к гену домашнего хозяйства *ABL* [20]. Используемая система позволяла установить наличие всех типов матричной РНК, кодирующих все известные изоформы белка p53 [20].

**Статистический анализ данных.** Для определения наиболее значимого фактора, связанного с чувствительностью клеток меланомы к аранозе, применялся многофакторный регрессионный анализ. В качестве «входных» параметров были использованы следующие факторы: уровень экспрессии *TP53*; отсутствие аномалий хромосомы 17; наличие делеций или точечных мутаций гена *TP53*; количество клеток с трисомией хромосомы 17; количество клеток с тетрасомией хромосомы 17; количество клеток с гексасомией хромосомы 17 и общее количество клеток с аномалиями хромосомы 17. Для статистического анализа данных FISH-исследования использовались значения, превышающие 5 %, так как меньшие значения процента делеций могли быть ложноположительными. Анализ проводился в программе Statistica 10. Результаты принимались как значимые при *p* < 0,05.

## Результаты

С помощью метода FISH изучили состояние хромосомы 17, кодирующей белок p53. Обнаружено, что практически все клеточные линии были неоднородны по своему составу (табл. 1). В пределах одной клеточной линии были как нормальные клетки, так и клетки с трисомией или тетрасомией хромосомы 17. Часто встречались более сложные нарушения. Ряд клеточных линий имели делеции *p53*. Также изучили наличие мутаций *p53* в клеточных линиях метастатической меланомы и обнаружили наличие мутаций только в 2 линиях из 9 исследованных, это mel Hn и mel Ibr (табл. 2). Полученные результаты согласуются с данными исследований, подтвердивших, что точечные мутации *p53* при меланоме встречаются редко [13].

С помощью МТТ-теста определили чувствительность клеточных линий метастатической меланомы к аранозе. Клеточные линии имели разную чувствительность к исследуемому препарату (табл. 3). Резистентными к аранозе считали линии, для которых значение ИК<sub>50</sub> составляло 1500 мкг/мл или выше.

Методом пошаговой селекции обнаружены наиболее значимые факторы, коррелирующие со значением ИК<sub>50</sub> аранозы. Большее значение ИК<sub>50</sub> наблюдалось при отсутствии аномалий хромосомы 17

Таблица 1. Мутационный статус *p53* в клеточных линиях метастатической меланомы

| Клеточные линии | Мутационный статус <i>p53</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| mel R           | В 50 % клеток – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме, в 25 % – тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, 15 % нормальных клеток, в 6 % – гексасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, в 4 % – разное сочетание количественных изменений хромосомы 17 и делеций гена <i>p53</i>                                                                                                             |
| mel Bgf         | В 44 % клеток – тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, в 21 % – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме, 12 % нормальных клеток, в 8 % – гексасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 хромосомах, в 6 % – тетрасомия хромосомы 17, в 4 % – октасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 4 хромосомах; в 3 % – разное сочетание количественных изменений хромосомы 17 и делеций гена <i>p53</i> |
| mel Kor         | В 60 % клеток – тетрасомия хромосомы 17, в 30 % – трисомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| mel Hn          | В 85 % клеток – трисомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| mel Gi          | В 80 % клеток – трисомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| mel Gus         | В 3 % клеток – делеция гена <i>p53</i> , в 2 % – трисомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| mel Rac         | В 90 % клеток – трисомия хромосомы 17, остальные клетки нормальные                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| mel Il          | В 40 % – тетрасомия с делецией гена <i>p53</i> на 2 из 4 хромосом 17, в 40 % – трисомия с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| mel Ibr         | В 87 % клеток – тетрасомия хромосомы 17, в 9 % – трисомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| mel Cher        | В 65 % клеток – тетрасомия хромосомы 17, в 5 % – гексасомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| mel H           | В 60 % клеток – тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 2 из 4 хромосом, в 37 % – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| mel Is          | В 80 % клеток – тетрасомия, в 15 % – трисомия хромосомы 17                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| mel Me          | В 70 % клеток – тетрасомия, в 15 % – трисомия, в 4 % – трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>p53</i> на 1 из 3 хромосом                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| mel Mtp         | 90 % нормальных клеток, в 7 % – трисомия, в 2 % – дисомия с делецией гена <i>p53</i> на 1 из 2 хромосом, в 1 % – тетрасомия                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| mel Si          | В 65 % клеток – трисомия, 25 % – нормальные клетки, в 4 % – трисомия с делецией гена <i>p53</i> на 1 хромосоме, в 5 % – пентасомия, в 1 % – дисомия с делецией гена на 1 хромосоме                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

Таблица 2. Точечные мутации в гене *TP53* (указано количество мутантных аллелей в процентах от общего числа аллелей)

| Клеточная линия | Наличие точечных мутаций в гене <i>TP53</i>                              |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| mel Hn          | с.451C>T 47 % р.Пролин151Серин<br>с.722C>T 38 %<br>р.Серин240Фенилаланин |
| mel Ibr         | с.512A>C 15 % р.Глутамин171Аланин                                        |
| mel Rac         | отсутствие                                                               |
| mel Kor         | отсутствие                                                               |
| mel Gi          | отсутствие                                                               |
| mel Is          | отсутствие                                                               |
| mel Gus         | отсутствие                                                               |
| mel Ch          | отсутствие                                                               |
| mel Il          | отсутствие                                                               |

( $p = 0,0028$ ), наличии множественных аномалий хромосомы 17 ( $p = 0,0057$ ), отсутствии трисомии хромосомы 17 ( $p = 0,032$ ) и наличии делеций хромосомы 17 или мутаций гена *TP53* ( $p = 0,0395$ ).

Уровень экспрессии гена *TP53*, тетрасомия и гексасомия хромосомы 17 не были значимо связаны с величиной ИК<sub>50</sub> аранозы ( $p > 0,05$ ).

### Заключение

В исследовании был определен мутационный статус белка *p53* в клеточных линиях меланомы человека. Обнаружены количественные изменения хромосомы 17, делеции участка короткого плеча *p53* хромосомы 17 (ген *p53*) и точечные мутации в определенных линиях. В одном случае для клеточных линий с повышенной резистентностью к аранозе характерно наличие аномалий хромосомы 17, в другом – наблюдается отсутствие аномалий хромосомы 17. В результате было выявлено 2 состояния. Первое: клетка

Таблица 3. ИК<sub>50</sub> аранозы и экспрессия TP53 в клеточных линиях метастатической меланомы

| Клеточные линии | ИК <sub>50</sub> аранозы, мкг/мл | Уровень экспрессии TP53, относительно гена ABL, % | Наличие мутации ДНК-связывающего домена | % клеток с делециями локуса гена TP53 от общей популяции |
|-----------------|----------------------------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| mel Kor         | 500                              | не определено                                     | —                                       | 0                                                        |
| mel Rac         | 1250                             | не определено                                     | —                                       | 0                                                        |
| mel Is          | 1300                             | 162                                               | —                                       | 0                                                        |
| mel Si          | 1350                             | не определено                                     | не определено                           | 0                                                        |
| mel Hn          | 1500                             | 246                                               | +                                       | 85                                                       |
| mel R           | 1500                             | не определено                                     | не определено                           | 50                                                       |
| mel Gi          | 1550                             | не определено                                     | —                                       | 0                                                        |
| mel H           | 1800                             | 107                                               | не определено                           | 33                                                       |
| mel Il          | 1900                             | 100                                               | —                                       | 50                                                       |
| mel Ibr         | 2000                             | 214                                               | +                                       | 15                                                       |
| mel Me          | 2000                             | 132                                               | не определено                           | 0                                                        |
| mel Mtp         | 2000                             | 100                                               | не определено                           | 0                                                        |
| mel Gus         | 2000                             | 62                                                | —                                       | 0                                                        |
| mel Bgf         | 2000                             | 2                                                 | не определено                           | 50                                                       |

резистентна к аранозе при наличии множества нарушений хромосомы 17. Второе: хромосома 17 сохранена. Уровень экспрессии TP53 оказался не связанным с устойчивостью к аранозе фактором. Мы можем объяснить наблюдаемый дуализм тем, что у одних больных меланома прогрессирует при наличии аномалий хромосомы 17 и отсутствии «стража генома».

Но существует такая группа больных, у которых прогрессия и резистентность меланомы оказались не связаны с аномалиями хромосомы 17. Прогрессия могла произойти только в том случае, если клетка с самого начала не имела возможности осуществить p53-зависимый апоптоз. Причины этого явления еще недостаточно изучены [6, 13].

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bogdan I., Xin H., Burg G., Boni R. Heterogeneity of allelic deletions within melanoma metastases. *Melanoma Res* 2001;11(4):349–54. PMID: 11479423.
2. Копнин Б. П., Копнин П. Б., Хромова Н. В. и др. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухолевосупрессирующих и онкогенных активностей. *Клиническая онкогематология* 2008;1(1):2–9.
3. Blagosklonny M. V. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 1997;15:1889–93. DOI: 10.1038/sj.onc.1201374. PMID: 9365234.
4. Lavin M. F., Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006;13(6):941–50. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401925. PMID: 16601750.
5. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 1999;380(7–8):879–87. DOI: 10.1515/BC.1999.108. PMID: 10494837.
6. Houben R., Hesbacher S., Schmid C. P. et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One* 2011;6(7):e22096. DOI: 10.1371/journal.pone.0022096. PMID: 21760960.
7. Michael D., Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(7):53–9. PMID: 11790555.
8. Soussi T., Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):233–40. DOI: 10.1038/35106009. PMID: 11902578.
9. Gwosdz C., Scheckenbach K., Lieven O. et al. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer* 2006;118(3):577–82. DOI: 10.1002/ijc.21366. PMID: 16094622.
10. Sparrow L. E., Soong R., Dawkins H. J. et al. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995;5(2):93–100. PMID: 7620345.
11. Soto J. L., Cabrera C. M., Serrano S., López-Nevot M. A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer* 2005;5:36.

- DOI: 10.1186/1471-2407-5-36.  
PMID: 15819981.
12. Li W., Sanki A., Karim R.Z. et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287–301. DOI: 10.1080/00313020600817951. PMID: 16916716.
13. Avery-Kiejda K.A., Bowden N.A., Croft A.J. et al. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer* 2011;11:203. DOI: 10.1186/1471-2407-11-203. PMID: 21615965.
14. Healy E., Belgaid C.E., Takata M. et al. Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi. *Cancer Res* 1996;56(3):589–93.
15. Boni R., Matt D., Voetmeyer A. et al. Chromosomal allele loss in primary cutaneous melanoma is heterogeneous and correlates with proliferation. *J Invest Dermatol* 1998;110(3):215–7. DOI: 10.1046/j.1523-1747.1998.00109.x. PMID: 9506438.
16. Soto Martínez J.L., Cabrera Morales C.M., Serrano Ortega S., López-Nevot M.A. Mutation and homozygous deletion analyses of genes that control the G1/S transition of the cell cycle in skin melanoma: p53, p21, p16 and p15. *Clin Transl Oncol* 2005;7(4):156–64. PMID: 15960923.
17. Shahjahani M., Mohammadiasl J., Noroozi F. et al. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis. *Cell Oncol (Dordr)* 2015;38(2):93–109. DOI: 10.1007/s13402-014-0215-3. PMID: 25563586.
18. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы — основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.
19. Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2(1):a001008. DOI: 10.1101/cshperspect.a001008. PMID: 20182602
20. Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Рудакова А.А. и др. Изменение экспрессии мРНК MDM2 и NFκB1 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии двух лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):52–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-52-58.

# ТЕХНОЛОГИЯ СОЗДАНИЯ И СВОЙСТВА ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ С МЕТКОЙ ALEXA-488 ДЛЯ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

М.Е. Копырулина, Е.Н. Захарова, Т.Н. Заботина, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов

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

**Контакты:** Марина Евгеньевна Копырулина [marina.kopyrulina@mail.ru](mailto:marina.kopyrulina@mail.ru)

**Введение.** Получение флуоресцентных зондов на основе моноклональных антител (МКА) к поверхностным антигенам лейкоцитов человека является актуальной задачей, решение которой даст возможность проводить научные и клинические исследования в области онкологии, гематологии, иммунологии, эпидемиологии.

**Цель исследования** — создание флуоресцентных зондов на основе МКА и флуоресцентного красителя Alexa-488 для анализа клеточных популяций и субпопуляций лейкоцитов человека методом проточной цитометрии.

**Материалы и методы.** В работе использовали МКА к антигену В-лимфоцитов (клон ИКО-180) и флуоресцентный краситель Alexa-488 в форме активного моносукцинимидного эфира. МКА выделяли из асцитной жидкости мышей с привитой внутрибрюшинно гибридомой путем комбинированной очистки иммуноглобулиновой фракции каприловой кислотой и высаливания сульфатом аммония. Для очистки полученных конъюгатов (иммунофлуоресцентных зондов, ИФЗ) применяли гель-фильтрацию на колонке PD-10, концентрацию и плотность мечения ИФЗ определяли спектрофотометрически. Оценку биологической активности полученных ИФЗ проводили с использованием клеток периферической крови доноров в диапазоне концентраций МКА 0,5–100 мкг/мл. Определение рабочего титра ИФЗ проводили по методу титрования антител, предложенному C.C. Stewart.

**Результаты.** Экспериментально установлено оптимальное время инкубирования МКА с флуорофором. Получена панель ИФЗ с различной плотностью мечения Alexa-488. Для этого варьировали молярное соотношение МКА и флуорофора в среде реакции конъюгирования от 1:2 до 1:100. Оптимальная плотность мечения ИФЗ находится в диапазоне 5–13,5 М:М, концентрация антител — в диапазоне 5–25 мкг/мл. Для ИФЗ из МКА ИКО-180 с Alexa-488 такие высокие значения плотности мечения не приводят к снижению эффективности флуоресценции и антигенсвязывающей способности. Сравнительная характеристика специфической активности ИФЗ на основе МКА ИКО-180 и коммерческих ИФЗ (BD Biosciences) показала сопоставимые результаты.

**Заключение.** Оптимальными условиями для мечения МКА ИКО-180 красителем являются: карбонатный буфер с pH 8,3, концентрация антител в реакционной смеси 1 мг/мл, количество активного красителя 10–100 ммоль на 1 ммоль белка, время инкубирования 90 мин при температуре 18–25 °C.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела, проточная цитометрия, иммунофлуоресцентные зонды, Alexa-488, конъюгаты моноклональных антител

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-70-75

## THE TECHNOLOGY OF CREATION AND QUALITY TESTING OF IMMUNOFUORESCENT PROBES WITH DYE ALEXA-488 FOR ANALYSIS OF CELULAR POPULATIONS BY FLOW CYTOMETRY

M.E. Kopyrulina, E.N. Zakharova, T.N. Zabolina, 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.** Fluorescent probes based on monoclonal antibodies (MAb) are widely used in scientific and clinical research in the field of oncology, hematology, immunology, epidemiology.

**Objective:** to create of fluorescent probes based on the MAb and the fluorescent dye Alexa-488 for the analysis of cellular populations by flow cytometry.

**Materials and methods.** MAb to B lymphocyte antigen (clone ICO-180), fluorescent dye Alexa-488 were used in the work. MAb was isolated from ascitic fluid by combined purification of the immunoglobulin fraction with caprylic acid and salting out with ammonium sulfate. Gel filtration on a PD-10 column was used to purify the conjugates (immunofluorescent probes, IFP), the concentration and labeling density of the IFP were determined spectrophotometrically. The determination of the working titer of the IFP was performed using the antibody titration method proposed by C.C. Stewart.

**Results.** The optimal time of incubation of MAb with a fluorophore was experimentally determined. The optimal conditions for labeling MAb of the ICO series with the dye are: a carbonate buffer with pH 8,3, the concentration of antibodies in the reaction mixture is 1 mg/ml, molar ratio of active dye — 10–100 mmol per 1 mmol of protein, the incubation time is 90 minutes, the temperature is 18–25 °C. We obtained a panel of conjugates of MAb with Alexa-488, differing in their different labeling densities. Evaluation of the biological activity of the resulting conjugates was carried out on peripheral blood cells of donors in the concentration range of MAb 0,5–100 µg/ml.

**Conclusion.** The optimal conditions for labeling MAb of the ICO series with the dye are: a carbonate buffer with pH 8,3, the concentration of antibodies in the reaction mixture is 1 mg/ml, the incubation time is 90 minutes, the temperature is 18–25 °C. The optimum density of labeling is in the range 5–13,5 M:M, the optimal concentration of antibodies is in the range of 5–25 µg/ml.

**Key words:** monoclonal antibodies, flow cytometry, fluorescent probes, Alexa-488, monoclonal antibodies conjugates

## Введение

В настоящее время установлено, что иммунная система способна распознавать опухоль и генерировать как локальный, так и системный иммунный ответ, направленный на подавление опухолевого роста [1].

Оценка состояния иммунной системы онкологических больных проводится на основании субпопуляционного состава клеток периферической крови (посредством иммунофенотипирования) и анализа функциональной активности иммунокомпетентных клеток [2]. Иммунофенотипирование выполняют методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (МКА) к дифференцировочным антигенам лейкоцитов. Возможности этого метода прямо зависят от разнообразия и свойств применяемых иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ), которые получают посредством химического конъюгирования специфических для отдельных антигенов МКА с молекулами флуорофоров. Выбор пригодных для цитометрического анализа флуорофоров прямо связан с конструкцией цитометра, в первую очередь с длиной волны возбуждающего флуоресценцию лазера, а также со спектральными диапазонами каналов регистрации флуоресцентного сигнала. Жесткие характеристики допустимых длин волн возбуждающего и регистрируемого света существенно ограничивают перечень флуорофоров, пригодных для изготовления ИФЗ. Традиционно для получения ИФЗ используют низкомолекулярный флуоресцеин (в виде активного изотиоцианатного производного FITC), а также флуоресцентные белки растительного происхождения фикоэритрин и аллофикоцианин. Таким же требованиям к их спектральным характеристикам соответствуют некоторые синтетические красители, полученные основателем компании Molecular Probes (США) R.P. Haugland и известные под общим наименованием Alexa-fluor. Для них характерны устойчивость к «выгоранию» и изменению pH, высокий квантовый выход флуоресценции и гидрофильность [3, 4].

В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии (ранее Российский онколо-

гический научный центр) им. Н.Н. Блохина получены и охарактеризованы МКА серии ИКО, составляющие панель антител к широкому спектру антигенов дифференцировки лейкоцитов человека [5–7]. Эти МКА в течение ряда лет применяются в научных и клинических исследованиях для выполнения как не прямой (с использованием «сэндвича» из нативных первичных МКА и вторичных «проявляющих» ИФЗ — флуоресцентных конъюгатов поликлональных антител к суммарным иммуноглобулинам мыши), так и прямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ).

**Цель настоящего исследования** — создание флуоресцентных зондов на основе МКА и флуоресцентного красителя Alexa-488 для анализа популяций и субпопуляций лейкоцитов человека методом проточной цитометрии.

## Материалы и методы

**Материалы.** В работе использовали: МКА клона ИКО-180 к антигену CD20 В-лимфоцитов человека (аналог фирмы BD Biosciences — leu16) производства ООО «НПЦ МедБиоСпектр» (Россия); контрольную панель составляли ИФЗ производства BD Biosciences (США): CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PE, CD16-FITC, CD20-FITC, CD20-PE; флуоресцентный краситель Alexa-488 производства Invitrogen (США) в форме моносукцинимидного эфира. Максимум поглощения красителя составляет 494 нм, максимум эмиссии — 517 нм, молекулярная масса красителя — 643 Да.

Дополнительные материалы, необходимые для получения ИФЗ: хроматографическая колонка PD-10 (GE Healthcare Life Sciences, США); фосфатно-солевой буфер (ООО «ПанЭко», Россия) готовили по инструкции производителя, pH готового раствора 7,4; азид натрия (Sigma-Aldrich): 10 % водный раствор; диметилсульфоксид (DMSO) (Sigma-Aldrich); лизирующий раствор FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США).

**Доноры.** В качестве исследуемого материала использовали периферическую кровь здоровых лиц в возрасте от 27 до 53 лет (11 женщин, 9 мужчин). Кровь забирали из локтевой вены натошак, в качестве антикоагулянта использовали этилендиаминтетрауксусную кислоту.

**Методы.** МКА получали методом гибридной технологии с использованием ранее созданных линий гибридных клеток, продуцирующих эти антитела. МКА выделяли из асцитной жидкости мышей BALB/c с инокулированной внутрибрюшинно гибридомой, продуцирующей МКА.

МКА выделяли путем комбинированной очистки иммуноглобулиновой фракции с использованием каприловой кислоты и высаливания белка сульфатом аммония.

Для этого точно измеренный объем асцитной жидкости разводили в 5 раз 0,06 М ацетатным буфером (рН 4,0), центрифугировали при ускорении 350 g в течение 10 мин. К надосадочной жидкости медленно (по капле) добавляли каприловую кислоту из расчета 25 мкл на 1 мл супернатанта и инкубировали при постоянном встряхивании в течение 30 мин. Смесь центрифугировали 30 мин при ускорении 350 g и температуре +4 °С. Затем супернатант фильтровали, доводили рН до 7,4 и охлаждали в течение 30 мин в холодильной камере при +6 °С. К охлажденному супернатанту добавляли равный объем насыщенного раствора сульфата аммония, смесь перемешивали и инкубировали в течение 1 ч. Осадок, полученный после центрифугирования смеси (350 g, 10 мин), растворяли и переводили в фосфатно-солевой буфер (рН 7,4) гель-фильтрацией на хроматографической колонке PD-10.

Концентрацию белка ( $C_{IgG}$ ) измеряли спектрометрически и рассчитывали по формуле

$$C_{IgG} = OD_{280} / 1,4,$$

где  $OD_{280}$  — оптическая плотность раствора, измеренная при 280 нм.

В работе использовали спектрофотометр Ultra-spec 3100 pro Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Великобритания).

Оценку биологической активности полученных конъюгатов проводили с использованием клеток периферической крови доноров 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. Несвязавшиеся МКА удаляли 2-кратной отмывкой фосфатно-солевым буфером (рН 7,4) и фиксировали образцы фосфатно-солевым буфером с содержанием 0,4 % формальдегида.

В работе использован проточный двулучевой цитометр FACSCalibur (BD Biosciences, США) с программным пакетом CellQuest. Флуоресценцию учитывали в спектральных диапазонах 512–547 нм (FL1 для FITC, Alexa-488), 575–595 нм (FL2 для фикоэритрина). Для анализа клеточных популяций учитывали также показатели прямого малоуглового и бокового

светорассеивания, на основании которых выполняли гейтирование — программное «выделение» субпопуляции лимфоцитов и дискриминацию иных субпопуляций. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов.

**Статистическая обработка данных.** Использовалось программное обеспечение Sigma Plot 11.0 для Windows. 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

**Получение конъюгатов МКА с флуорофором Alexa-488.** В методической статье создателя флуорофора Alexa-488 и в общем лабораторном руководстве компании Molecular Probes подробно описаны протоколы получения конъюгатов МКА с красителем, в соответствии с которыми следует придерживаться следующих условий проведения реакции: конъюгирование производят в карбонатном буфере (рН 8,3), концентрация МКА в реакционной смеси 1 мг/мл, температура 18–25 °С, время инкубирования 60–90 мин [8, 9]. Оптимальное молярное соотношение белка и красителя следует подбирать эмпирически, исходя из свойств конкретной белковой молекулы.

После внесения в реакционную смесь раствора моносукцинимидного эфира флуорофора до молярного соотношения с белком 40:1 смесь делили на 4 фракции (I, II, III, IV), которые инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, 1 ч, 1,5 ч и 2 ч соответственно. По окончании времени инкубации реакционную смесь немедленно наносили на колонку PD-10 или Sephadex G-25, уравновешенную фосфатно-солевым буфером (рН 7,4), для остановки реакции и отделения ее продуктов от несвязавшегося флуорофора. Спектрофотометрическое исследование очищенных конъюгатов при 2 длинах световых волн позволяет рассчитать плотность мечения и конечную концентрацию белка по формулам, представленным ниже.

Плотность мечения ( $D$  [dye]/ $P$  [protein]) для Alexa Flour-488:

$$D/P = 3,1 \times (OD_{494}) / [OD_{280} - (0,11 \times OD_{494})].$$

Концентрация иммуноглобулина ( $C_{Ig}$ ) в растворе конъюгата:

$$C_{Ig} = OD_{280} - (0,11 \times OD_{494}) / 1,4,$$

где  $OD_{280}$ ,  $OD_{494}$  — оптические плотности раствора, измеренные при 280 и 494 нм соответственно.

Результаты спектрофотометрического анализа представлены в таблице.

Результаты спектрофотометрического исследования ИФЗ

| Образец фракции, +18 °С | D/P | OD <sub>280</sub> | OD <sub>494</sub> |
|-------------------------|-----|-------------------|-------------------|
| I (30 мин)              | 4,5 | 0,411             | 0,514             |
| II (1 ч)                | 6,5 | 0,407             | 0,684             |
| III (1,5 ч)             | 8,1 | 0,438             | 0,889             |
| IV (2 ч)                | 7,9 | 0,443             | 0,882             |

**Примечание.** D/P — плотность мечения; OD<sub>280</sub>, OD<sub>494</sub> — оптические плотности конъюгатов, измеренные при 280 и 494 нм соответственно; ИФЗ — иммунофлуоресцентный зонд.

Для получения ИФЗ с максимальной плотностью мечения необходимо инкубировать МКА с флуорофором в течение 90 мин при комнатной температуре. Увеличение времени инкубации до 2 ч не влияет на степень связывания белка с красителем. ИФЗ с разной плотностью мечения использовали для специфического окрашивания лимфоцитов периферической крови доноров CD20<sup>+</sup>. Все ИФЗ с концентрацией рабочего раствора антител 25 мкг/мл выявляют одинаковое количество антиген-позитивных клеток, однако обнаружено различие параметра S/N (сигнал/шум), рассчитанного как отношение средней интенсивности флуоресценции положительного пика

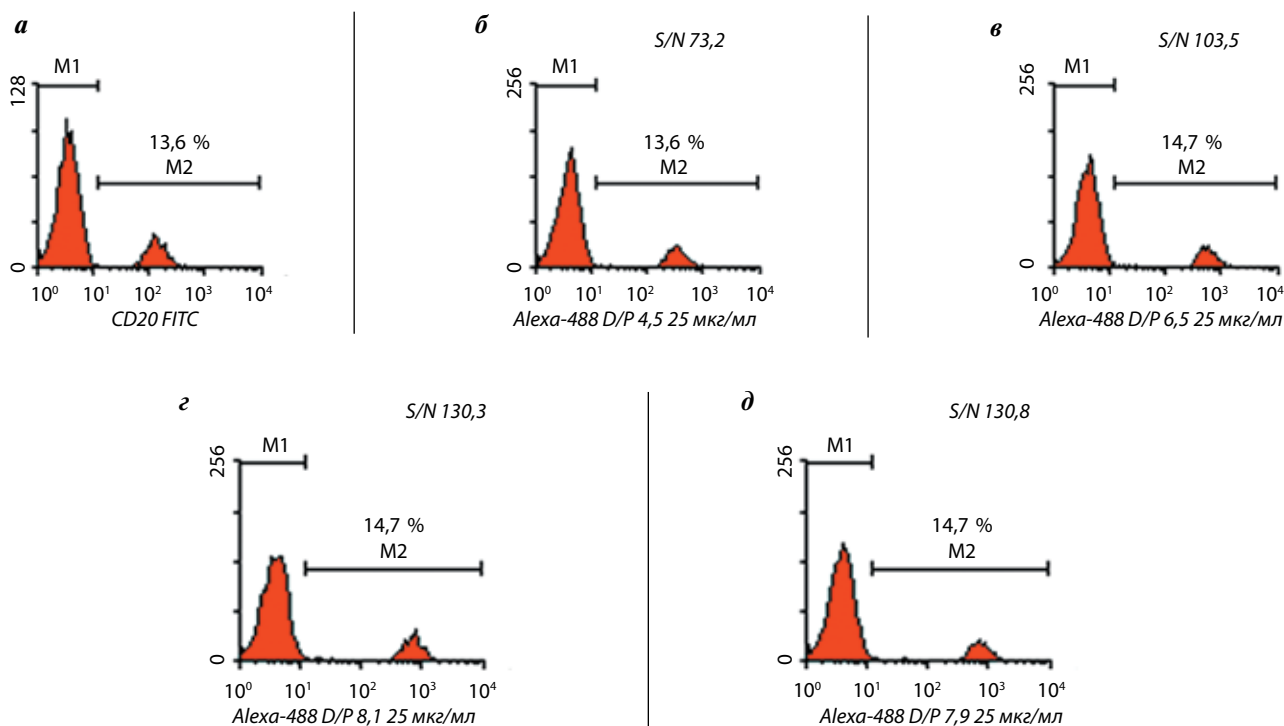
к интенсивности флуоресценции отрицательного пика (рис. 1).

Независимо от условий получения все ИФЗ показали сходную биологическую активность (количество положительных событий в РИФ). При этом регистрируемая интенсивность флуоресценции зависит от плотности мечения.

Для получения корректных и воспроизводимых результатов количественного анализа клеточных популяций в прямой РИФ используемые для нее ИФЗ должны иметь оптимальные характеристики, в том числе плотность мечения и рабочую концентрацию раствора зонда.

Плотность мечения зависит от условий реакции конъюгирования — времени реакции и молярного соотношения ее компонентов. В процессе варьирования соотношениями МКА и красителя в диапазоне от 1:2 до 1:100 М:М при оптимальных условиях, описанных выше, получили панель ИФЗ, значительно различающихся между собой по плотности мечения Alexa-488 — от 3,0 до 13,5 М:М.

Для определения рабочего титра растворов полученных ИФЗ использовали метод титрования антител, предложенный С.С. Stewart [10]. Метод основан на дробном разведении раствора ИФЗ с определением предельного значения фактора разведения, при котором в прямой РИФ еще сохраняется максимальная интенсивность флуоресценции антиген-позитивных клеток. Дальнейшее понижение концентрации



**Рис. 1.** Влияние условий получения ИФЗ на их антигенсвязывающую способность: а — инкубирование с контрольным реагентом CD20/FITC; б — инкубирование 30 мин, +18 °С; в — инкубирование 1 ч, +18 °С; г — инкубирование 1,5 ч, +18 °С; д — инкубирование 2 ч, +18 °С

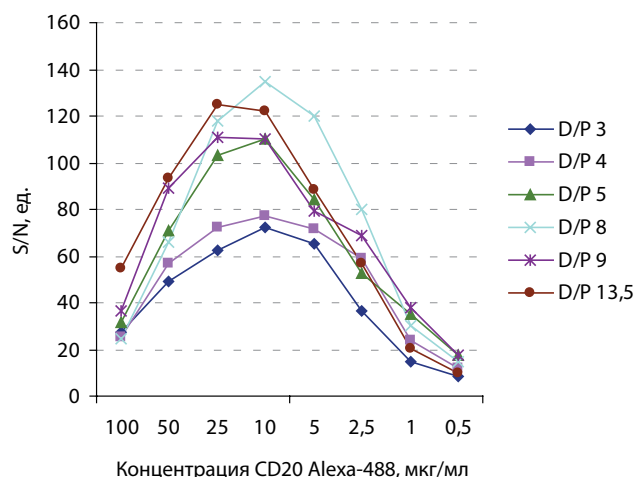


Рис. 2. Зависимость отношения специфического сигнала к шуму ( $S/N$ ) от концентрации раствора ИФЗ с различной плотностью мечения ( $D/P$ )

зондов приводит к смещению антиген-позитивного пика на гистограмме влево и уменьшению соотношения  $S/N$ .

На рис. 2 приведены результаты исследования соотношения  $S/N$  при использовании ИФЗ с различной плотностью мечения в разведениях, соответствующих концентрации МКА в диапазоне 0,5–100 мкг/мл.

Наибольшие значения отношения  $S/N$  характерны для конъюгатов с плотностью мечения в диапазоне 5–13,5:1 М:М.

В случае применения в дальнейшем ИФЗ с плотностью мечения, равной 8:1 М:М, определялись диапазон рабочих концентраций этого зонда и сопоставимость получаемых результатов с результатами цитометрического анализа того же образца крови с использованием контрольного реагента – коммерческого продукта МКА CD20/FITC производства компании BD Biosciences (США). На рис. 3 представлены гистограммы распределения популяции лимфоцитов периферической крови донора, полученные с использованием ИФЗ в диапазоне концентраций 0,5–100 мкг/мл.

В диапазоне концентраций 1–100 мкг/мл гистограммы имеют вид, характерный для выявления на клетках антигена CD20, экспрессированного только на В-лимфоцитах. На гистограмме видно, что снижение концентрации зонда <2,5 мкг/мл приводит к смещению пика специфической флуоресценции (на рис. 3 справа) влево, следовательно, концентрация 2,5 мкг/мл является минимально допустимой для выполнения цитометрического анализа. При концентрациях зонда в диапазоне 5–25 мкг/мл в составе лимфоцитов периферической крови донора выявляется  $\approx 16\%$  клеток CD20<sup>+</sup>, однако величина соотношения  $S/N$  максимальна при концентрации зонда 10 мкг/мл (рис. 4). Цитометрический анализ лимфоцитов того же образца крови, выполненный с ис-

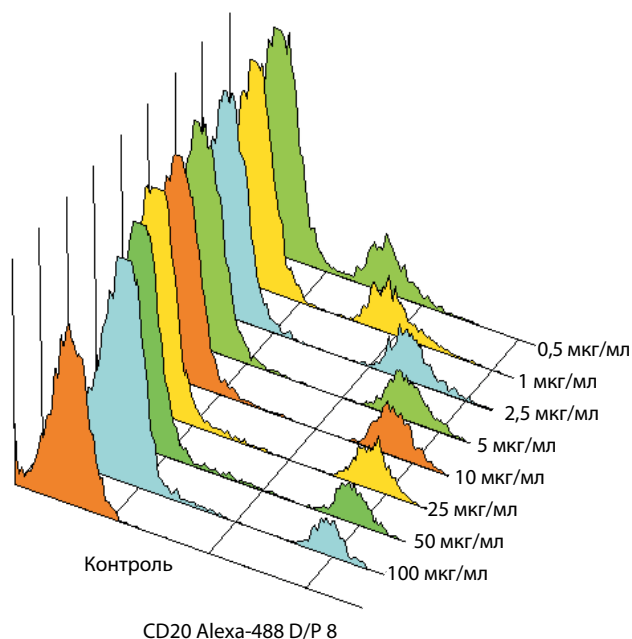


Рис. 3. Гистограммы распределения лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ с плотностью мечения ( $D/P$ ) 8 в диапазоне концентраций 0,5–100 мкг/мл

пользованием контрольного реагента, выявил такое же содержание антиген-позитивных клеток, что подтверждает корректность цитометрического анализа с полученными нами ИФЗ.

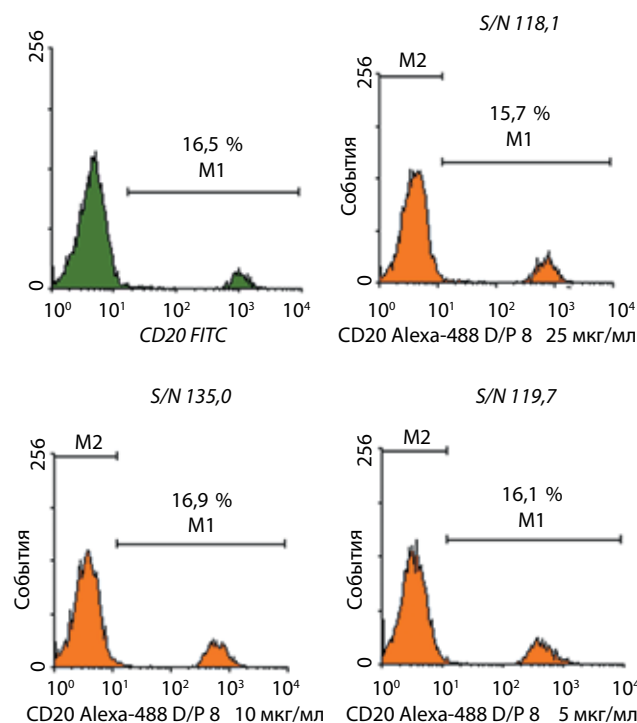


Рис. 4. Гистограммы распределения В-лимфоцитов периферической крови донора с использованием ИФЗ с плотностью мечения ( $D/P$ ) 8 в диапазоне концентраций 5–50 мкг/мл

Таким образом, полученные в результате конъюгирования МКА ИКО-180 с моносукцинимидным эфиром красителя Alexa-488 ИФЗ являются рабочими в диапазоне концентраций 2,5–100 мкг/мл, однако максимальные значения отношения S/N соответствуют концентрациям 5–25 мкг/мл, т. е. они являются оптимальными и рекомендуются для анализа клеточных популяций периферической крови методом проточной цитометрии.

### Заключение

В результате исследования установлено, что использование красителя Alexa-488 для конъюгирования с МКА ИКО-180 позволяет добиться высоких значений плотности мечения (3–13,5:1 М:М), что соответствует ранее полученным данным J.E. Berlier и соавт. [3]. Вместе с тем столь высокие молярные соотношения не приводят к снижению эффективности флуоресценции ИФЗ и потере антигенсвязывающей способности МКА.

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

1. Levy E.M., Roberti M.P., Mordoh J. et al. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J Biomed Biotechnol* 2011;1–11. DOI: 10.1155/2011/676198.
2. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Основные субпопуляции регуляторных лимфоцитов у больных злокачественно меланомой и раком молочной железы. *Иммунология* 2014;35(2):64–7.
3. Berlier J.E., Rothe A., Buller G. et al. Quantitative Comparison of Long-wavelength Alexa Fluor Dyes to Cy Dyes: Fluorescence of the Dyes and Their Bioconjugates. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1699–712. DOI: 10.1177/002215540305101214. PMID: 14623938.
4. Panchuk-Voloshina N., Haugland R.P., Bishop-Stewart J. et al. Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1179–88. DOI: 10.1177/002215549904700910. PMID: 10449539.
5. 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.
6. Королева А.М., Барышников А.Ю., Виха Г.В. и др. Характеристика моноклональных антител ICO-116 к антигену CD16 естественных киллеров. *Биотехнология* 1993;61:11–2.
7. Барышников А.Ю., Блохина Н.Г., Кадагидзе З.Г. Моноклональные антитела ИКО-1 против константной части IA-подобных антигенов. *Экспериментальная онкология* 1984;6:123.
8. Haugland R.P. Antibody conjugates for cell biology. In: *Current protocols in cell biology*. Wiley & Sons, 2001. Unit 16.5.
9. Haugland R.P. *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products*. 9<sup>th</sup> ed. Eugene, OR. Molecular Probes 2002. Section 1.3.
10. Stewart C.C., Stewart S.J. Four colour compensation. *Cytometry* 1999;38(4):161–75. PMID: 10440854.

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ ДОКЛИНИЧЕСКОМ ИЗУЧЕНИИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ВИНКРИСТИНА-РОНЦ И ВИНКРИСТИНА ФИРМЫ TEVA

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

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

Контакты: Татьяна Владимировна Абрамова [togorodnikova@mail.ru](mailto:togorodnikova@mail.ru)

**Введение.** В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в соответствии с российской федеральной программой по импортозамещению зарубежных лекарственных препаратов качественными российскими препаратами был воспроизведен винкристин-РОНЦ (ВК-РОНЦ), который проходил доклинические фармакологические и токсикологические испытания в сравнении с винкристином фирмы Teva производства Израиля (ВК-Teva).

**Цель исследования** — сравнительная патоморфологическая оценка влияния ВК-РОНЦ и ВК-Teva на внутренние органы крыс. **Материалы и методы.** Использовано 50 неинбредных беспородных крыс-самцов, по 10 крыс в группе. Крысам вводили ВК-РОНЦ и ВК-Teva внутривенно ежедневно (в течение 3 дней) в эквитоксических суммарных дозах, соответствующих максимально переносимым дозам (МПД) и 1/2 МПД. Контрольным крысам в том же режиме внутривенно вводили 0,9 % раствор хлористого натрия. Крыс выводили из опыта на 3-и и 30-е сутки после окончания введений препаратов. Проводили макроскопическое и гистологическое исследование внутренних органов по общепринятым методикам, включавшим фиксацию материала в 10 % формалине и окраску срезов гематоксилином и эозином. Микропрепараты внутренних органов анализировали и фотографировали на световом микроскопе при увеличениях 100, 400, 1000.

**Результаты.** ВК-РОНЦ и ВК-Teva в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг на 3-и сутки после окончания введений вызывают во внутренних органах крыс сходные несильно выраженные морфологические изменения: гипоплазию в костном мозге и селезенке, деструктивные изменения в семенниках, очаговые дистрофические изменения в почках и печени отдельных крыс. На 30-е сутки после окончания применения обоих препаратов у некоторых крыс независимо от дозы имели место сходные остаточные морфологические изменения в костном мозге, семенниках, почках и печени.

**Заключение.** На основании полученных результатов макроскопического и гистологического исследований сделан вывод о сходстве влияния ВК-РОНЦ и ВК-Teva на внутренние органы крыс.

**Ключевые слова:** винкристин-РОНЦ, винкристин-Teva, крысы, морфологические изменения, костный мозг

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-76-82

## THE COMPARATIVE PATHOMORPHOLOGIC RESEARCH OF THE INNER ORGANS OF RATS ON THE PRECLINICAL STUDY OF VINCRIStINE-RONC AND VINCRIStINE-TEVA

T. V. Abramova, I. B. Merkulova, N. Yu. Kulbachevskaya, O. I. Konyayeva, N. P. Ermakova, V. A. Chaley, V. M. Bukhman

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

**Introduction.** In accordance with Russian Federal program of import substitution of foreign medicines quality of Russian drugs in the N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, played vincristine-RONC (VC-RONC), which as a drug — the generic's passed preclinical pharmacological and toxicological testing in comparison with foreign firms vincristine Teva of Israel (VC-Teva).

**The aim.** The aim of present study was the comparative pathomorphological evaluation of the effect of VC-RONC and VC-Teva on the internal organs of rats.

**Materials and methods.** Used 50 weinbrenner male rats, at 10 rats per group. VC-RONC and VC-Teva rats were administered intravenously 3 times daily at aquatotoxicity total dose corresponding to the MTD and 1/2 MTD. Control rats in the same regime intravenously administered of 0,9 % sodium chloride solution. Rats were deduced from the experience of 3 and 30 days after the end of administration of the drugs. Conducted macroscopic and histological examination of internal organs by conventional methods, including fixation of the material in 10 % formalin and coloring sections with hematoxylin and eosin. The micropreparations of the internal organs was analyzed under light microscope at magnifications of 100, 400, 1000.

**Results.** VC-RONC, as VC-Teva in cumulative doses of 0,5 and 0,25 mg/kg in 3 days after the end of introductions in the internal organs of rats cause similar slightly pronounced morphological changes: hypoplasia in the bone marrow and spleen, destructive changes

*in the testes, focal degenerative changes in the kidney and liver of individual rats. On the 30<sup>th</sup> day after the application of both drugs, some rats regardless of the dose occurred similar symptoms residual morphological changes in the bone marrow, testes, kidneys and liver.*

**Conclusion.** *Based on the results of macroscopic and histological examination the conclusion about the similarity of the influence of VC-RONC and VC-Teva on the internal organs of rats was made.*

**Key words:** vincristine-RONC, vincristine-Teva, rats, morphological changes, bone marrow

## Введение

Винкристин (ВК) — это препарат растительного происхождения из группы винкаалкалоидов, который обладает противоопухолевой активностью в эксперименте на лейкозных штаммах и некоторых солидных опухолях [1, 2]. ВК применяется в онкологической практике в различных схемах химиотерапии при лечении ряда злокачественных новообразований (острый лимфобластный лейкоз, лимфогранулематоз, нелимфоидные лейкозы, неходжкинские лимфомы, лимфосаркомы, нейробластомы, рак молочной железы и др.) [3, 4].

Механизм действия ВК обусловлен остановкой деления клеток в метафазе вследствие связывания ВК с белком тубулином микротрубочек митотического веретена [3, 5]. В эксперименте в дозах, близких к максимально переносимой дозе (МПД), ВК обладает умеренным токсическим действием на кроветворение у крыс [6]. Побочные эффекты ВК в клинике зависят от дозы и длительности применения. Наиболее выраженными из них являются алопеция и периферические нейропатии; кроме того, могут наблюдаться диарея и запоры, лейко- и тромбоцитопения, нефро- и гепатопатии и др. [3–5].

В онкологической практике используется ВК производства различных фармацевтических компаний, в частности Pharmacia & Upjohn, Pierre Fabre (Франция), Gedeon Richter (Венгерская Республика), Teva (Израиль). Также существуют аналоги ВК: винбластин, велбин, винельбин, винкатера, винкарельбин, винорелбин, маверекс, навельбин, навелек, розевин, жавлор, цитувин.

В соответствии с федеральной целевой программой «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу», направленной также на стимулирование разработки аналогов импортируемых воспроизведенных и инновационных лекарственных препаратов [7], в Научно-производственном филиале «Наукопрофи» (руководитель С.В. Копачевская) ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России воспроизведена лекарственная форма ВК-РОНЦ. В лаборатории фармакологии и токсикологии (руководитель Н.Ю. Кульбачевская) проведено доклиническое токсикологическое изучение ВК-РОНЦ по сравнению с ВК-Teva [6]. На основании результатов данного исследования установлено,

что ВК-РОНЦ и ВК-Teva по показателям как острой, так и субхронической токсичности практически идентичны [6]. Патоморфологическое исследование внутренних органов крыс при изучении субхронической токсичности ВК-РОНЦ является конечным этапом доклинического исследования и проводилось в сравнении с применяемым в клинике препаратом ВК-Teva [10]. Исследование проведено в соответствии с требованиями по доклиническому изучению новых противоопухолевых препаратов и в соответствии с требованиями по доклиническому изучению воспроизведенных препаратов [8].

## Материалы и методы

Для патоморфологического исследования использовано 50 неинбредных крыс-самцов, которых поделили на 5 групп (по 10 крыс в каждой). В первые 2 группы включили крыс, которым ежедневно в течение 3 дней внутривенно (в/в) вводили ВК-РОНЦ в разовых дозах 0,17 и 0,08 мг/кг и в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг соответственно. В 3-й и 4-й группах крысам ежедневно в течение 3 дней в/в вводили ВК-Teva в тех же разовых и суммарных дозах. В качестве растворителя для ВК использовался 0,9 % раствор хлористого натрия. Контрольной, 5-й группе ежедневно в течение 3 дней в/в вводили только 0,9 % раствор хлористого натрия. На 3-и и 30-е сутки по 5 крыс из каждой группы выводили из опыта методом усыпления диэтиловым эфиром. На вскрытии проводили наружный осмотр и макроскопическое исследование внутренних органов. Для гистологического исследования у крыс из каждой группы были взяты участки головного мозга, сердца, легких, печени, желудка, поджелудочной железы, тонкого и толстого кишечника, почек, мочевого пузыря, тимуса, селезенки, лимфатических узлов брыжейки, семенников, надпочечников, щитовидной железы, гипофиза. Материал подвергали общепринятой гистологической обработке, включавшей фиксацию участков органов в 10 % нейтральном формалине, промывку в проточной воде, обезживание в спиртовых растворах, пропитку в хлороформе и парафине, заливку в парапласт, резку парафиновых блоков на микротоме. Срезы толщиной 5 мкм после депарафинирования окрашивали гематоксилином и эозином, заключали в канадский бальзам. Гистологические препараты анализировали и фотографировали при увеличениях

100, 400, 1000, используя микроскоп фирмы Leica DM1000 (Германия) со специализированным программным обеспечением регистрации изображения цифровой камерой Leica.

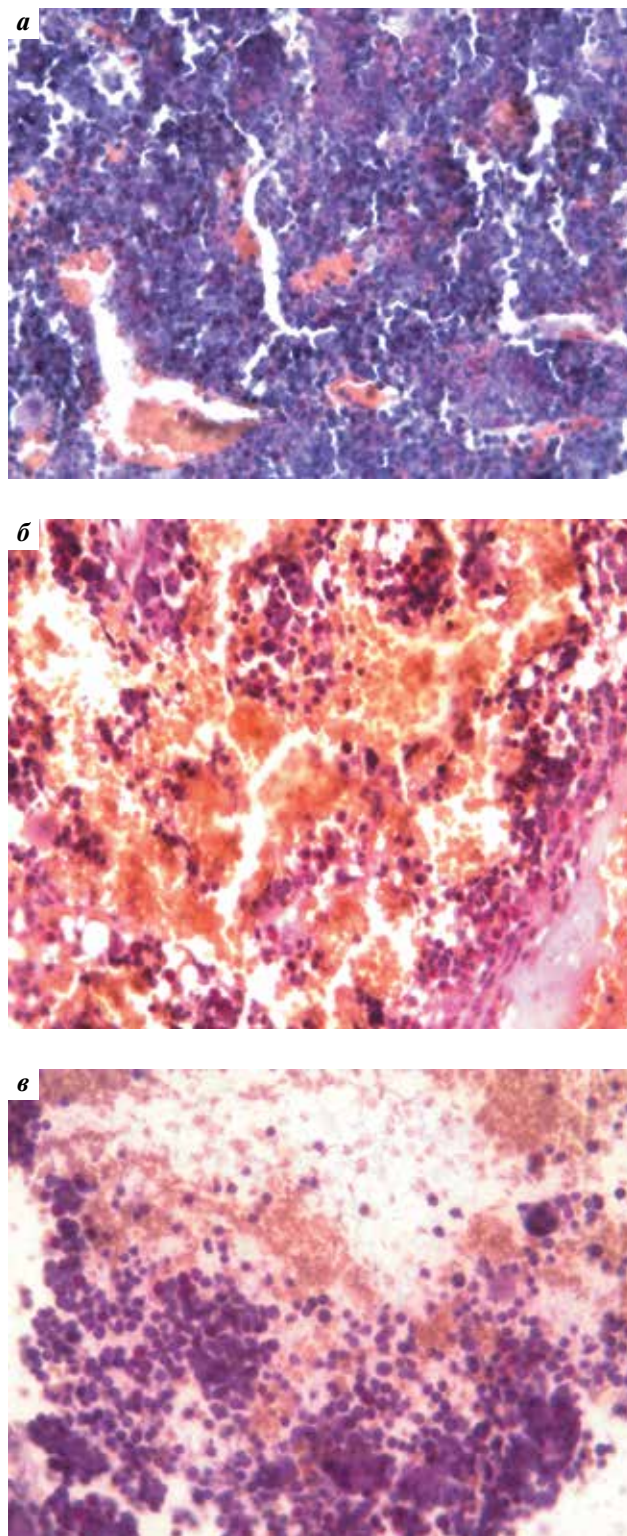
### Результаты

**Патоморфологическое исследование внутренних органов крыс на 3-и и 30-е сутки после окончания в/в введения 0,9 % раствора хлористого натрия.** При наружном осмотре и макроскопическом исследовании внутренних органов крыс контрольной группы на 3-и и 30-е сутки после окончания введений 0,9 % раствора хлористого натрия видимые изменения не обнаружены; макроскопическая картина внутренних органов не отличалась от макроскопической картины, обычно наблюдаемой у интактных лабораторных крыс.

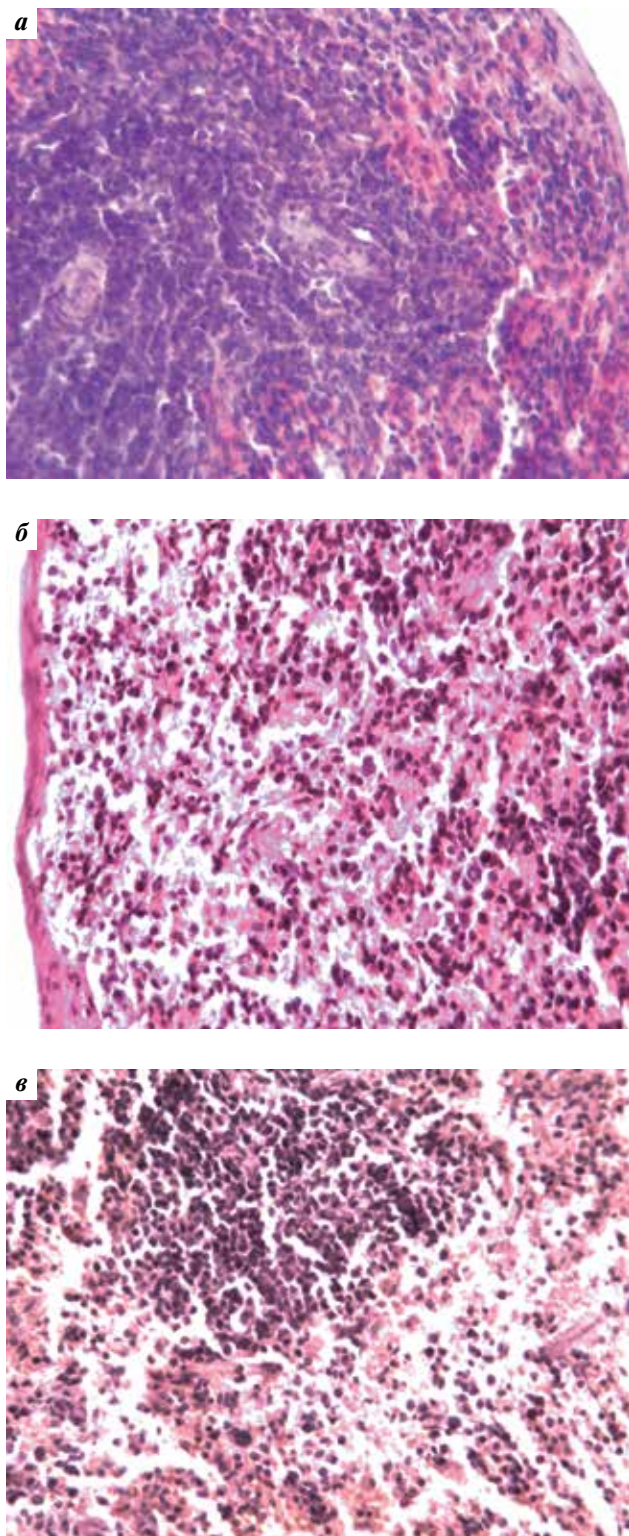
При гистологическом исследовании морфологических особенностей внутренних органов крыс контрольной группы на 3-и и 30-е сутки после окончания введений 0,9 % хлористого натрия патологические изменения не выявлены, обнаруживались некоторые индивидуальные морфологические особенности, не выходявшие за рамки особенностей, обычно наблюдаемых у интактных крыс, которые учитывались при гистологическом анализе внутренних органов крыс, получавших ВК-РОНЦ и ВК-Teva.

**Патоморфологическое исследование внутренних органов крыс на 3-и и 30-е сутки после окончания в/в введения препаратов ВК-РОНЦ и ВК-Teva в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг.** При наружном осмотре крыс на 3-и сутки после окончания введения ВК-РОНЦ и ВК-Teva в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг видимые изменения не обнаружены. При макроскопическом исследовании внутренних органов крыс отмечали, что у одной крысы из каждой группы была сильно уменьшена селезенка. Кроме того, у всех крыс, получивших оба препарата в суммарной дозе 0,5 мг/кг, отмечали участки вздутия в тонкой и толстой кишках.

На 3-и сутки после окончания введений ВК-РОНЦ и ВК-Teva в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг в отдельных или в нескольких органах у каждой крысы в группе обнаружены умеренно выраженные морфологические изменения в костном мозге, селезенке и семенниках, при этом характер и глубина изменений в данных органах существенно не зависели от величины суммарной дозы. Так, в костном мозге у 2 крыс, получивших ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,5 мг/кг, и у 2 крыс, получивших ВК-Teva в той же суммарной дозе, отмечали снижение количества рыхло расположенных гемопоэтических клеток — островки ядро-содержащих клеток располагались среди тонкостенных капилляров и скоплений эритроцитов (рис. 1а—в). В костном мозге у 2 крыс, получавших ВК-РОНЦ



**Рис. 1.** Морфологические изменения в костном мозге крыс на 3-и сутки после применения ВК-РОНЦ и ВК-Teva в суммарной дозе 0,5 мг/кг: а — после применения 0,9 % раствора хлористого натрия (контроль); б — после применения ВК-РОНЦ: уменьшенное содержание рыхло расположенных кроветворных клеток среди крови; в — после применения ВК-Teva: уменьшенное содержание рыхло расположенных кроветворных клеток среди крови. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$



**Рис. 2.** Морфологические изменения в селезенке крыс на 3-и сутки после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: а — после применения 0,9 % раствора хлористого натрия (контроль); б — после применения ВК-РОНЦ: уменьшенное содержание ядросодержащих клеток в красной пульпе; в — после применения ВК-Тева: уменьшенное содержание ядросодержащих клеток в красной пульпе и лимфоцитов в лимфатическом фолликуле. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

и ВК-Тева в суммарной дозе 0,25 мг/кг, также отмечалось уменьшение содержания рыхло расположенных гемопоэтических клеток.

В селезенке у 1 крысы после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,5 мг/кг и у 1 крысы из группы сравнения произошли изменения площади красной пульпы и количества ядросодержащих клеток крови. Некоторое снижение ядросодержащих клеток крови в красной пульпе и содержания лимфоцитов в лимфоидных фолликулах белой пульпы отмечено также у 1 крысы после применения ВК-РОНЦ в дозе 0,25 мг/кг и у 1 крысы после применения ВК-Тева в той же дозе (рис. 2а–в).

При суммарной дозе 0,5 мг/кг ВК-РОНЦ и ВК-Тева у 2 крыс из каждой группы сравнения в срезах семенных канальцев наряду с неповрежденным сперматогенным эпителием, клетки которого находятся на разных стадиях сперматогенеза, выявлены очаги деструкции и уменьшения числа клеток сперматогенного эпителия; во многих срезах отсутствуют поздние стадии сперматогенеза (рис. 3а–в). Сходная морфологическая картина отмечена при суммарной дозе 0,25 мг/кг ВК-РОНЦ и ВК-Тева.

Кроме вышеописанных морфологических изменений у единичных крыс на 3-и сутки после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг отмечали несильно выраженные изменения в тимусе, почках, печени.

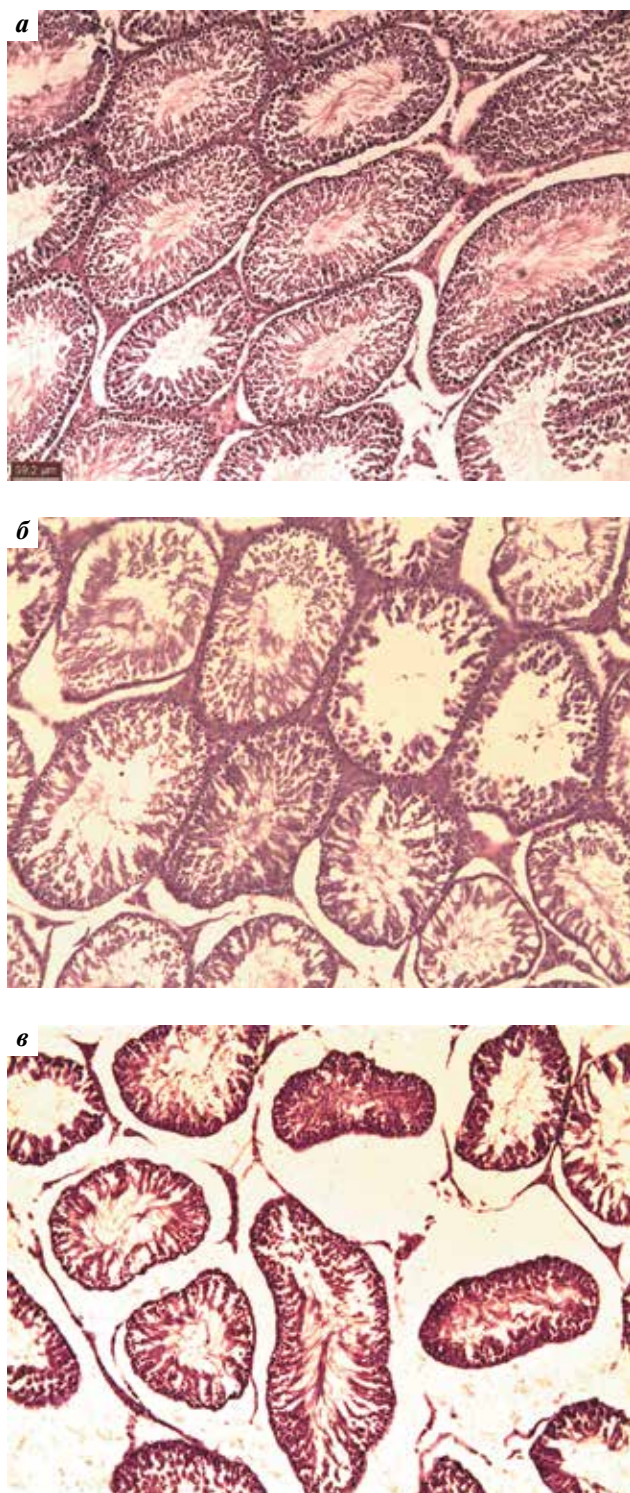
В тимусе у 1 крысы после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,5 мг/кг и у 1 крысы после применения ВК-Тева в суммарной дозе 0,25 мг/кг отмечено некоторое уменьшение плотности расположения лимфоидных клеток в корковой зоне.

В почках у 1 крысы после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,25 мг/кг и у 1 крысы после применения ВК-Тева в той же дозе в корковом веществе вблизи мозгового вещества обнаружены участки дистальных канальцев с признаками вакуолизации и некоторой деструкции эпителиальных клеток (рис. 4а–в).

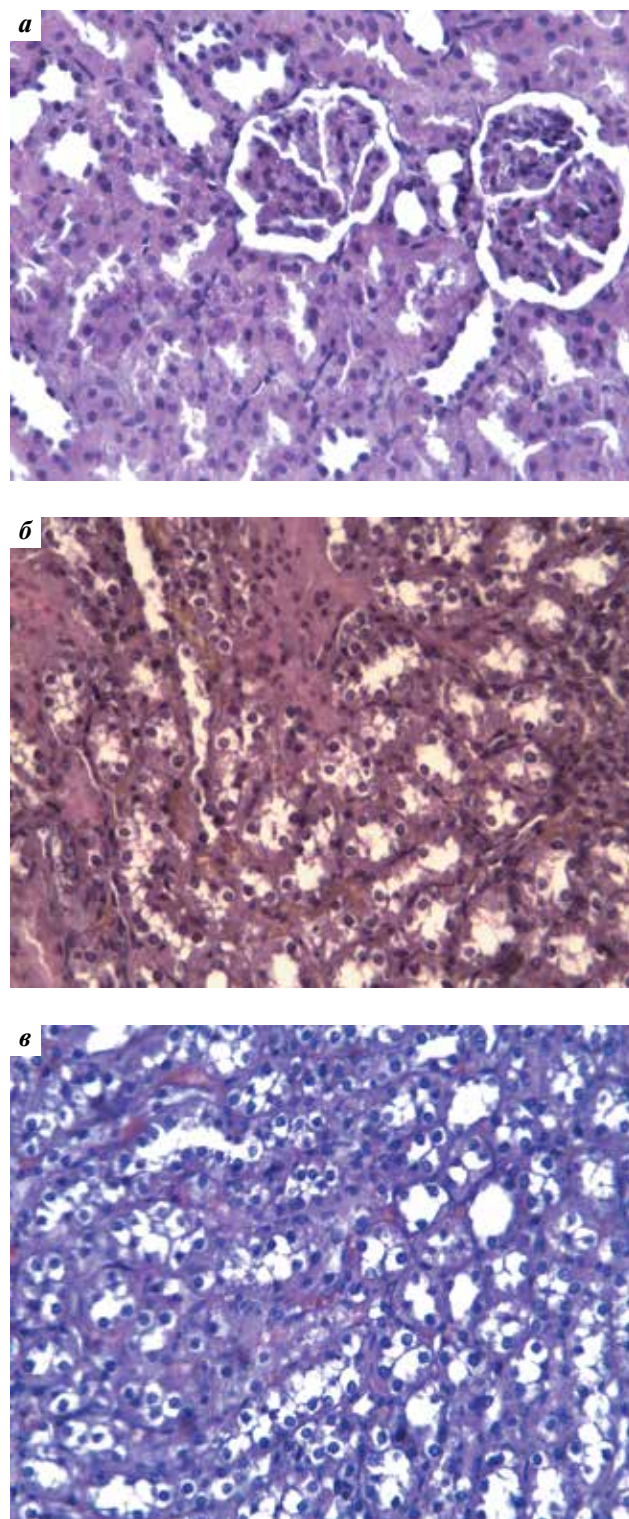
В печени морфологические изменения в этот срок были обнаружены у 2 крыс после применения ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг и имели вид очагов гепатоцитов с мелкокапельной вакуолизированной цитоплазмой (вакуольная дистрофия). В остальных исследованных внутренних органах крыс изменения не выражены, морфологическая картина соответствовала контролю.

При наружном осмотре и макроскопическом исследовании внутренних органов крыс на 30-е сутки после окончания введения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг видимые изменения не обнаружены.

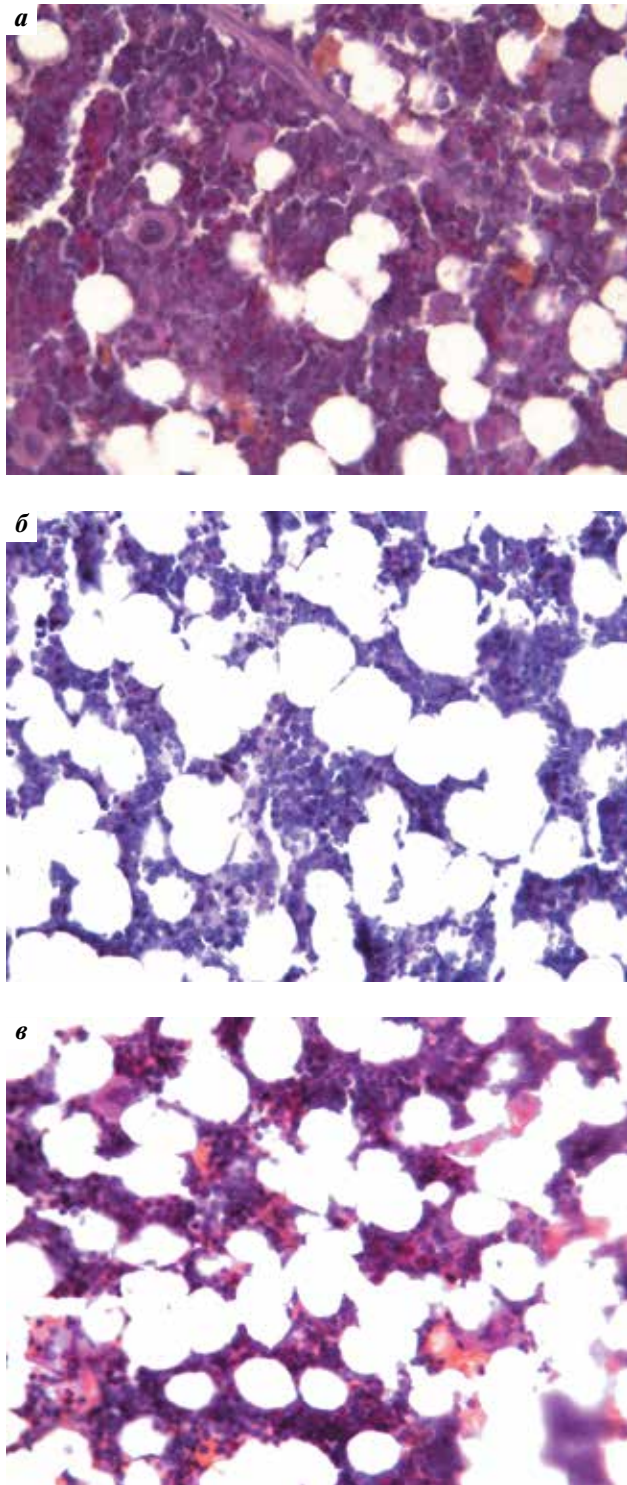
На 30-е сутки после введения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг в отдельных



**Рис. 3.** Морфологические изменения в семенниках крыс на 3-и сутки после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарных дозах 0,25 и 0,5 мг/кг: а — после применения 0,9 % раствора хлористого натрия (контроль): в срезах семенных канальцев клетки сперматогенного эпителия на разных стадиях сперматогенеза; б — после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,25 мг/кг: деструкция и гибель клеток сперматогенного эпителия в отдельных срезах семенных канальцев; в — после применения ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: отек стромы, деструкция и гибель клеток сперматогенного эпителия в срезах семенных канальцев. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$



**Рис. 4.** Морфологические изменения в почках крыс на 3-и сутки после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: а — после применения 0,9 % раствора хлористого натрия (контроль): извитые и прямые канальцы без изменений; б — после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,5 мг/кг: повреждение (вакуолярная дистрофия) клеток дистальных извитых и прямых канальцев; в — после применения ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: повреждение (вакуолярная дистрофия) клеток дистальных извитых и прямых канальцев. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$



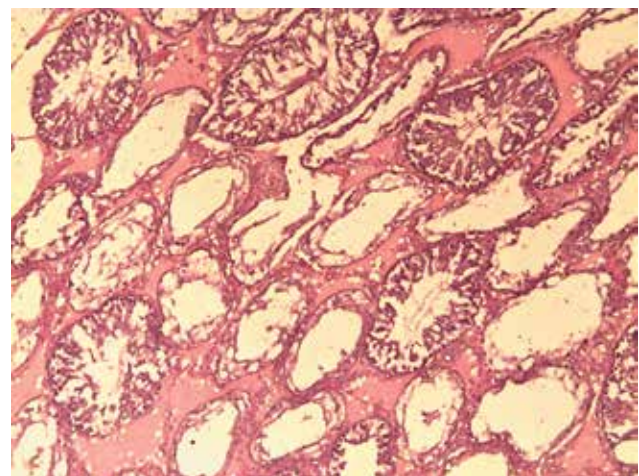
**Рис. 5.** Морфологические изменения в костном мозге крыс на 30-е сутки после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: а — после применения 0,9 % раствора хлористого натрия (контроль): среди кроветворных клеток в небольшом числе видны жировые клетки; б — после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,5 мг/кг: среди островков кроветворных клеток, находящихся на разных стадиях гемопоэза, большое число жировых клеток; в — после применения ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: среди островков кроветворных клеток, находящихся на разных стадиях гемопоэза, большое число жировых клеток. Окраска гематоксилином и эозином,  $\times 400$

органах некоторых крыс сохранялись признаки остаточных морфологических изменений. Исключение составила селезенка, в которой обнаруженные ранее морфологические изменения после применения сравниваемых препаратов в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг полностью исчезали.

В костном мозге у 2 крыс из каждой группы после введения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг, а также у 1 крысы из каждой сравниваемой группы после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарной дозе 0,25 мг/кг отмечали признаки восстановления кроветворения, но среди островков гемопоэтических клеток, находящихся на разных стадиях гемопоэза, обнаруживались участки замещения гемопоэтических клеток жировыми клетками (рис. 5а–в).

В семенниках 2 крыс из каждой группы после применения ВК-РОНЦ и ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг среди срезов семенных канальцев, находящихся на разных стадиях сперматогенеза, сохранялись отдельные срезы семенных канальцев со сниженным содержанием клеток сперматогенного эпителия или их отсутствием, что может свидетельствовать о неполном восстановлении. Кроме того, отмечено неполное восстановление в семенниках 2 крыс после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,25 мг/кг и у 3 крыс после применения ВК-Тева в той же суммарной дозе в виде очагов деструктивных и атрофических изменений сперматогенного эпителия (рис. 6).

Несмотря на то что изменения в печени крыс после применения ВК-РОНЦ на 3-и сутки не были выражены, на 30-е сутки в печени 1 крысы после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,5 мг/кг и 1 крысы после применения ВК-РОНЦ в суммарной дозе 0,25 мг/кг обнаружены отдельные участки, состоящие из гепатоцитов с вакуолизированной



**Рис. 6.** Семенник крысы на 30-е сутки после применения ВК-Тева в суммарной дозе 0,5 мг/кг: участок атрофии сперматогенного эпителия в срезах семенных канальцев,  $\times 400$

мелкокапельной цитоплазмой. Изменений в печени крыс после применения ВК-Teva в этот срок не было. Ранее наблюдавшиеся изменения в почках крыс после применения обоих сравниваемых препаратов в этот срок сохранялись лишь после применения ВК-Teva в суммарной дозе 0,5 мг/кг у 2 крыс и у 1 крысы после этого же препарата в суммарной дозе 0,25 мг/кг в виде небольших очагов дистальных извитых канальцев с признаками вакуольной дистрофии. В остальных исследованных внутренних органах крыс какие-либо морфологические изменения не обнаружены.

### Заключение

При макроскопическом исследовании внутренних органов крыс, получивших в/в ВК-РОНЦ и ВК-Teva в суммарных дозах 0,5 и 0,25 мг/кг, обнаружены сходные макроскопические особенности: у некоторых крыс отмечали уменьшенную селезенку и небольшое вздутие тонкого и толстого кишечника, которые исчезали к 30-м суткам. При гистологическом исследовании на 3-и сутки после окончания введений ВК-РОНЦ и ВК-Teva в дозах, соответствующих МПД и 1/2 МПД, умеренные морфологические изменения отмечены в каждой группе у каждой крысы в одном или в нескольких внутренних органах. В целом органы-мишени (костный мозг, селезенка, семенники, тимус, а также печень и почки) для сравниваемых препаратов были аналогичными.

Кроме того, характер и степень морфологических изменений в этих органах также одинаковы. Дозовая зависимость морфологических изменений для ВК-РОНЦ и ВК-Teva оказалась слабой. Морфологические изменения в печени и почках были менее выраженными и очаговыми и выявлялись в разные сроки при применении ВК-РОНЦ и ВК-Teva. Характер обратимости морфологических изменений во внутренних органах крыс для ВК-РОНЦ и ВК-Teva к 30-м суткам также был сходным. Следует отметить, что морфологическое исследование костного мозга и селезенки под влиянием ВК-РОНЦ и ВК-Teva на 3-и сутки коррелирует с показателями периферической крови и средней массы селезенки, которые для сравниваемых препаратов были сходными и выражались в умеренной лейкопении и уменьшении средней массы селезенки [6], что также отражено в отчете лаборатории фармакологии и токсикологии по доклиническому сравнительному изучению острой и субхронической токсичности ВК-РОНЦ.

Макроскопическое и гистологическое исследования показали, что оба препарата — ВК-РОНЦ и ВК-Teva в эквитоксических суммарных дозах, соответствующих МПД и 1/2 МПД, вызывали одинаковые умеренные морфологические изменения во внутренних органах крыс. Результаты патоморфологического исследования свидетельствуют об аналогичном влиянии ВК-РОНЦ и ВК-Teva на внутренние органы крыс.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Armstrong J.G. Vincristine (NSC-67574) symposium — summary and prospectives. *Cancer Chemother Rep* 1968;52(4):527–34.
2. Система создания противоопухолевых препаратов в СССР и США. Предклиническое исследование противоопухолевых препаратов. Новые противоопухолевые лекарственные средства. Под ред. Н.Н. Блохина и Ч.Г. Зуброда. М.: Медицина, 1977. С. 181–201.
3. Лекарственные и диагностические средства, применяемые в онкологической практике. Под ред. В.А. Чернова. М.: Медицина, 1982. С. 76–78.
4. Переводчикова Н.И. Клинико-фармакологическая характеристика противоопухолевых средств. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2011. С. 30–40.
5. Купчан Д.З. Характеристика отдельных противоопухолевых препаратов. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2011. С. 72–119.
6. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Сравнительное токсикологическое изучение отечественного воспроизведенного винкристина и винкристина фирмы Teva. Материалы XIII конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». Москва, 2016 г. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):56.
7. Денисова М.Н., Пархоменко Д.В. Дженирики и их место в лекарственном обеспечении. Медицинские технологии. Оценка и выбор 2012;2:94–9.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд. М.: Медицина, 2005. С. 170–204.

# МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ТЕТРА-3-ФЕНИЛТИОФТАЛОЦИАНИНА ГИДРОКСИАЛЮМИНИЯ И ИЗУЧЕНИЕ ЕЕ МУТАГЕННЫХ И ИММУНОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

А.В. Ланцова, Л.Л. Николаева, Н.А. Оборотова, Е.В. Санарова, О.Л. Орлова, Н.В. Голубцова,  
А.А. Рудакова, З.А. Соколова, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Л.Р. Тилова

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

Контакты: Людмила Леонидовна Николаева [alima91@yandex.ru](mailto:alima91@yandex.ru)

**Введение.** Применение липосом в качестве систем доставки лекарственных средств в организм человека сегодня является признанным подходом к повышению эффективности лечения. По сравнению с другими наноразмерными носителями липосомы отличаются высокой биосовместимостью. Однако в литературных источниках имеется ряд данных об иммуногенности некоторых липосомальных препаратов. Проявления реакции гиперчувствительности средней и тяжелой степени отмечены у части пациентов при внутривенном введении липосом Doxil®, Ambisome®, DaunoXome®. Технология производства липосом — достаточно трудоемкий процесс, поэтому получение липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) в промышленных масштабах для проведения доклинических и клинических исследований проблематично для исследователей и производителей всего мира. В связи с этим актуальным представляется проведение исследований специфической токсичности липосомальных препаратов и масштабирования технологии получения липосом.

**Цель исследования** — оценка качества опытных образцов ЛЛФ на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия, полученных по масштабированной технологии, в сравнении с образцами, произведенными в лабораторных условиях, а также изучение их мутагенных и иммунотоксических свойств.

**Объект исследования** — тетра-3-фенилтиофталоцианин гидроксиалюминия липосомальный, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 1,5 мг, во флаконах вместимостью 20 мл.

**Материалы и методы.** В работе использовались метод Бенгема, экструзия, стерилизующая фильтрация, лиофилизация; тест на нарушение целостности межклеточных контактов (на промоторную активность), бактериальный тест Эймса, цитогенетическое исследование по учету хромосомных aberrаций, тест на способность вызывать повреждение ДНК (тест ДНК-комет), метод Эрне; реакция гиперчувствительности замедленного типа, определение массы и клеточности центральных и периферических органов иммунитета, оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.

**Результаты.** По результатам проведенных исследований масштабирована технология получения ЛЛФ, позволяющая получать до 400 флаконов ЛЛФ за один производственный цикл. Установлено, что ЛЛФ в дозах 6 и 24 мг/кг не увеличивает количество хромосомных аномалий у мышей и не вызывает повреждений ДНК, в дозах 1, 1–22,0 мг/чашка не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса, в диапазоне концентраций 0,062–3,1 мкг в тесте на промоторную активность не разобщает межклеточные контакты. Определено, что ЛЛФ в дозах 6 и 12 мг/кг при 1-кратном внутривенном введении не оказывает влияния на гуморальный и клеточный иммунные ответы, не изменяет массу и клеточность центральных и периферических органов иммунной системы. ЛЛФ через 24 ч после введения в дозах 6 и 12 мг/кг дозозависимо снижает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, которая восстанавливается через 7 сут.

**Заключение.** Масштабирована технология получения ЛЛФ. В исследуемых дозах установлено отсутствие у ЛЛФ способности промотировать процесс канцерогенеза и влиять на гуморальный и клеточный иммунные ответы.

**Ключевые слова:** липосомальная лекарственная форма тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия, масштабирование производства, мутагенные свойства, иммунотоксичность

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-83-94

## SCALING OF THE TECHNOLOGY OF OBTAINING THE HYDROXYALUMINIUM TETRA-3-PHENYLTHIO- PHTHALOCYANINE LIPOSOMAL FORM AND STUDYING ITS MUTAGENIC AND IMMUNOTOXIC PROPERTIES

A. V. Lantsova, L. L. Nikolaeva, N. A. Oborotova, E. V. Sanarova, O. L. Orlova, N. V. Golubtsova, A. A. Rudakova,  
Z. A. Sokolova, K. I. Kirsanov, E. A. Lesovaya, L. R. Tilova

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

**Background.** The use of liposomes as drug delivery systems today is a recognized approach to improving the effectiveness of treatment. Compared with other nanosized carriers, liposomes are highly biocompatible. However, in the literature, there are a number of data on the immunogenicity of some liposomal drugs. Hypersensitivity reactions of moderate to severe severity were noted in some patients with intravenous administration of liposomes Doxil®, Ambisome®, DaunoXome®. The technology of production of liposomes is a laborious process and obtaining liposomal forms on an industrial scale is problematic for researchers and manufacturers around the world. In connection with this, studies on the scaling up of technology for obtaining liposomes and studying the specific toxicity of liposomal preparations are relevant.

**Objective** — evaluation of the quality of prototypes of liposomal dosage form based on tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxyaluminum obtained by scaled technology in comparison with samples produced in laboratory conditions, as well as studying their mutagenic and immunotoxic properties.

**Object of the study** — tetra-3-phenylthiophthalocyanine hydroxyaluminum liposomal, lyophilizate for the preparation of injection for injection of 1,5 mg, in bottles with a capacity of 20 ml (LLF).

**Materials and methods.** Bengem's method, extrusion, sterilizing filtration, lyophilization, intercellular contact integrity test (for promoter activity), Ames bacterial test, cytogenetic study of chromosomal aberrations, DNA damage test (DNA comet test), Erne method; hypersensitivity reaction of delayed type, determination of mass and cellness of central and peripheral immunity organs, evaluation of phagocytic activity of peritoneal macrophages.

**Results.** Based on the results of the research, the LLF production technology is scaled, which allows obtaining up to 400 LLF flasks per production cycle. It has been established that LLF at doses of 6 and 24 mg/kg does not cause an increase in the number of chromosomal abnormalities in mice and does not cause DNA damage, in doses of 1, 1–22,0 µg/dish LLF does not show mutagenic activity in the Ames bacterial test, in the range concentrations of 0,062–3,1 µg in the test for promoter activity does not separate intercellular contacts. It is determined that in doses of 6 and 12 mg/kg, LLF does not affect humoral and cellular immunity, does not change the mass and cellularity of the central and peripheral organs of the immune system. LLF, 24 hours after administration at doses of 6 and 12 mg/kg, dose-dependently decreases the phagocytic activity of peritoneal macrophages, which is restored after 7 days.

**Conclusion.** The technology of LLF production is scaled. In the doses studied, it was found that LLF does not have the ability to promote the process of carcinogenesis and the lack of influence on the humoral and cellular immune response.

**Key words:** hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine liposomal form, production scaling, mutagenic properties, immunotoxicity

## Введение

Применение липосом в качестве систем доставки лекарств в организм человека сегодня является признанным подходом к повышению эффективности лечения, особенно в онкологической практике. В основе эффекта накопления (пассивного транспорта) частиц размером 50–150 нм в опухолях лежит дефектная архитектура образующейся *de novo* сосудистой системы — явление повышенной проницаемости капилляров и нарушенного лимфатического дренажа [1].

В НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разрабатываются липосомальные препараты, получаемые методом включения активной субстанции в состав липидного бислоя. К преимуществам такого подхода в сравнении с инкапсулированием во внутренний объем относят возможность создания наносистем с приемлемой емкостью загрузки для широкого спектра веществ (в частности, для гидрофобных), уменьшение потерь препарата в кровотоке и при слиянии с клеткой, упрощение самой процедуры получения липосом, а также облегчение их внутриклеточной разгрузки за счет прямого трансмембранного переноса лекарства.

Наносистемы способны уменьшить токсичность химиотерапевтических средств с узким терапевтическим индексом, однако ряд данных *in vivo* и *in vitro* исследований показывает, что определенные типы

наночастиц обладают цитотоксичностью, вызывают аллергические и воспалительные реакции, приводят к оксидативному стрессу, повреждению ДНК и фиброзу [2–4].

Проявления реакции гиперчувствительности средней и тяжелой степеней отмечены у части пациентов при внутривенном введении липосом Doxil®, Ambisome®, DaunoXome® [5]. Такие реакции связаны с активацией липосомами системы комплемента. В связи с этим насущной проблемой представляются исследования по изучению специфической токсичности липосомальных препаратов.

При расширенном доклиническом и клиническом изучении препаратов возникает необходимость в масштабировании производства, а также пересмотре и усовершенствовании имеющейся технологии с целью увеличения выхода продукции и сокращения потерь сырья и материалов. В нормативных документах масштабирование в основном определяется как увеличение объема серий продукции от лабораторного до промышленного и предполагает использование более производительного оборудования и технологического процесса, параметры которого будут соответствовать этому оборудованию и его производительности.

Технология получения липосомальных форм лекарственных препаратов — достаточно трудоемкий процесс, поэтому получение липосом в промышленных

масштабах проблематично для исследователей и производителей всего мира.

В связи с этим на сегодняшний день проведение исследований масштабирования технологии производства и специфической токсичности нового препарата является актуальной задачей.

На базе лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведено масштабирование технологии производства липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия 1,5 мг путем замены некоторого лабораторного оборудования на полупромышленные установки.

**Цель исследования** – оценка качества опытных образцов ЛЛФ, полученных по масштабированной технологии, в сравнении с образцами, произведенными в лабораторных условиях, а также изучение мутагенных и иммунотоксических свойств.

#### Материалы и методы

**Реактивы для получения липосом:** тетра-3-фенилтиофталоцианин гидроксиалюминия (ТФГА) (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия), яичный лецитин (Lipoid GmbH, Германия), PEG-2000-DSPE 18:0 (Lipoid GmbH, Германия), холестерин (Lipoid GmbH, Германия), сахароза («Химмед», Россия), хлороформ, стабилизированный 0,6–1,0 % массовой долей этанола ТУ 2631-001-29483781-04 изм. 1,2 («Химмед», Россия), вода для инъекций ФС.2.2.0019.15, спирт этиловый 95 % ФС.2.1.0036.15 (ЗАО «Брынцалов-А», Ферейн, Россия).

**Материалы для фильтрации:** нейлоновые мембранные фильтры N66, имеющие диаметр 25 и 90 мм и размер пор 0,22; 0,45 и 1,2 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия), фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus с полиэфирсульфоновыми фильтрами, имеющими размер пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США).

**Реактивы для исследования мутагенных свойств:** Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США), OxiSelect™ Comet Assay Kit (Cell Biolabs, Сан-Диего, Калифорния, США), 2-аминофлуорен (2-АФ) (Sigma, США), бензапирен (Fluka, Англия), гентамицин («ПанЭко», Россия), глюкозо-6-фосфат (Reanal, Венгрия), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота («ПанЭко», Россия), 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазепирин (ДДТДП) («Реахим», Россия), диметилсульфоксид («ПанЭко», Россия), диэтиотрейтол (Amresco, США), дрожжевой экстракт («ПанЭко», Россия), калия гидроксид («Химмед», Россия), калия хлорид («Химмед», Россия), люцифер желтый, литиевая соль (Invitrogen, США), лития хлорид дигидрат («Химмед», Россия), магния хлорид («Химмед», Россия), метиловый спирт («Химмед»,

Россия), никотинамидадениндинуклеотидфосфат (Sigma, США), натрия ацетат («Химмед», Россия), натрия хлорид («Химмед», Россия), оксоплатин (Lachema, Чехия), параформальдегид («Химмед», Россия), пируват натрия («ПанЭко», Россия), 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат (ТРА) (Invitrogen, США), уксусная кислота («Химмед», Россия), этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (Sigma, США), спирт этиловый 95 % (ФС.2.1.0036.15), фосфатно-солевой буфер (Flow Laboratories, Англия), цисплатин (Lachema, Чехия).

**Реактивы для исследования иммунотоксичности:** этиловый спирт 95 % (ФС.2.1.0036.15), фосфатно-солевой буфер («ПанЭко», Россия), питательная среда 199 («ПанЭко», Россия), уксусная кислота («Химмед», Россия), вода для инъекций (ФС.2.2.0019.15), раствор Хэнкса («ПанЭко», Россия), агароза (Helicon, Россия), комплемент морской свинки сухой («Щелковский Биокомбинат», Россия), овальбумин (Sigma Aldrich, США), синий Эванса (Panreac, Испания), коллоидная тушь («Гамма», Россия).

**Оборудование:** весы Sartorius LA 1200 S (Sartorius AG, Германия), роторный испаритель Rotavapor R200 (Büchi, Швейцария) с колбой на 2 л, роторный испаритель Heidolph Laborota 20 control safety с отгонной колбой на 20 л (Heidolph, Германия), экструдеры Lipex™ Thermobarrel Extruder на 100 и 800 мл (Northern Lipids Inc., Канада), ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), моечно-дезинфекционная машина Lancer 1400 UP DIN (Lancer, Франция), стерилизатор сухожаровой Binder ED (Binder, Германия), низкотемпературная камера NZ 280/75.A (Frigeria, Чехия), сублимационная сушка Minifast DO.2 (Edwards, Великобритания), сублимационная сушка Edwards Minifast DO.10 (Ero Electronic S.p.A., Италия), полуавтомат ПЗР-34-ВИПС-МЕД для укупорки флаконов (ООО «Фирма «ВИПС-МЕД», Россия), наносайзер Nicomp 380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizing Systems, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия), микроскоп марки Leica, модель TCS SP5 Mid System, анализатор Anthos2020, камера морозильная теплоизолированная (модель КТС-УОМЗ 1809М/04МО).

**Лабораторные животные:** крысы линии Вистар, мыши линии C57Bl/6 массой тела 20–22 г из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, мыши-самки линии (СВА × C57Bl/6)F1 возраста 6–8 нед массой тела 18–22 г, полученные из филиала питомника «Столбовая» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животных содержали в виварии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

**Клеточные линии.** В работе использовали линию immortalized клеток печени крысы IAR-2. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 5 % эмбриональную сыворотку телят (РАА, Австрия) и гентамицин (50 ед/мл), при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>.

**Оценка промоторной активности.** Исследование промоторной активности проводили с применением теста на угнетение метаболической кооперации, при этом определяли целостность межклеточных контактов, наблюдая за перетеканием люминесцентного индикатора между клетками в монослой [6–8].

Опыты проводили на immortalized клетках печени крысы IAR-2, ЛЛФ исследовали в 4 концентрациях – 3,1; 0,62; 0,31 и 0,062 мкг/мл, в качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду, в качестве положительного контроля вводили ТРА в концентрации 5 нг/мл.

**Проведение теста по оценке промоторной активности.** Клетки рассеивали на 6-луночные планшеты в количестве 200 тыс. клеток на лунку, перед посевом клеток на дно каждой лунки помещали предварительно простерилизованное покровное стекло. Через 24 ч после посева к клеткам добавляли ЛЛФ и инкубировали в течение 72 ч. За 2 ч до проведения эксперимента клетки, служащие положительным контролем, обрабатывали ТРА в концентрации 1 нг/мл. После окончания инкубации клетки 2 раза отмывали фосфатно-солевым буфером, покрывали раствором люминесцентного индикатора и наносили на монослой клеток 3 параллельных и 1 перпендикулярную царапины хирургическим скальпелем. Затем клетки инкубировали 2 мин при 37 °C во влажной атмосфере без доступа света, 3 раза отмывали фосфатно-солевым буфером в течение 1 мин при комнатной температуре. После промывки клетки покрывали фиксирующим раствором и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Стекла переносили из лунок на предметные стекла и исследовали на флуоресцентном микроскопе Zeiss с фотонасадкой (Axio-plan 2 imaging) с использованием фильтра для FITC-флуоресценции и при увеличении 400.

**Критерии оценки промоторной активности.** Для каждой исследуемой дозы соединения делали 10 независимых снимков области монослоя клеток, прилегающих к линии царапины. Для каждого снимка определяли порядок клетки, несущей флуоресцентный краситель. Разобшение межклеточных контактов определяли как отношение среднего числа слоев клеток с красителем для каждой концентрации исследуемого препарата к среднему числу слоев клеток с красителем, обработанных растворителем.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента для определения  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее значение,  $m$  – стан-

дартная ошибка среднего, с помощью пакета программ Microsoft Excel.

**Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса.** Тест Эймса предназначен для выявления способности изучаемой ЛЛФ или ее метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных тестерных штаммов [9–12]. В качестве индикаторных микроорганизмов использовали штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 (генотип hisD3052 rfa uvrB/pKM101) и TA100 (генотип hisG46 rfa uvrB/pKM101). Для учета генных мутаций применяли чашечный метод. При проведении исследования использовали крыс линии Вистар, ЛЛФ вводили в 4 дозах: 1,1; 5,5; 11,0 и 22,0 мкг/чашка. В качестве положительного контроля были использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или в отсутствие активации смесью S9. Для вариантов тестирования без активирующей смеси были использованы N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин и ДДТДП. При применении активирующей фракции S9 ее активность контролировали по эффекту бензапирена и 2-АФ. Мутагенный эффект считался положительным при 2-кратном превышении числа мутантных колоний в опыте по сравнению с соответствующим контролем. В качестве отрицательного контроля использовали растворитель – дистиллированную воду.

**Критериями** положительного результата являлись статистически достоверное зависимое от дозы увеличение количества ревертантов или воспроизводимый положительный ответ хотя бы для одной экспериментальной точки.

**Определение числа хромосомных aberrаций.** Определение числа хромосомных aberrаций проводили с использованием модифицированного в АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» метода С.Е. Ford и J.L. Hamerton на клетках костного мозга на стадии метафазы мышей линии C57Bl/6 массой тела 18–20 г [13]. ЛЛФ вводили внутривенно за 24 ч до начала эксперимента в дозах 1ТД (6 мг/кг) и 4ТД (24 мг/кг) в пересчете на мышь или в течение 5 дней с интервалом между введениями 24 ч в дозе 1ТД в пересчете на мышь. В качестве отрицательного контроля использовали физиологический раствор, в качестве положительного контроля вводили циклофосамид в дозе 20 мг/кг.

Фиксацию клеток костного мозга проводили спустя 24 ч после последнего введения препарата. На каждый опытный и контрольный варианты брали не менее 5 животных и анализировали по 500 метафазных пластинок, с хорошим разбросом хромосом, без продольных наложений и модульным числом 40 от каждого.

При анализе учитывали следующие показатели: одиночные и парные делеции, хроматидные и хромосомные обмены и другие нарушения хромосом.

Доказательством цитогенетической активности являлось дозозависимое и/или воспроизводимое статистически значимое превышение доли клеток с хромосомными aberrациями по сравнению с контролем. Статистический анализ проводили с помощью теста  $\chi^2$ .

**Оценка повреждений ДНК методом ДНК-комет.** Метод ДНК-комет позволяет регистрировать повреждения структуры ДНК и изучать процесс репарации ДНК на уровне одиночных клеток [14–16]. Эксперименты по оценке повреждений ДНК проводили с использованием OxiSelect™ Comet Assay Kit по протоколу производителя на мышах линии C57Bl/6.

Измерения проводили с помощью компьютерной программы CometScore16, статистическую обработку результатов проводили по каждой экспериментальной точке путем сравнения показателей поврежденности ДНК в опытной (ЛЛФ) и контрольной (циклофосамид и физиологический раствор) группах с использованием непараметрических критериев Даннета (% ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста).

Показателем генотоксического действия являлся индекс повреждения (ИП), который вычисляется по следующей формуле [17]:

$$ИП = \frac{\text{ДНК в хвосте в опытной группе}}{\text{ДНК в хвосте в контрольной группе}}.$$

При ИП >2 исследуемый образец обладает генотоксическими свойствами в условиях *in vitro*.

**Определение массы и клеточности органов.** Мышей забивали на 7-й и 21-й дни после введения препарата с помощью цервикальной дислокации. Извлекали у них тимус, селезенку и трубчатые кости. Лимфоидные органы взвешивали и с помощью стеклянного гомогенизатора готовили клеточную взвесь на основе питательной среды 199. Полученную суспензию фильтровали и 2 раза отмывали путем центрифугирования. Костный мозг вытесняли с помощью питательной среды 199 из бедренной кости левой лапки и затем гомогенизировали. Далее подсчитывали концентрацию ядросодержащих клеток (ЯСК) под микроскопом в 3 % уксусной кислоте. Результаты выражали в абсолютных единицах числа ЯСК в органе и в относительных значениях (процент от массы тела) [18, 19].

**Оценка влияния ЛЛФ на гуморальный иммунный ответ.** В качестве антигена использовали суспензию 3-кратно отмывших в стерильном физиологическом растворе эритроцитов барана (ЭБ) в дозе  $5 \times 10^7$  ЭБ/мышь. ЛЛФ вводили внутривенно, в качестве контроля использовали воду для инъекций. На 5-е сутки после иммунизации определяли число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке (реакция Ерне) [20].

Животных забивали с помощью цервикальной дислокации, извлекали селезенки и готовили клеточную суспензию с помощью стеклянного гомогениза-

тора. Суспендирование проводили в растворе Хэнкса (рН 7,2–7,4) на холоде. Приготовленную суспензию фильтровали и помещали в холодильник.

Расплавленную в дистиллированной воде 2 % агарозу добавляли к равному объему 2-кратно нагретого до 45–48 °С раствора Хэнкса. В приготовленную таким образом агарозу вносили суспензию ЭБ из расчета 70–80 млн клеток на 1 мл агарозной смеси. В предварительно разогретые на водяной бане до температуры 46–48 °С пробирки разливали по 2,75 мл полученной смеси. Затем в пробирки, содержащие агарозу с ЭБ, вводили суспензию селезеночных клеток. Содержимое пробирок встряхивали и выливали на чашки Петри диаметром 100 мм. Осторожным покачиванием и вращением смесь равномерно распределяли по дну чашки. После застывания агарозы чашки помещали в термостат при 37,5 °С на 1 ч. Затем на поверхность агарозы в чашках наливали по 3 мл раствора сухого комплемента морской свинки (разведение в физиологическом растворе 1:5) и инкубировали 45 мин в термостате при 37 °С. После инкубации комплемент сливали и проводили подсчет образовавшихся зон гемолиза. При осмотре содержимого чашек в проходящем свете на розовом фоне невооруженным глазом были видны небольшие очаги – участки лизиса эритроцитов («прямые бляшки»). При микроскопии в центре зоны гемолиза была видна 1 клетка, являющаяся продуцентом антител-гемолизаторов. После подсчета зон гемолиза и количества лимфоидных клеток, добавленных к агарозе, вычисляли, сколько антителопродуцентов находилось в исходной суспензии, затем делали перерасчет их количества на весь орган.

**Оценка влияния ЛЛФ на клеточный иммунитет в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ).** Влияние ЛЛФ на клеточный иммунитет изучали в реакции ГЗТ по методу И.И. Подоплелова и соавт. [19, 21]. После введения препарата мышей иммунизировали 100 мкг овальбумина в сочетании с 250 мкг синего Эванса в 0,2 мл физиологического раствора в межлопаточную область. Вторую (разрешающую) инъекцию 25 мкг овальбумина в 0,02 мл физиологического раствора производили на 5-е сутки в подушечку задней лапы («опытная» лапа). В контралатеральную лапу вводили 0,02 мл стерильного физиологического раствора («контрольная» лапа). Результаты реакции регистрировали через 24 ч путем определения массы «опытной» и «контрольной» лап. Индекс реакции (ИР) для каждого животного определяли по формуле

$$ИР = \frac{P_o - P_k}{P_k} \times 100 \%,$$

где  $P_o$  – масса стопы «опытной» лапы;  $P_k$  – масса стопы «контрольной» лапы.

**Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.** Через 24 ч после внутривенного введения препарата оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов по интенсивности захвата частиц суспензии 0,05 % коллоидной туши, введенной мышам внутрибрюшинно в объеме 2 мл. Через 10 мин брюшную полость промывали 5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Полученные таким образом клетки перитонеального экссудата (КПЭ) 3-кратно отмывали, ресуспендировали в 1–2 мл физиологического раствора, подсчитывали концентрацию ЯСК и процент фагоцитирующих клеток под микроскопом. Для определения фагоцитарного индекса измеряли оптическую плотность лунок с лизатом КПЭ. Для этого клетки осаждали центрифугированием, супернатант удаляли, а осадок КПЭ лизировали дистиллированной водой. Лизаты КПЭ помещали в плоскодонные 96-луночные планшеты и определяли с помощью спектрофотометрического анализатора при длине волны, равной 620 нм, оптическую плотность, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами. Результаты выражали в условных единицах, отражающих оптическую плотность лизата КПЭ, соотнесенную с количеством фагоцитирующих клеток.

### Результаты

**Получение ЛЛФ с использованием полупромышленных установок и ее исследование.** Липосомы получали по методу Бенгема в модификации для гидрофобных субстанций, для оценки возможности масштабирования технологии в технологический процесс были внесены изменения, связанные с использованием полупромышленных установок – роторного испарителя Heidolph Laborota 20 control safety с отгонной колбой на 20 л и экструдера Lipex™ Thermobarrel Extruder объемом 800 мл.

Экспериментальные исследования показали, что оптимальная загрузка вакуумной колбы 20 л для получения легко смываемой липидной пленки составляет 220 мл ТФГА в хлороформном растворе липидов. Увеличение объема приводило к формированию на стенках колбы неоднородной пленки, что требовало длительной сушки от органического растворителя и затем продолжительной регидратации полученной липидной пленки. Указанные обстоятельства осложняли процесс получения ЛЛФ как технологически, так и экономически (увеличение затрат на электроэнергию, износ оборудования). В связи с этим опытным путем был установлен наиболее рациональный объем загрузки отгонной колбы в 200–230 мл.

На этапе образования пленки основными критическими точками технологического процесса являются температура водяной бани, величина вакуума и скорость вращения колбы. Температура водяной

бани не варьируется, а устанавливается на  $+37 \pm 0,2^\circ\text{C}$ , что обусловлено физико-химическими свойствами вспомогательных веществ. Величина вакуума задается максимальной и поддерживается автоматически, а вот скорость вращения колбы требуется подобрать оптимальную. Так как данный роторный испаритель способен развивать скорость от 6 до 160 об/мин, проводили ряд экспериментов с использованием различных скоростей вращения. Эмпирическим путем было доказано, что скорость вращения колбы 20 л роторного испарителя для получения однородной липидной пленки должна быть в пределах диапазона от 20 до 40 об/мин. Пленку сушили под вакуумом в течение 2,5 ч до удаления остатков хлороформа.

После получения липидной пленки отключали вакуум, в колбу с пленкой добавляли рассчитанный объем воды для инъекций (300 мл) и продолжали вращение, но скорость его уже не превышала 10–15 об/мин для послыйного смывания пленки и получения однородной липосомальной дисперсии. На этапе разработки лабораторной технологии установили, что смыв пленки раствором криопротектора приводит к образованию трудно измельчаемых липосом, тогда как при применении воды для инъекций процесс измельчения происходит легко и быстро. Поэтому при масштабировании технологии в качестве раствора для гидратации липидной пленки использовали воду для инъекций, которая обеспечивала получение липосомальной дисперсии с приемлемым диаметром везикул ( $160 \pm 20$  нм).

После гидратации липидной пленки проводили измельчение липосомальной дисперсии с использованием полупромышленного экструдера на 800 мл. Измельчение проводят путем пропускания дисперсии через фильтры, имеющие поры размером 1,2 мкм (1 раз), 0,45 мкм (1 раз) и 0,22 мкм (5 раз). Затем к измельченной дисперсии добавляли раствор криопротектора, стерилизующую фильтрацию водной липосомальной дисперсии ТФГА с криопротектором проводили с использованием полупромышленного экструдера. Полученную стерильную дисперсию дозировали по 6 мл во флаконы и лиофилизировали, при этом объем наполнения камеры сублимационной установки в отличие от лабораторной технологии был максимальным и составил 400 флаконов.

Полученные по модифицированной технологии липосомы сравнивали по основным качественным показателям (содержание действующего вещества, диаметр липосом и pH полученной дисперсии) с полученными при лабораторном производстве (табл. 1).

При обработке данных, полученных после анализа качества серий ЛЛФ, наработанных с помощью масштабирования технологии, можно сделать вывод, что применение полупромышленных установок на этапах получения липидной пленки и экструзии/

**Таблица 1.** Сравнительный анализ липосомальных дисперсий, полученных по лабораторной и масштабированной технологиям

| Показатель качества                              | Лабораторная технология |            | Масштабированная технология |            |
|--------------------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------------------|------------|
|                                                  | опыт 1                  | опыт 2     | опыт 1                      | опыт 2     |
| Содержание ТФГА в липосомальной дисперсии, мг/мл | 0,25 ± 0,2              | 0,25 ± 0,3 | 0,25 ± 0,1                  | 0,25 ± 0,2 |
| Диаметр липосом, нм                              | 175 ± 18                | 170 ± 20   | 172 ± 15                    | 175 ± 20   |
| pH                                               | 6,9                     | 7,1        | 6,8                         | 6,6        |

**Примечание.** pH – водородный показатель; ТФГА – тетра-3-фенилтиофталоглицин гидроксиалюминия.

стерилизации, увеличение объема наполнения камеры сублимационной суши не приводят к снижению качества получаемого продукта по сравнению с ЛЛФ, полученной в соответствии с лабораторной технологией. Максимально возможный объем серии ЛЛФ – 400 флаконов.

#### Исследование мутагенных свойств ЛЛФ

Потенциальную мутагенную активность изучали в соответствии с международным стандартом ISO 10993-3:2003.

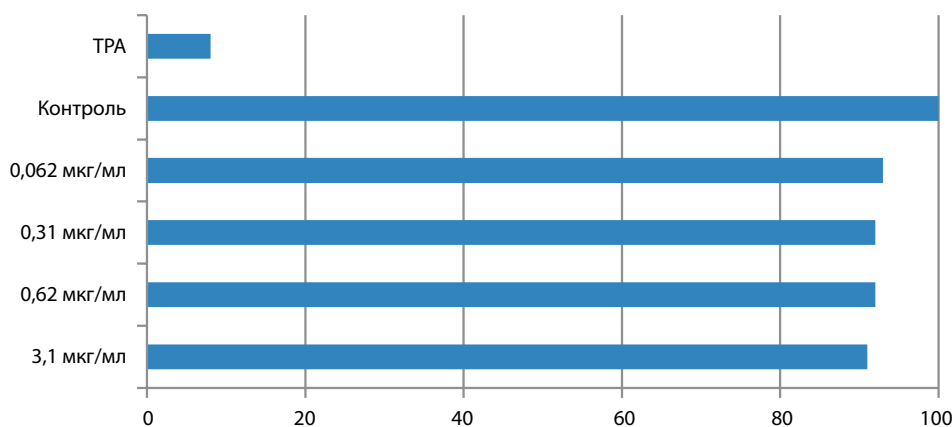
**Оценка промоторной активности.** При исследовании промоторной активности ЛЛФ определяли степень кооперации клеток. При воздействии ЛЛФ в максимальной концентрации 3,1 мкг/мл степень клеточной кооперации составляет 91 % по отношению к клеткам, обработанным ТРА, что статистически достоверно неотличимо от клеток, обработанных дистиллированной водой (рис. 1), это указывает на отсутствие промоторной активности. На рис. 2 представлены

микрофотографии монослоя клеток в области царапины из образцов клеток, обработанных дистиллированной водой, ТРА и ЛЛФ в 4 концентрациях.

**Оценка мутагенной активности в тесте Эймса.** В табл. 2 и 3 приведены результаты исследований мутагенной активности ЛЛФ на штамме TA100, чувствительном к веществам, которые индуцируют мутации с заменой оснований, а также на штамме TA98, чувствительном к соединениям, индуцирующим мутации со сдвигом рамки считывания. Каждый эксперимент проводили 2-кратно. Показатели контрольных исследований находятся в пределах стандартных уровней, характерных для исследуемых штаммов. В вариантах положительного контроля выявлена высокая активность фракции S9: промутагены 2-АФ и бензапирен индуцируют высокий уровень реверсий. Специфичность мутагенного ответа в системе без активации ферментов микросомных микрооксигеназ подтверждена испытаниями штамма TA98 с мутагеном ДДТДП и штамма TA100 с мутагеном N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином. Результаты проведенных исследований по изучению мутагенной активности ЛЛФ в тесте Эймса показали, что в диапазоне доз 1,1–22,0 мкг/чашка препарат не вызывает мутаций бактерий в присутствии и/или при отсутствии экзогенной метаболической системы (фракции S9), полученной от млекопитающих.

**Определение числа хромосомных aberrаций.** Результаты цитогенетического исследования по учету хромосомных aberrаций (рис. 3) оценивали путем регистрации видимых структурных нарушений хромосом на стадии метафазы. ЛЛФ в дозах 1ТД и 4ТД, а также при 5-кратном введении в отличие от циклофосама статистически достоверно не индуцировала увеличение числа хромосомных аномалий в клетках костного мозга мышей.

**Доля клеток, находящихся в кооперации, % относительно образца, обработанного дистиллированной водой**



**Рис. 1.** Полученная на клетках IAR-7 зависимость промоторной активности от концентрации липосомальных лекарственных форм. ТРА – 12-О-тетрадеканолфторбол-13-ацетат

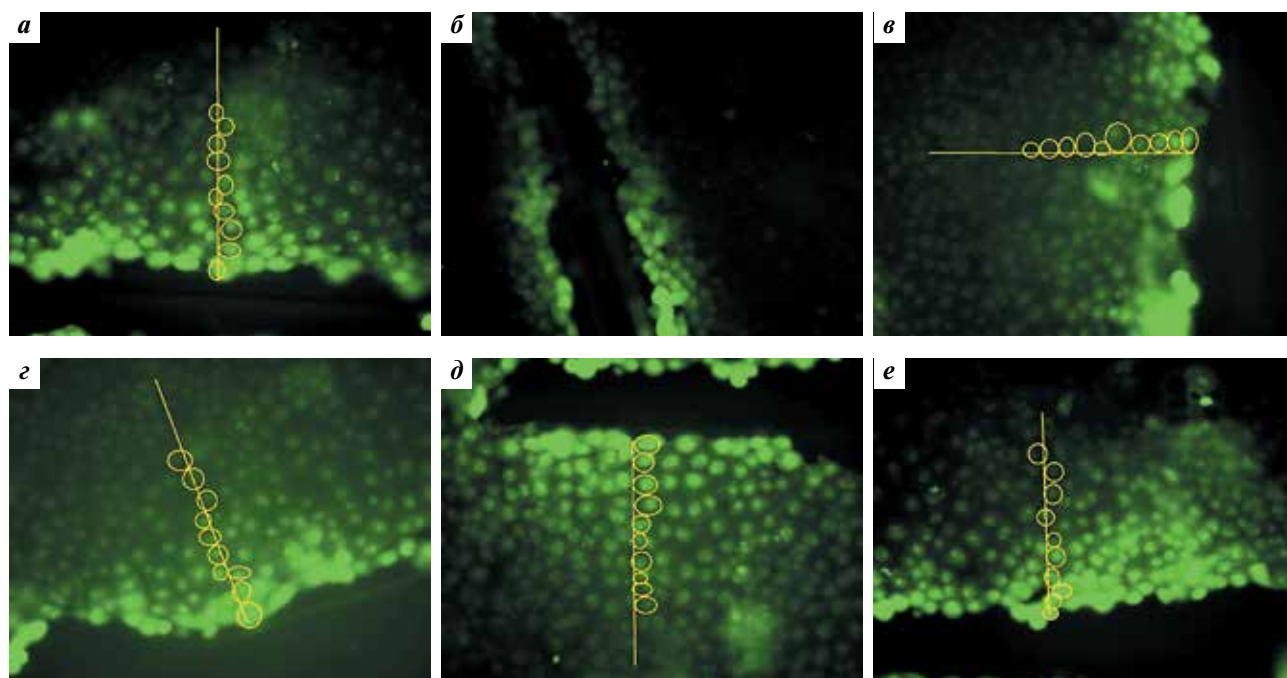


Рис. 2. Микрофотографии монослоя клеток в области царапины из образцов клеток: а – обработанных дистиллированной водой; б – 5 нг/мл 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата; в – липосомальная лекарственная форма (ЛЛФ) в концентрации 3,1 мкг/мл; г – ЛЛФ в концентрации 0,62 мкг/мл; д – ЛЛФ в концентрации 0,31 мкг/мл; е – ЛЛФ в концентрации 0,062 мкг/мл

Таблица 2. Результаты исследования мутагенного действия ЛЛФ на индикаторный штамм бактерии TA100 в тесте Эймса

| Исследуемое вещество | Доза на чашку, мкг | Штамм TA100 |           |            |           |    |            |           |            |           |    |
|----------------------|--------------------|-------------|-----------|------------|-----------|----|------------|-----------|------------|-----------|----|
|                      |                    | –S9         |           |            |           |    | +S9        |           |            |           |    |
|                      |                    | опыт 1      |           | опыт 2     |           | МА | опыт 1     |           | опыт 2     |           | МА |
|                      |                    | $M \pm m$   | $M_1/M_0$ | $M \pm m$  | $M_1/M_0$ |    | $M \pm m$  | $M_1/M_0$ | $M \pm m$  | $M_1/M_0$ |    |
| Контроль фона        | 0                  | 41 ± 6,4    | 1,0       | 39 ± 6,0   | 1,0       | –  | 57 ± 2,0   | 1,0       | 55 ± 3,3   | 1,0       | –  |
| БП                   | 4,4                |             |           |            |           |    | 403 ± 31,1 | 7,1       | 430 ± 33,3 | 7,8       | +  |
| 2-АФ                 | 22,0               |             |           |            |           |    | 520 ± 26,7 | 9,1       | 590 ± 13,8 | 10,7      | +  |
| НГ                   | 4,4                | 507 ± 28,7  | 12,4      | 574 ± 14,7 | 14,7      | +  |            |           |            |           |    |
| ЛЛФ                  | 1,1                | 44 ± 4,4    | 1,1       | 47 ± 3,3   | 1,2       | –  | 51 ± 1,1   | 0,9       | 53 ± 2,7   | 1,0       | –  |
|                      | 5,5                | 37 ± 4,0    | 0,9       | 41 ± 2,7   | 1,1       | –  | 49 ± 3,8   | 0,9       | 50 ± 1,1   | 0,9       | –  |
|                      | 11,0               | 41 ± 1,6    | 1,0       | 47 ± 2,9   | 1,2       | –  | 49 ± 6,7   | 0,9       | 59 ± 13,1  | 1,1       | –  |
|                      | 22,0               | 39 ± 2,4    | 1,0       | 41 ± 2,2   | 1,1       | –  | 61 ± 2,0   | 1,1       | 54 ± 1,1   | 1,0       | –  |

Примечание. Здесь и в табл. 3:  $M$  – среднее значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего. 2-АФ – 2-аминофлуорен; БП – бензапирен; ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма; НГ – N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин.  $M_1/M_0$  – отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле. МА – мутагенная активность препарата («+» – наличие, «–» – отсутствие).

**Оценка повреждения ДНК с помощью теста ДНК-комет.** При исследовании степени повреждения ДНК ЛЛФ в тесте ДНК-комет была оценена доля «комет» в общем количестве клеток. При введении мышам ЛЛФ в дозах 1ТД и 4ТД было показано, что данное соединение не вызывает статистически досто-

верного увеличения количества клеток-«комет» (рис. 4). В то же время препарат циклофосамид, известный ДНК-повреждающий агент, вызывал достоверное увеличение числа «комет» по сравнению с контрольной группой (33,8 % от общего числа клеток по сравнению с 5,2 % клеток в контрольной группе).

Таблица 3. Результаты исследования мутагенного действия ЛЛФ на индикаторный штамм бактерии TA98 в тесте Эймса

| Исследуемое вещество | Доза на чашку, мкг | Штамм TA98     |           |                |           |    |                |           |                |           |    |
|----------------------|--------------------|----------------|-----------|----------------|-----------|----|----------------|-----------|----------------|-----------|----|
|                      |                    | –S9            |           |                |           |    | +S9            |           |                |           |    |
|                      |                    | опыт 1         |           | опыт 2         |           | МА | опыт 1         |           | опыт 2         |           | МА |
|                      |                    | $M \pm m$      | $M_I/M_0$ | $M \pm m$      | $M_I/M_0$ |    | $M \pm m$      | $M_I/M_0$ | $M \pm m$      | $M_I/M_0$ |    |
| Контроль фона        | 0                  | $9 \pm 2,0$    | 1,0       | $8 \pm 2,9$    | 1,0       | –  | $16 \pm 1,6$   | 1,0       | $13 \pm 2,2$   | 1,0       | –  |
| БП                   | 4,4                |                |           |                |           |    | $235 \pm 16,7$ | 14,7      | $189 \pm 14,2$ | 14,5      | +  |
| 2-АФ                 | 22,0               |                |           |                |           |    | $267 \pm 17,8$ | 16,7      | $227 \pm 18,2$ | 17,5      | +  |
| ДДТДП                | 8,8                | $297 \pm 42,2$ | 33,0      | $320 \pm 33,3$ | 40,0      | +  |                |           |                |           |    |
| ЛЛФ                  | 1,1                | $10 \pm 1,3$   | 1,1       | $7 \pm 0,4$    | 0,9       | –  | $18 \pm 1,8$   | 1,1       | $16 \pm 2,0$   | 1,2       | –  |
|                      | 5,5                | $9 \pm 0,9$    | 1,0       | $9 \pm 0,9$    | 1,1       | –  | $18 \pm 3,6$   | 1,1       | $13 \pm 1,6$   | 1,0       | –  |
|                      | 11,0               | $8 \pm 1,6$    | 0,9       | $8 \pm 1,6$    | 1,0       | –  | $15 \pm 0,7$   | 0,9       | $13 \pm 2,0$   | 1,0       | –  |
|                      | 22,0               | $12 \pm 1,3$   | 1,3       | $9 \pm 1,8$    | 1,1       | –  | $17 \pm 2,2$   | 1,1       | $14 \pm 2,0$   | 1,1       | –  |

Примечание. ДДТДП – 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазапирен.

Таблица 4. Характеристики клеток после обработки ЛЛФ в тесте ДНК-комет

| Препарат, концентрация                | Средняя длина «хвоста кометы», пиксели | Доля поврежденной ДНК, % | Момент «хвоста кометы»  | ИП     |
|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------|
| Физиологический раствор, самцы, 24 ч  | $15,5 \pm 2,0$                         | $0,00044 \pm 0,00005$    | $0,00004 \pm 0,00001$   | –      |
| Физиологический раствор, самцы, 5 сут | $13,3 \pm 2,03$                        | $0,000215 \pm 0,000091$  | $0,000055 \pm 0,000019$ | –      |
| Физиологический раствор, самки, 5 сут | $13,5 \pm 1,97$                        | $0,000236 \pm 0,00009$   | $0,00008 \pm 0,000042$  | –      |
| Циклофосфамид, самцы, 20 мг/кг, 24 ч  | $49,9 \pm 4,0$                         | $3,54 \pm 0,47$          | $3,77 \pm 0,57$         | 8045,5 |
| ЛЛФ, самцы, 1ТД, 24 ч                 | $14,2 \pm 1,2$                         | $0,000300 \pm 0,00011$   | $0,00006 \pm 0,00001$   | 0,68   |
| ЛЛФ, самцы, 4ТД, 24 ч                 | $14,6 \pm 0,7$                         | $0,000390 \pm 0,00010$   | $0,00007 \pm 0,00002$   | 0,89   |
| ЛЛФ, самцы, 1ТД, 5 сут                | $15,1 \pm 0,91$                        | $0,0000362 \pm 0,000107$ | $0,000037 \pm 0,000007$ | 1,68   |
| ЛЛФ, самки, 4ТД, 5 сут                | $17,7 \pm 1,63$                        | $0,000297 \pm 0,000092$  | $0,000038 \pm 0,000004$ | 1,28   |

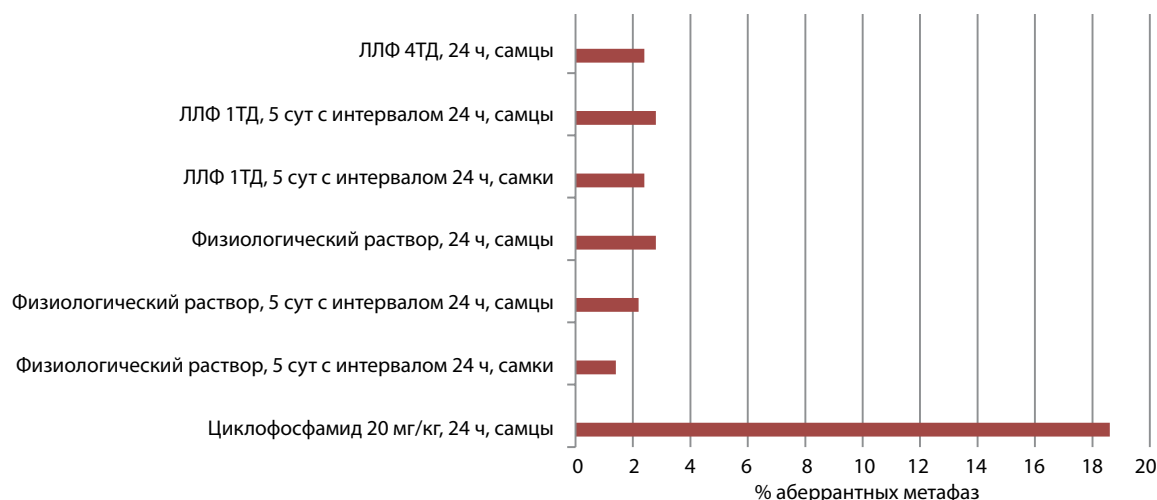
Примечание. ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ИП – индекс повреждения; ЛЛФ – липосомальная лекарственная форма.

Важными данными, получаемыми при проведении теста ДНК-комет, также являются такие характеристики «кометы», как длина «хвоста кометы», доля поврежденной ДНК в клетке, а также момент «хвоста кометы», определяемый как произведение длины «хвоста» на % поврежденной ДНК. Хвост «кометы» представляет собой фракцию относительно низкомолекулярной ДНК, образовавшейся в результате появления разрывов в высокомолекулярной хромосомной ДНК. В нашем случае средняя длина «хвоста кометы» при введении самцам мышей в течение 24 ч физиологического раствора составила  $15,5 \pm 2,0$  пикселя, доля поврежденной ДНК и момент «хвоста» были пренебрежимо малы. Значения данных показателей для мышей, получавших ЛЛФ, находились в том же диапазоне, в то время как у самцов, получавших циклофосфамид в дозе 20 мг/кг, доля поврежденной ДНК

составила 3,54 %, а средняя длина «хвоста кометы» –  $49,9 \pm 4,0$  пикселя (табл. 4), что подтверждает генотоксические свойства циклофосфамида.

ИП был менее 2,0 для всех опытных групп, получавших ЛЛФ, что указывает на то, что исследуемый образец не обладает генотоксическими свойствами в условиях *in vitro*.

При анализе полученных данных можно сделать вывод, что ЛЛФ в исследованных дозах 1ТД и 4ТД не увеличивает количество хромосомных аномалий у мышей и не вызывает повреждений ДНК в тесте ДНК-комет, в дозах 1,1–22,0 мкг/чашка не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса, а также в тесте на промоторную активность *in vitro* в диапазоне концентраций 0,062–3,1 мкг/мл не обладает способностью разобщать межклеточные контакты, что свидетельствует об отсутствии



**Рис. 3.** Результаты исследований влияния липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) на увеличение числа хромосомных аномалий в клетках костного мозга мышей линии C57Bl/6

**Таблица 5.** Состояние лимфоидных и кроветворных органов на 7-й день после введения ЛЛФ

| Орган иммунной системы                                     |                        | Контроль*         | ЛЛФ, 6 мг/кг      | ЛЛФ, 12 мг/кг     |
|------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Селезенка                                                  | Количество ЯСК         | $3,0 \times 10^8$ | $2,7 \times 10^8$ | $3,1 \times 10^8$ |
|                                                            | Масса, мг              | 90                | 83                | 86                |
|                                                            | Масса, % от массы тела | $0,415 \pm 0,017$ | $0,407 \pm 0,015$ | $0,416 \pm 0,019$ |
| Тимус                                                      | Количество ЯСК         | $2,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^8$ | $2,1 \times 10^8$ |
|                                                            | Масса, мг              | 56                | 49                | 55                |
|                                                            | Масса, % от массы тела | $0,259 \pm 0,013$ | $0,272 \pm 0,016$ | $0,268 \pm 0,011$ |
| Костный мозг (количество ЯСК в костном мозге левого бедра) |                        | $1,1 \times 10^8$ | $0,9 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ |

**Примечание.** Здесь и в табл. 6: ЛЛФ — липосомальная лекарственная форма; ЯСК — ядродержащие клетки.

\*В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

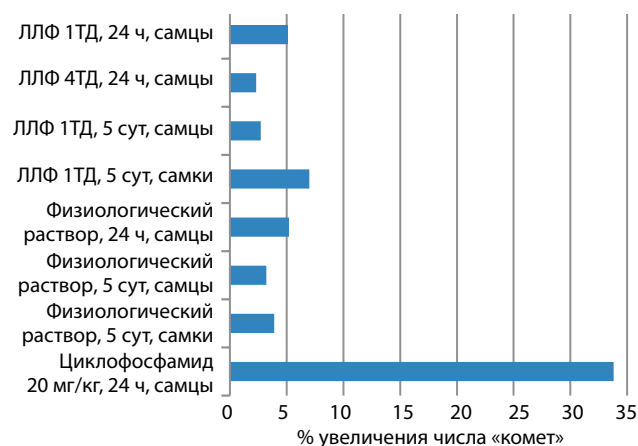
у данного препарата способности промотировать процесс канцерогенеза.

#### Исследование иммуотоксичности

**Влияние ЛЛФ на массу и клеточность лимфоидных и кроветворных органов иммунной системы.** На 7-й и 21-й дни после внутривенного введения ЛЛФ оценивали влияние препарата на состояние селезенки, тимуса, костного мозга мышей. Значимых изменений в органах лимфоидной системы после применения ЛЛФ по сравнению с контролем (вода для инъекций) не наблюдали (табл. 5 и 6).

**Оценка влияния ЛЛФ на гуморальный иммунный ответ.** Оценка гуморального иммунного ответа, т. е. способности иммунной системы к выработке антител в ответ на чужеродные агенты, является наиболее информативной при изучении иммуотоксичности. Оценка проводится в интегральном функциональном тесте: выработка АОК при иммунизации мышей Т-зависимым антигеном — ЭБ.

Данные, приведенные в табл. 7, показывают, что ЛЛФ в исследованных дозах не оказывала влияния на выработку АОК.



**Рис. 4.** Влияние липосомальных лекарственных форм (ЛЛФ) на количество клеток «комет»

Таблица 6. Состояние лимфоидных и кроветворных органов на 21-й день после введения ЛЛФ

| Орган иммунной системы                                     |                        | Контроль          | ЛЛФ, 6 мг/кг      | ЛЛФ, 12 мг/кг     |
|------------------------------------------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Селезенка                                                  | Количество ЯСК         | $3,8 \times 10^8$ | $3,6 \times 10^8$ | $3,5 \times 10^8$ |
|                                                            | Масса, мг              | 100               | 97                | 92                |
|                                                            | Масса, % от массы тела | $0,441 \pm 0,017$ | $0,453 \pm 0,020$ | $0,419 \pm 0,015$ |
| Тимус                                                      | Количество ЯСК         | $3,3 \times 10^8$ | $3,3 \times 10^8$ | $3,1 \times 10^8$ |
|                                                            | Масса, мг              | 90                | 86                | 89                |
|                                                            | Масса, % от массы тела | $0,392 \pm 0,011$ | $0,401 \pm 0,017$ | $0,381 \pm 0,015$ |
| Костный мозг (количество ЯСК в костном мозге левого бедра) |                        | $1,5 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ | $1,4 \times 10^8$ |

Таблица 7. Влияние ЛЛФ на количество АОК селезенки мышей

| Группа        | Количество ЯСК    | Среднее количество АОК на селезенку | Коэффициент по отношению к контролю | p    |
|---------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------|
| Контроль*     | $4,6 \times 10^8$ | $1990,42 \pm 24,48$                 | —                                   | —    |
| ЛЛФ, 6 мг/кг  | $4,5 \times 10^8$ | $2016,40 \pm 46,51$                 | 1,013                               | 0,17 |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $4,6 \times 10^8$ | $1950,22 \pm 64,0$                  | 0,96                                | 0,13 |

**Примечание.** Здесь и в табл. 8: p — стандартное отклонение; АОК — антителообразующие клетки; ЛЛФ — липосомальная лекарственная форма; ЯСК — ядродержащие клетки.

\*В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

**Оценка влияния ЛЛФ на клеточный иммунитет в реакции ГЗТ.** Реакция ГЗТ дает возможность изучить влияние на продукцию сенсibilизированными лимфоцитами медиаторов, вовлекающих клетки мононуклеарных фагоцитов в иммунный ответ, и оценить влияние на функциональную активность системы Т-клеток иммунитета.

В табл. 8 приведены данные, полученные при оценке влияния ЛЛФ на развитие ГЗТ к овальбумину. Установлено, что ЛЛФ не оказывала влияния на выраженность ГЗТ при внутривенном 1-кратном введении в дозах 6 и 12 мг/кг.

Таблица 8. Влияние ЛЛФ на клеточный иммунный ответ

| Группа        | ИР, %          | p    |
|---------------|----------------|------|
| Контроль*     | $7,2 \pm 0,51$ | —    |
| ЛЛФ, 6 мг/кг  | $7,2 \pm 0,55$ | 0,73 |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $7,2 \pm 0,60$ | 0,85 |

**Примечание.** ИР — индекс реакции.

\*В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

**Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов.** При изучении фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов через 24 ч после введения ЛЛФ обнаружили, что препарат снижает количество и процент фагоцитирующих клеток, а также дозозависимо уменьшает фагоцитарный индекс КПЭ (табл. 9). Липосомы могут снижать системное коли-

чество макрофагов в организме, так как сами являются объектом фагоцитоза [22]. Поскольку исследуемый препарат является липосомальной формой, вероятно, при введении за 24 ч до исследования фагоцитарной активности он мог быть фагоцитирован, что вызвало снижение количества макрофагов у мышей. В связи с этим определяли длительность сохранения выявленного снижения количества макрофагов у мышей. Через 7 сут после введения препарата (табл. 10) фагоцитарная активность в опытных группах не отличалась от контроля.

Таблица 9. Влияние ЛЛФ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов через 24 ч после введения

| Группа        | Фагоцитирующие клетки     |                           | Фагоцитарный индекс |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
|               | Количество, $\times 10^6$ | % от общего числа ЯСК КПЭ |                     |
| Контроль      | $1,6 \pm 0,1$             | 3,1                       | $0,428 \pm 0,015$   |
| ЛЛФ, 6 мг/кг  | $1,1 \pm 0,1$             | 2,5                       | $0,375 \pm 0,043^*$ |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $1,0 \pm 0,1$             | 2,5                       | $0,286 \pm 0,023^*$ |

**Примечание.** Здесь и в табл. 10: КПЭ — клетки перитонеального экссудата; ЛЛФ — липосомальная лекарственная форма; ЯСК — ядродержащие клетки.

\* $p < 0,05$  по отношению к контролю. В качестве контроля использовалась вода для инъекций.

Таким образом, исследование действия ЛЛФ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

**Таблица 10.** Влияние ЛЛФ на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов через 7 сут после введения

| Группа        | Фагоцитирующие клетки     |                           | Фагоцитарный индекс |
|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|
|               | Количество, $\times 10^6$ | % от общего числа ЯСК КПЭ |                     |
| Контроль      | $1,8 \pm 0,1$             | 3,0                       | $0,432 \pm 0,019$   |
| ЛЛФ, 6 мг/кг  | $1,8 \pm 0,1$             | 3,2                       | $0,430 \pm 0,027$   |
| ЛЛФ, 12 мг/кг | $1,9 \pm 0,1$             | 3,0                       | $0,438 \pm 0,018$   |

при внутривенном введении в дозах 6 и 12 мг/кг показало, что препарат не оказывает влияния на клеточный иммунитет.

### Заключение

По результатам проведенных исследований масштабирована технология получения ЛЛФ, позволяющая получить за 1 производственный цикл до 400 флаконов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (госконтракт № 14.N08.12.0074).

Изучено влияние ЛЛФ на мутагенные свойства и иммуотоксичность. Установлено, что ЛЛФ в исследованных дозах 6 и 24 мг/кг не увеличивает хромосомные аномалии у мышей и не вызывает повреждений ДНК, в дозах 1,1–22,0 мкг/чашка не проявляет мутагенной активности в бактериальном тесте Эймса, в диапазоне концентраций 0,062–3,1 мкг в тесте на промоторную активность не разобщает межклеточные контакты, что свидетельствует об отсутствии у данного препарата способности промотировать процесс канцерогенеза.

Определено, что в дозах 6 и 12 мг/кг ЛЛФ не оказывает влияния на гуморальный и клеточный иммунитет, не изменяет массу и клеточность центральных и периферических органов иммунной системы. ЛЛФ через 24 ч после введения в дозах 6 и 12 мг/кг дозозависимо снижает фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, которая восстанавливается через 7 сут. Следовательно, ЛЛФ в изученных дозах не оказывает иммуотоксического действия.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Maeda H., Wu J., Sawa T. et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Rel* 2000;65:271–84. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5.
- Wick P., Manser P., Limbach L.K. et al. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol Lett* 2007;168(2):121–31. DOI: 10.1016/j.toxlet.2006.08.019.
- Ziemba B., Matuszko G., Bryszewska M., Klajnert B. Influence of dendrimers on red blood cells. *Cell Moll Biol Lett* 2012;17(1):21–35. DOI: 10.2478/s11658-011-0033-9.
- Аляутдин Р.Н., Романов Б.К. Рекомендации по оценке безопасности лекарственных средств, содержащих наночастицы. Безопасность и риск фармакотерапии 2015;4:10–22.
- Szebeni J., Muggia F., Gabizon A., Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev* 2011;63(12):1020–30. DOI: 10.1016/j.addr.2011.06.017.
- Brisette J.L., Kumar N.M., Gilula N.B., Dotto G.P. The tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the ras oncogene modulate expression and phosphorylation of gap junction proteins. *Mol Cell Biol* 1991;11:5364–71.
- Abbaci M., Barberi-Heyob M., Blondel W. et al. Advantages and limitations of commonly used methods to assay the molecular permeability of gap junctional intercellular communication. *BioTechniques* 2008;45:33–46. DOI: 10.1128/MCB.11.10.5364.
- Na M.R., Koo S.K., Kim D.Y. et al. *In vitro* inhibition of gap junctional intercellular communication by chemical carcinogens. *Toxicology* 1995;98:199–206. DOI: 10.1016/0300-483X(94)02931-J.
- Maron D.M., Ames B.N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res* 1983;113(3–4):173–215. DOI: 10.1016/0165-1161(83)90010-9.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические указания по оценке мутагенных свойств фармакологических препаратов. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. 944 с.
- Белицкий Г.А., Ревазова Ю.А., Абилов С.К. и др. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств. Ведомости Фармакологического комитета 1998;1:21–4.
- Фонштейн Л.М., Абелев С.К., Бобринев Е.В. и др. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем (Методические указания). М., 1983. 34 с.
- Ford C.E., Hamerton J.L. Chromosomes of five rodent species. *Nature* 1956;31:247–54.
- Оценка генотоксических свойств методом ДНК-комет *in vitro*. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010.
- Olive P.L., Banath J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006;1(1):23–9. DOI: 10.1038/nprot.2006.5.
- Budunova I.V., Mittelman L.A., Belitsky G.A. Identification of tumor promoters by their inhibitory effect on intercellular transfer of lucifer yellow. *Cell Biol Toxicol* 1989;5(1):77–89. DOI: 10.1007/BF00141066.
- Ostling O., Johanson K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291–8. DOI: 10.1016/0006-291X(84)90411-X.
- Иванова А.С., Мастернак Т.Б., Мартынов А.И. Принципы изучения иммуотоксического действия фармакологических препаратов. Токсикологический вестник 2010;5:26–31.
- Иванова А.С., Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Мартынов А.И. Принципы оценки иммунологической безопасности фармацевтических продуктов. Биомедицина 2011;(3):94–7.
- Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 1963;140:405.
- Подоплелов И.И., Крылов О.Р., Медуницын Н.В. Эванс синий как адъювант для получения повышенной чувствительности замедленного типа в эксперименте. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 1985;6:729.
- Raz A., Bucana C., Fogler W.E. et al. Biochemical, Morphological, and Ultrastructural Studies on the Uptake of Liposomes by Murine Macrophages. *Cancer Res* 1981;41:487–94. PMID: 7448797.

## АФФИННЫЕ СВОЙСТВА АНТИ-HER2 АНТИТЕЛ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО ИСТОЧНИКА

А.И. Щербаков<sup>1</sup>, Е.Н. Кособокова<sup>1</sup>, М.В. Пинюгина<sup>1</sup>, Е.В. Шешукова<sup>2</sup>, В.С. Косоруков<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН; Россия, 119991 Москва, ул. Губкина, 3

Контакты: Вячеслав Станиславович Косоруков atgtga@mail.ru

**Введение.** Рецептор Her2 является важной мишенью противоопухолевой терапии при лечении рака молочной железы. В настоящее время в клинической практике применяют препарат на основе моноклональных антител анти-Her2 — трастузумаб. Трастузумаб производится в культуре животных клеток и стоит достаточно дорого. Разработана технология продукции рекомбинантных антител в растительном продуценте *Nicotiana benthamiana* с высоким выходом очищенного белка.

**Цель исследования** — сравнение аффинных свойств рекомбинантных антител, полученных классическим способом в культуре клеток и полученных в растительной биомассе.

**Материалы и методы.** Рекомбинантные фитоантитела выделяли методом аффинной хроматографии из биомассы растений *N. benthamiana*, агроинфильтрованных векторными конструкциями. Сравнение аффинных свойств проводили методами иммуноцитохимической окраски клеток, конкурентного связывания нативным эпитопом с анализом методом проточной цитофлуориметрии.

**Результаты и заключение.** В данной работе нами установлено, что антитела, экспрессированные в *N. benthamiana*, не уступают аналогам, полученным из клеток млекопитающих, в связывании антигена Her2 на поверхности мембран клеток SK-BR-3. В настоящей работе впервые показано, что полученные фитоантитела анти-Her2 не отличаются от трастузумаба по специфичному связыванию с антигеном Her2, а также с IV субдоменом рецептора Her2.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, терапевтические антитела, продукция антител в растениях

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-95-100

### AFFINITY PROPERTIES OF PLANT-MADE ANTI-HER2 ANTIBODIES

A.I. Scherbakov<sup>1</sup>, E.N. Kosobokova<sup>1</sup>, M.V. Pinyugina<sup>1</sup>, E.V. Sheshukova<sup>2</sup>, V.S. Kosorukov<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences; 3 Gubkina St., Moscow 119991, Russia

**Introduction.** The Her2 receptor is an important target for antitumor therapy in the treatment of breast cancer. Trastuzumab, based on anti-Her2 monoclonal antibodies, is used in clinical practice. Trastuzumab is produced by animal cells culture technology and is quite expensive. We use the technology of production of recombinant antibodies in the plants *Nicotiana benthamiana* with a high yield of final purified protein.

**Objective.** The aim of following study is a comparison of monoclonal antibodies received via classic cell culture technology and produced in plant biomass.

**Materials and methods.** Recombinant plant-made antibodies were isolated by affinity chromatography from the biomass of *N. benthamiana* plants agroinfiltrated by vector constructs. Comparison of affinity properties was carried out by immunocytochemical staining of cells and competitive binding using flow cytometry analysis.

**Results and conclusion.** We show that the antibodies expressed in *N. benthamiana* are equal to those obtained from mammalian cells in binding to Her2 antigen localized on the surface of the SK-BR-3 cells. In the present work it was shown that the plant-made anti-Her2 antibodies do not differ in specific binding with the Her2 antigen, as well as with IV subdomain of the Her2 receptor.

**Key words:** breast cancer, therapeutic antibodies, plant-made antibodies

#### Введение

В мире ежегодно регистрируется более 1 млн новых случаев рака молочной железы (РМЖ), а в РФ более 50 тыс., вследствие чего это заболевание по-прежнему является актуальной и серьезной проблемой здравоохранения.

Около 25–30 % случаев РМЖ — это Her2-положительный РМЖ [1, 2]. Her2 (human epidermal growth factor receptor 2, человеческий рецептор эпидермального фактора роста 2-го типа) — трансмембранная тирозиновая протеинкиназа ErbB2, молекулярная масса которой составляет 185 кДа. В организме

человека Her2 экспрессируется и в здоровых тканях. Для опухолевых клеток РМЖ характерна гиперэкспрессия Her2. Повышение уровня Her2 означает прогрессирование развития опухоли, так как он отвечает за рост опухоли. Также гиперэкспрессия Her2 вызывает ускоренное метастазирование и устойчивость к химиопрепаратам. Таким образом, рецепторы Her2 являются важной мишенью противоопухолевой терапии [3].

В конце 1990-х годов в клиническую практику был введен таргетный препарат на основе моноклональных антител – трастузумаб (герцептин; Genetech, Сан-Франциско, Калифорния). Механизм действия трастузумаба основан на том, что он обладает высоким сродством к рецептору Her2/neu и, связываясь с ним, предотвращает пролиферацию в клетках РМЖ. Применение трастузумаба смогло повысить эффективность лечения и продлить жизнь пациентов с Her2-положительным РМЖ. Показано, что использование трастузумаба в терапии РМЖ снижает риск развития отдаленных метастазов и тем самым увеличивает выживаемость пациентов [4]. Трастузумаб производится в культуре животных клеток и является дорогостоящим препаратом.

Классическая система получения терапевтических антител предполагает их экспрессию в генетически модифицированных культурах клеток. Технология достаточно дорогая и сложная. Альтернативой может быть получение рекомбинантных лекарственных препаратов, в частности терапевтических антител, в растениях методом транзитной экспрессии [5, 6]. Антитела, экспрессированные в растениях, не уступают аналогам, полученным из клеток млекопитающих, в противоопухолевой активности в отношении клеточных культур, которые экспрессируют Her2/neu на поверхности мембран [7, 8]. Способность к модификации системы гликозилирования растений позволяет получать антитела с профилем гликозилирования, близким к таковому у человека [9].

В настоящей работе впервые показано, что полученные фитоантитела анти-Her2 не отличаются от трастузумаба по специфичному связыванию с антигеном Her2, а также с IV субдоменом рецептора Her2/neu.

### Материалы и методы

#### Накопление рекомбинантных антител в листьях.

Фитоантитела получали в листовой пластине *Nicotiana benthamiana* методом транзитной экспрессии. Полностью сформированные листья растения *N. benthamiana* обрабатывали агробактериями *Agrobacterium tumefaciens* (штамм GV3101), которые подвергаются трансформации соответствующими плазмидами pA16571 и pA16671, кодирующими легкую и тяжелую цепи антитела, в том числе плазмидой 35S-P19, кодирующей антисайленсинговый белок P19 [10]. По-

сле инкубации растений в течение 4–6 сут листья собирали и замораживали в жидком азоте.

#### Получение и очистка фитоантител анти-Her2.

Для внедрения вирусных векторов в клетки листьев *N. benthamiana* применяли методику агроинфекции. Инфицирование осуществляли культурами клеток штамма *A. tumefaciens* GV3101, которые были предварительно трансформированы конструкциями VTM-PT-NC и PVX-PT-LC. Эти конструкции обеспечивали экспрессию тяжелых и легких цепей рекомбинантного антитела анти-Her2 в клетках растения. Для повышения уровня экспрессии и наработки целевого белка использовали конструкцию, которая кодирует антисайленсинговый белок P19 вируса кустистой карликовости томатов.

Сбор листьев осуществляли через 3 сут после агроинфекции. Листья гомогенизировали и подвергали экстракции. Затем экстракт пропускали через систему фильтров и очищали методами аффинной и гель-фильтрационной хроматографии. Контроль и оценку уровня экспрессии фитоантител анти-Her2 осуществляли с помощью метода иммуоферментного анализа.

**Экстракция целевого белка из листьев *N. benthamiana*.** Листья измельчали в гомогенизаторе с добавлением буфера для экстракции (200 мМ натрия цитрат, 5 мМ этилендиаминтетраацетат, 0,1 % Tween 20, pH 6,0). Раствор фильтровали через фильтры 20, 1,2 и 0,2 мкм. Фильтрат наносили на колонку HiTrap MabSelect SuRe 5 мл (GE Healthcare, США). Элюцию проводили глицином 100 мМ pH 2,7. На финальном этапе очистки целевого белка применяли гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, США).

#### Иммуноцитохимический анализ гиперэкспрессии антигена Her2 с помощью фитоантител анти-Her2.

Клеточные линии SK-BR-3, полученные из банка клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, культивировали на стеклах в чашках Петри в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов, при 37 °C в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Контроль прикрепления клеток осуществляли визуально под микроскопом. После прикрепления клеток к стеклу аккуратно наливали в чашку 8–10 мл среды. После образования клетками 80 % монослоя стекла промывали 2 раза в PBS (фосфатно-солевой буфер 2 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,3), просушивали на воздухе. Затем наносили первичные антитела (фитоантитела анти-Her2/контрольные антитела) в разведении 1:500, инкубировали в течение ночи при +4 °C. На следующий день отмывали 2 раза в PBS

и наносили вторичные антитела против IgG человека, меченные FITC (флуоресцеин-5-изотиоцианатом). Инкубировали 45 мин при +4 °С во влажной камере. Отмывали стекла 2 раза в PBS в течение 5 мин, после этого наносили краситель для ядер Hoechst-33258 и инкубировали 15 мин во влажной камере. Промывали стекла 2 раза в PBS в течение 5 мин, просушивали и заключали под покровные стекла с помощью Fluorescent Mounting Medium (Daco, Дания).

Через сутки оценивали результаты на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

**Проточная цитофлуориметрия.** Для оценки биологической активности фитоантител анти-Her2 был использован метод проточной цитофлуориметрии. Оценивалось связывание антител анти-Her2 с клетками SK-BR-3. Клеточные линии получены из банка клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

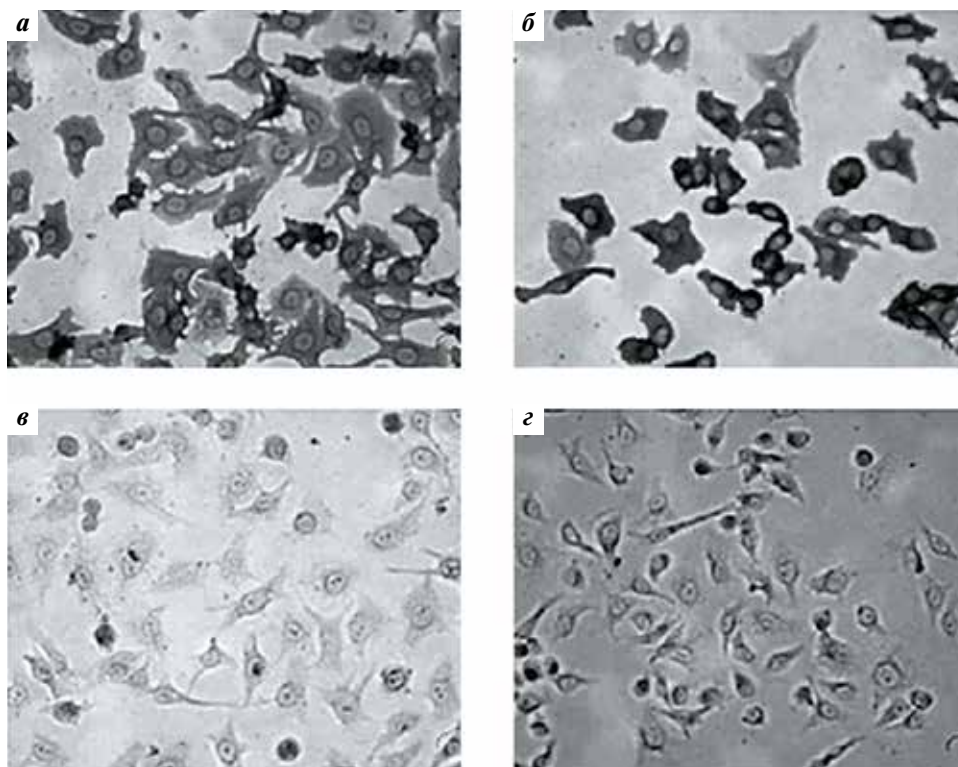
Клетки SK-BR-3 собирали в количестве  $5 \times 10^5$  и отмывали 2 раза в растворе PBS (pH 7,5). Клеточную суспензию (50 мкл) помещали в пробирки и инкубировали с 20 мкл образца антител в соответствующем разведении в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого клетки отмывали PBS посредством центрифугирования при 1200 об/мин

в течение 7 мин. Далее клетки инкубировали с 20 мкл козьей антисыворотки против иммуноглобулинов человека, меченной FITC, в течение 30 мин при температуре 4 °С. После этого клетки отмывали 2 раза в растворе PBS и ресуспендировали раствором PBS, содержащим 1 % формалина и 0,1 % азида натрия.

Анализ результатов проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре BD FACS Cento II (Becton Dickinson, США) на базе программного обеспечения CellQuest. В качестве контрольного образца использовали препарат трастузумаб фирмы Roche.

### Результаты

**Анализ специфической активности фитоантител анти-Her2 *in vitro*.** В процессе исследования активности полученных фитоантител анти-Her2 применяли иммуноцитохимический тест. Работу проводили с Her2-положительными клетками РМЖ SK-BR-3. Специфичность связывания тестировали с помощью кроличьих антител против антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. В качестве положительного контроля выступали диагностические антитела, специфичные к Her2 (Dako, Дания), в качестве отрицательного — кроличьи антитела (рис. 1).



**Рис. 1.** Результаты анализа специфической активности полученных фитоантител анти-Her2: а — цитологический анализ клеток SK-BR-3, экспрессирующих онкоген Her2 и обработанных фитоантителами анти-Her2; б — клетки SK-BR-3 после обработки диагностическими антителами, специфичными к Her2; в и г — отрицательные контроли соответственно к а и б, полученные путем обработки клеток SK-BR-3 только кроличьими антителами

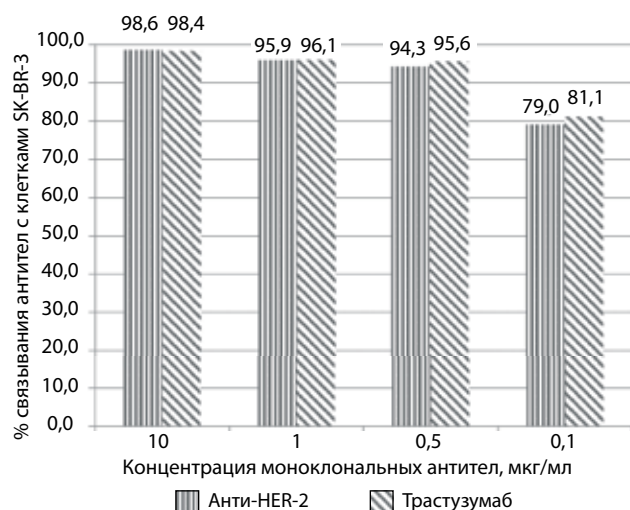


Рис. 2. Результаты связывания фитоантител анти-*Her2* с клетками SK-BR-3 при анализе на проточном цитофлуориметре

**Сравнение эффективности специфического связывания анти-*Her2* фитоантител и трастузумаба с антигеном *Her2*.** Для подтверждения связывания полученных фитоантител анти-*Her2* с рецептором *Her2* в сравнении с трастузумабом проводили серию экспериментов с *Her2*-положительными клетками РМЖ линии SK-BR-3 методом проточной цитофлуориметрии. В качестве контрольного образца использовали препарат трастузумаб.

В результате проведенных экспериментов был показан высокий процент связывания фитоантител анти-*Her2* с рецепторами *Her2* на поверхности клеток SK-BR-3 (от 69,1 до 100 % в зависимости от концентрации антител) (рис. 2). Этот результат идентичен данным, полученным при исследовании трастузумаба. Образцы фитоантител анти-*Her2* не отличаются по способности связываться с антигеном *Her2* на поверхности клеток РМЖ SK-BR-3 от препарата сравнения трастузумаба.

**Анализ эффективности связывания фитоантител анти-*Her2* с IV субдоменом внеклеточного домена рецептора *Her2*.** Для анализа связывания полученных фитоантител анти-*Her2* с IV субдоменом внеклеточного домена рецептора *Her2* была разработана методика анализа конкурентного связывания с антигеном *Her2* между фитоантителами анти-*Her2* и трастузумабом. Эксперимент осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием клеток, гиперэкспрессирующих антиген *Her2*, — SK-BR-3. Оценивалось связывание меченых антител анти-*Her2* с клетками SK-BR-3, обработанными фитоантителами анти-*Her2* или трастузумабом.

Для этого клетки SK-BR-3 предварительно обрабатывали фитоантителами анти-*Her2* либо трастузумабом, после чего инкубировали обработанные клетки с мечеными FITC образцами фитоантител

анти-*Her2* и трастузумаба различной концентрации (рис. 3). В случае если антитела связывают разные антигенные эпитопы, будет наблюдаться полноценное окрашивание клеток антителами, мечеными FITC. При совпадении эпитопов отмечается отсутствие или значительное снижение получаемого окрашивания. Проценты рассчитывали от 100 % окрашивания клеток без конкуренции соответствующим типом антител.

Полученные результаты показали, что при инкубации клеток SK-BR-3 как с фитоантителами анти-*Her2*, так и с трастузумабом происходило практически полное связывание рецепторов *Her2* на поверхности клеток с антителами и не оставалось свободных аффинных эпитопов.

В результате проведенных экспериментов выявлен низкий процент связывания фитоантител анти-*Her2*, меченных FITC, с рецепторами *Her2* на поверхности клеток SK-BR-3, обработанных трастузумабом (от 0,2 до 13,3 % в зависимости от концентрации антител). Аналогично показан низкий процент связывания трастузумаба, меченного FITC, с рецепторами *Her2* на поверхности клеток SK-BR-3, обработанных фитоантителами анти-*Her2* (от 0,8 до 13,8 % в зависимости от концентрации антител) (рис. 4). Результат идентичен данным, полученным при исследовании трастузумаба. Это свидетельствует о том, что образцы фитоантител анти-*Her2* связываются с тем же доменом антигена *Her2* на поверхности клеток РМЖ SK-BR-3, что и препарат сравнения — трастузумаб.

### Обсуждение

Применение трастузумаба радикально изменило лечение РМЖ, в результате этого в руках онкологов появилось инновационное средство, которое смогло повысить эффективность лечения или продлить жизнь больных *Her2*-положительным РМЖ.

В нашей работе экспрессию и наработку фитоантител анти-*Her2* осуществляли в растениях *N. benthamiana*.

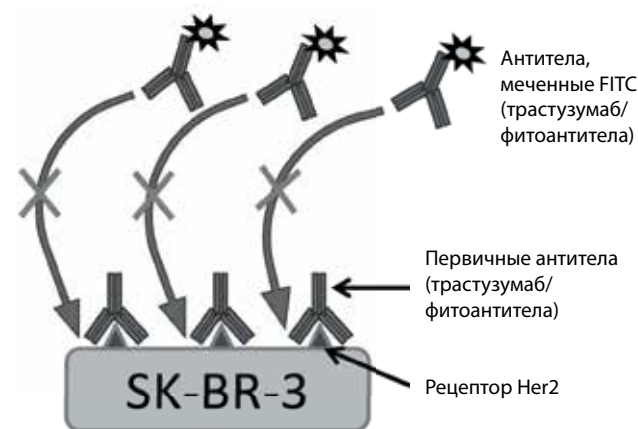


Рис. 3. Схема эксперимента конкурентного связывания рекомбинантных антител с клетками SK-BR-3

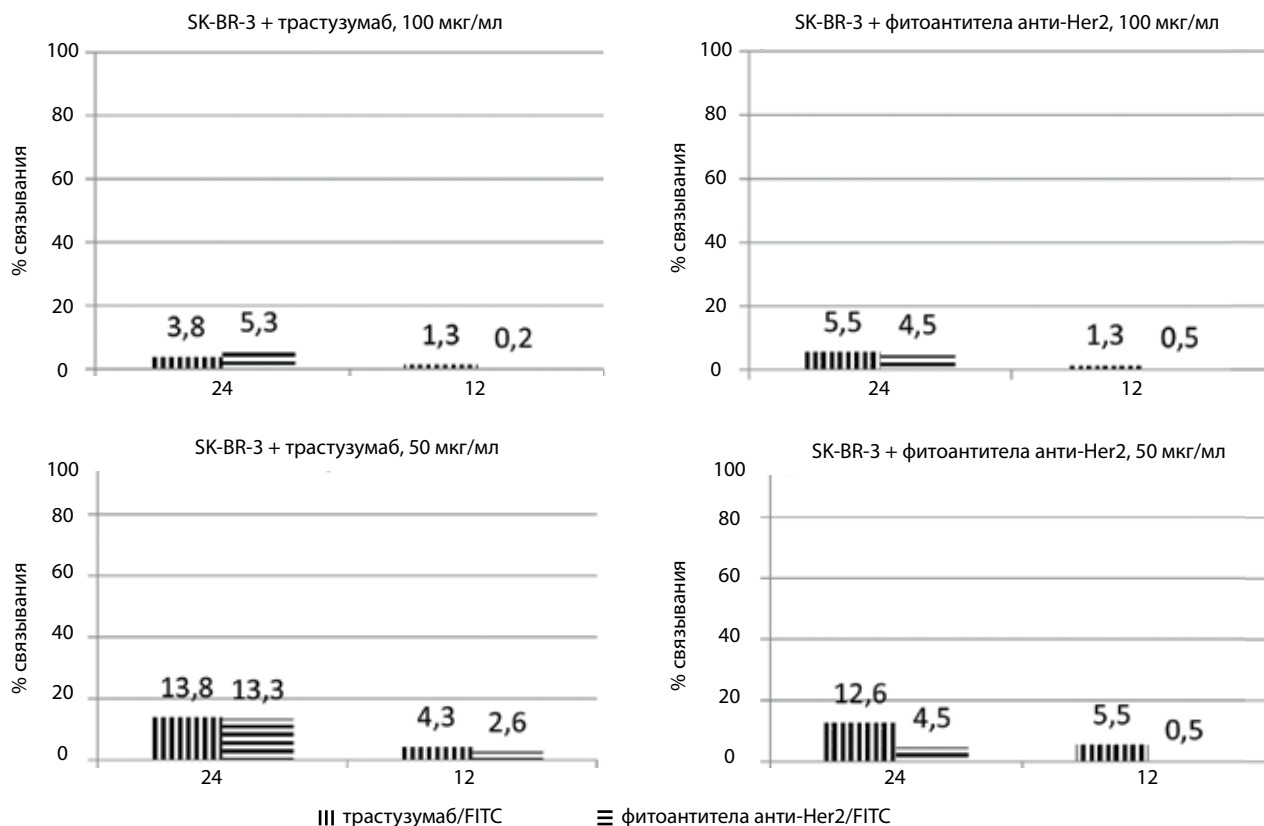


Рис. 4. Результаты эксперимента по определению конкурентного связывания рекомбинантных антител с клетками SK-BR-3 на проточном цитофлуориметре

*miana*. Для этого листья *N. benthamiana* инфицировали клетками *A. tumefaciens*, трансформированными соответствующими генными конструкциями. Эти конструкции обеспечивали экспрессию тяжелых и легких цепей рекомбинантного антитела анти-Her2 в клетках растения. После сбора растительного материала проводили экстракцию фитоантител анти-Her2 с последующей поэтапной очисткой.

Нами было проведено исследование с целью доказательства активности полученных анти-Her2 фитоантител, для этого использовали иммуноцитохимический тест. Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что полученные анти-Her2 фитоантитела способны специфически узнавать клетки РМЖ SK-BR-3 и связываться с ними.

Исследование специфической активности такого multifunctional вещества, как моноклональное антитело, можно проводить по нескольким параметрам. В первую очередь подлежит оценке эффективность связывания моноклональных антител с целевым антигеном Her2.

Полученные данные демонстрируют совпадение в аффинных свойствах трастузумаба и фитоантител анти-Her2 как по степени связывания антигена, так и по локализации аффинного эпитопа на молекуле Her2. Метод проточной цитофлуориметрии позволяет оценить эти параметры на нативном антигене, локализованном на мембране клеток. Также была выявлена высокая степень связывания фитоантител анти-Her2 с рецепторами Her2 на поверхности клеток SK-BR-3, аналогичная связыванию контрольного препарата трастузумаба.

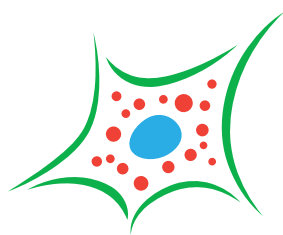
### Заключение

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что образцы фитоантител анти-Her2, полученных из растения *N. benthamiana*, связываются с тем же IV доменом онкоантигена Her2, что и трастузумаб, с аналогичной аффинностью. В связи с этим можно сделать вывод о том, что полученные фитоантитела анти-Her2 функционально соответствуют трастузумабу.

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

1. Давыдов М.И. Структура заболеваемости злокачественными новообразованиями населения России в 2008 г. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2010;21(2):52.
2. Чиссов В.И. Злокачественные новообразования в России в 2010 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздравсоцразвития России, 2012. 260 с.
3. Hudziak R.M., Lewis G.D., Winget M. et al. p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. Mol Cell Biol 1989;3:1165–72. DOI: 10.1128/MCB.9.3.1165.
4. Komarova T.V., Kosorukov V.S., Frolova O.Y. et al. Plant-made trastuzumab (herceptin) inhibits HER2/Neu+ cell proliferation and retards tumor growth. PLoS One 2011:e17541. DOI: 10.1371/journal.pone.0017541.
5. Кособокова Е.Н., Пинюгина М.В., Косоруков В.С. Получение биологически активного интерферона- $\alpha$ -2b человека из растений *Nicotiana benthamiana*. Биотехнология 2015;4:52–61.
6. Stepkowski Z., Sun L.K., Shearman C.W. et al. Biological activity of human – mouse IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4 chimeric monoclonal antibodies with antitumor specificity. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85(13):4852–6. PMID: 3387441.
7. Косоруков В.С., Скрыпник К.А., Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Противоопухолевое действие субстанции рекомбинантных антител против онкоантигена HER2/neu, полученной из растительного продуцента. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):4.
8. Dorokhov Y.L., Frolova O.Y., Skurat E.V. et al. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the enhancer of RNA silencing. FEBS Lett 2006;580:3872–8. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.013.
9. Komarova T.V., Sheshukova E.V., Kosobokova E.N. et al. Trastuzumab and pertuzumab plant biosimilars: Modification of Asn297-linked glycan of the mAbs produced in a plant with fucosyltransferase and xylosyltransferase gene knockouts. Biochemistry (Moscow) 2017;82(4):510–20. DOI: 10.1134/S0006297917040137.
10. Косоруков В.С., Кособокова Е.Н., Пинюгина М.В. и др. Биологическая активность рекомбинантных антител против рецептора Her2, полученных из растительного источника. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):105–12.





# CTERP

CELL TECHNOLOGIES AT THE EDGE: RESEARCH & PRACTICE

# 2018

## April 11-13

**We are pleased to announce the  
2nd international conference**

## TRANSLATIONAL RESEARCH IN CELL THERAPY

In recent years there have been rapid advances in applying the discoveries in cell technologies field into medical practice. Cell technologies are progressing as the result of multidisciplinary effort of scientists, clinicians and businessmen, with clinical applications of manipulated stem cells combining developments in transplantation and gene therapy. Challenges address not only the technology itself but also compliance with safety and regulatory requirements. The Conference will provide a platform for scientists from basic and applied cell biology fields, practical doctors, and biotech companies to meet and share their experience, to discuss the research associated with developing biomedical clinical products and translating this research into novel clinical applications, challenges of such translational efforts and foundation of bioclusters assisting further developments in cell technology.

Find more information and register at [www.cterp.org](http://www.cterp.org)

### MAIN TOPICS

- Basic Problems of Cell Research
- Cell Therapy and Regenerative Medicine Industry Today
- Best Practice in Cell Therapy and Cell Products Development
- Personalized Medicine
- Tissue Engineering
- Biobanking
- Gene Editing for Cell Therapy and Research
- Commercialization of Cell Technology and Biomaterials-based Products and Therapies
- Cellular Disease Models

### KEY DATES

#### Registration

17, October 2017 - 31, March 2018

#### Abstract submission

20, October 2017 - 28, February 2018

#### Registration payment

1, November 2017 - 1, March 2018

### INVITED SPEAKERS

- **Prof. Mark Lowdell**  
Centre for Cell, Gene & Tissue Therapy,  
Royal Free London NHS FT & UCL
- **Prof. Dr. Hans R. Schöler**  
Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Münster
- **Dr. Stephen Sullivan**  
PhD MBA FRSM GAiT (Global Alliance for iPSC Therapies)  
Edinburgh, UK
- **Dr. Jens Christian Schwamborn**  
Université du Luxembourg

### VENUE

- NOVOTEL MOSCOW CITY  
Presnenskaya naberezhnaya 2,  
Moscow, Russia

### ORGANIZERS

- Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences
- Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St-Petersburg
- OPTEC Company



Koltzov Institute  
of Developmental Biology  
of Russian Academy  
of Sciences



INSTITUTE  
OF CYTOLOGY  
RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES

OPTEC  
Connecting solutions