



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

4

TOM 17
2018

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

С 2016 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

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

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

4^{ТOM 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
rbjournal@ronc.ru

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

Редактор А.Г. Шегай
Корректоры Т.Н. Помилуйко,
Н.А. Виленкина
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. № 4. 1–00
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2018
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» – 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 1000 экз.
[http://www.ronc.ru/specialists/usefull/
journals/138/](http://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/)
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>



Екатеринбург

Россия

4-Я РОССИЙСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ MEDCHEM RUSSIA 2019

9–14
ИЮНЯ
2019

Дорогие друзья и коллеги!

Организационный комитет конференции МедХим-Россия 2019 сердечно приглашает академических и университетских исследователей, зарубежных ученых, представителей фармацевтического бизнеса и медицины, аспирантов и студентов посетить 4-ю Российскую конференцию по медицинской химии.

Конференция проводится в рамках XXI Менделеевского съезда по общей и прикладной химии.

ДАТЫ ПРОВЕДЕНИЯ: 9–14 июня 2019 года

МЕСТО ПРОВЕДЕНИЯ: Уральский федеральный университет им. первого Президента России Б.Н. Ельцина – УрФУ, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19.
Институт физики металлов им. М.Н. Михеева УрО РАН, –
ИФМ УрО РАН, г. Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 18

ПРОГРАММА

Программа конференции включает в себя пленарные лекции, устные доклады, постерную сессию, молодежную школу-конференцию по медицинской химии, а также дискуссии в рамках круглых столов.

Научная программа охватывает следующие темы:

- Инновационные разработки в актуальных терапевтических областях;
- Новые синтетические и технологические подходы в медицинской химии;
- Компьютерное прогнозирование, виртуальный скрининг, био- и хемоинформатика;
- Нанокompозиты, системы доставки лекарств;
- Разработка инновационных противоопухолевых препаратов;
- Новые материалы для медицины;
- Клеточные технологии, разработка биофармацевтических препаратов.

САТЕЛЛИТНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ:

XVI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием имени А.Ю. Барышникова «Новые отечественные противоопухолевые препараты и медицинские технологии: проблемы, достижения, перспективы»

Сайт – <http://medchem2019.uran.ru>

Будем рады видеть Вас в Екатеринбурге!

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 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 BY PROFESSOR A.YU. BARYSHNIKOV

4 VOL. 17
'18

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

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

Editorial Office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse,
Build. 15, Moscow 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor A.G. Shegav
Proofreaders T.N. Pomiluyko, N.A. Vilenkina
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 № ФС77-53039 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. No4, 1–00
© PH “ABV-Press”, 2018
Rospechat catalogue index: 81679
Printed at the Mediacolor LLC 1,000 copies

<https://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>
<http://biotrapevt.elpub.ru/jour/index>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Н.К. Клаан, Л.П. Акинъшина, Т.А. Пронина</i> Онколитические вирусы в терапии злокачественных новообразований	6
<i>М.П. Киселева, В.С. Покровский, В.В. Татарский, Л.М. Борисова, И.С. Голубева, Л.В. Эктова</i> Производные индолокарбазолов – перспективный класс противоопухолевых препаратов	20
<i>И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина, Л.Ф. Морозова, Н.В. Андропова, И.Ж. Шубина, А.А. Лушикова</i> Клеточные линии меланомы человека и их ксенографты с мутациями <i>BRAF</i> или <i>NRAS</i> в качестве мишеней для таргетной терапии. Обзор	27
<i>М.А. Барышникова, В.С. Косоруков</i> Адьюванты в вакцинотерапии опухолей	36
<i>С.А. Ашуба, Э.Ш. Соломко, Д.А. Хоченков, А.А. Осипова, Е.В. Степанова</i> Биомаркеры почечно-клеточного рака	45

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Н.Н. Тупицын, Чэн Цзяо, П.А. Зейналова</i> Имунофенотипическое изучение дифференцировки эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой	52
<i>Чэн Цзяо, П.А. Зейналова</i> Прогностически значимые изменения состава миелограммы у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой	58
<i>С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, Н.В. Грищенко, Д.А. Рябчиков, Л.Ю. Гривцова, И.С. Базин, Н.Н. Тупицын</i> Ключевая роль популяций В1-лимфоцитов в иммунном ответе у больных раком желудка	64
<i>А.А. Рудакова, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарёв, О.С. Бурова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова</i> Исследование воздействия аранозы, цисплатина и паклитаксела в монорежиме и в сочетании на активность PD–L1 и PD–L2 в клетках меланомы	71
<i>Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, С.В. Минаев</i> Особенности фармацевтической разработки лиофилизата ГК-2 для парентерального применения	81
<i>Э.Р. Переверзева, М.И. Трещалин, В.А. Голибродо, А.Н. Тевяшова, И.Д. Трещалин</i> Изучение токсичности оливамида в хроническом эксперименте на кроликах	91
<i>В.А. Чалей, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, В.М. Бухман, Н.Ю. Кульбачевская</i> Предклиническое токсикологическое исследование ормустина при применении у крыс в условиях субхронического эксперимента	98
<i>Ф.М. Кипкеева, Т.А. Музаффарова, М.П. Никулин, П.В. Апанович, С.Н. Неред, М.Н. Нариманов, О.А. Малихова, Т.А. Богуш, И.С. Стилиди, А.В. Карпухин</i> Ассоциация экспрессии генов основных сигнальных путей развития рака желудка с его метастазированием	106
<i>Т.А. Богуш, О.М. Рябинина, М.И. Папулина, Е.А. Богуш, А.Н. Гришанина, А.В. Карпухин, Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов</i> Уровень экспрессии и коэкспрессии эстрогеновых рецепторов α и β в ткани немелкоклеточного рака легких	111

REVIEWS

<i>N.K. Klaan, L.P. Akin'shina, T.A. Pronina</i> Oncolitical viruses in the therapy of malignant neoplastic diseases	6
<i>M.P. Kiseleva, V.S. Pokrovsky, V.V. Tataskiy, L.M. Borisova, I.S. Golubeva, L.V. Ektova</i> Indolocarbazole derivatives – a promising class of anticancer drugs	20
<i>I.N. Mikhaylova, E.M. Treshalina, L.F. Morozova, N.V. Andronova, I.Zh. Shubina, A.A. Lushnikova</i> Cell lines of human melanoma and their xenograft with braf or nras mutations a targets for targeted therapy. Reviews	27
<i>M.A. Baryshnikova, V.S. Kosorukov</i> Cancer vaccine adjuvants	36
<i>S.A. Aschuba, E.S. Solomko, D.A. Khochenkov, A.A. Osipova, E.V. Stepanova</i> Biomarkers of renal cell carcinoma	45

ORIGINAL REPORTS

<i>N.N. Tupitsyn, Cheng Jiao, P.A. Zeynalova</i> Immunophenotypic study of bone marrow erythrocyte differentiation in patients with diffuse large B-cell lymphoma	52
<i>Cheng Jiao, P.A. Zeynalova</i> Prognostically significant bone marrow cellular content changes in diffuse large B-cell lymphoma	58
<i>S.V. Chulkova, E.N. Sholokhova, N.V. Grishchenko, D.A. Ryabchikov, L.Y. Gritsova, I.S. Bazin, N.N. Tupitsyn</i> The role of B-1 lymphocytes in antitumor immunity in patients with gastric cancer	64
<i>A.A. Rudakova, V.A. Misyurin, A.V. Ponomarev, O.S. Burova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova</i> The effects of aranose, cisplatin or paclitaxel in monotherapy and in combination on the expression of PD–L1 and PD–L2 in melanoma cells	71
<i>E.V. Blynskaya, S.V. Tishkov, K.V. Alekseyev, S.V. Minaev</i> Features pharmaceutical development lyophilisate GK-2 for parenteral use	81
<i>E.R. Pereverzeva, M.I. Treschalin, V.A. Golibrodo, A.N. Tevyashova, I.D. Treschalin</i> Toxicological study of olivamide in chronic experiment on rabbits	91
<i>V.A. Chaley, O.I. Konyaeva, N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, T.V. Abramova, V.M. Bukhman, N.Yu. Kulbachevskaya</i> Pre-clinical study of subchronic toxicity of ormustine on rats	98
<i>F.M. Kipkeeva, T.A. Muzaffarova, M.P. Nikulin, P.V. Apanovich, S.N. Nered, M.N. Narimanov, O.A. Malekhova, T.A. Bogush, I.S. Stilidi, A.V. Karpukhin</i> Association of gastric cancer main signaling pathway gene expression with metastasis	106
<i>T.A. Bogush, O.M. Ryabinina, M.I. Papulina, E.A. Bogush, A.N. Grishanina, A.V. Karpukhin, B.E. Polotsky, M.M. Davydov</i> Level of estrogen receptor α and β expression and coexpression in non-small cell lung cancer tissue	111

ОНКОЛИТИЧЕСКИЕ ВИРУСЫ В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Н.К. Клаан, Л.П. Акиншина, Т.А. Пронина

ФГБУ «Всероссийский институт научной и технической информации»; Россия, 125190 Москва, А-190, ул. Усиевича, 20

Контакты: Наталья Константиновна Клаан biolog@viniti.ru

В обзоре охарактеризованы основные типы онколитических вирусов, рассмотрены механизмы их действия на опухолевую клетку. Приведены примеры оптимизации вирусного генома с целью усиления онколитических свойств вируса. Описаны достижения в области создания противоопухолевых средств на основе онколитических вирусов и способы их применения в онкологии.

Ключевые слова: онколитические вирусы, механизм действия, рекомбинантные онколитические вирусы

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-6-19

ONCOLITICAL VIRUSES IN THE THERAPY OF MALIGNANT NEOPLASTIC DISEASES

N.K. Klaan, L.P. Akin'shina, T.A. Pronina

All-Russian Institute Scientific and Technical Information; 20, Usievicha St., A-190, Moscow 125190, Russia

The main types of oncolytic viruses and the mechanisms of their action on the tumor cells are described in this review. Examples of optimization of the viral genome are given with a view to enhancing the oncolytic properties of the virus. The achievements in the field of development of antitumour agents based on oncolytic viruses and methods of their application in oncology are described.

Key words: oncolytic viruses, mechanism of action, recombinant oncolytic viruses

Введение

Злокачественные опухоли — одна из главных причин смертности в развитых странах, и этот показатель продолжает расти, несмотря на прогресс в увеличении выживаемости больных раком, достигнутый в результате совершенствования методов диагностики и изучения молекулярных процессов канцерогенеза. При этом внедрение в клиническую практику химио-, эндокрино-, иммуно- и лучевой терапии не увеличивает выживаемость больных при наличии на момент диагностики отдаленных метастазов, оставляя этот показатель на низком уровне. Хирургическое лечение и радиотерапия дают эффект исключительно при локализованном процессе и не могут препятствовать развитию отдаленных метастазов, а возможности лекарственной терапии ограничены не только токсичностью противоопухолевых средств, но и первичной и приобретенной лекарственной устойчивостью опухолей.

В настоящее время основные усилия ученых и врачей направлены на поиски лекарственных средств, вызывающих селективную гибель опухолевых клеток, преодоление лекарственной устойчивости без ухудшения при этом качества жизни больных. С этой точки зрения некоторые классы

противоопухолевых средств, направленные на угнетение патогенетических путей канцерогенеза, так называемые таргетные препараты, могут существенно улучшить результаты терапии онкологических заболеваний. К ним относятся моноклональные антитела, модификаторы биологического ответа, ингибиторы ангиогенеза, модуляторы путей передачи сигналов, средства генотерапии, в том числе антисмысловые олигонуклеотиды, ингибиторы теломеразы и различных протеинкиназ. Перспективным классом противоопухолевых средств являются онкотропные экзогенные вирусы, способные доставлять в клетку закодированную в их геноме информацию. Они инфицируют опухолевые клетки, реплицируются в них и затем лизируют, оказывая, в отличие от традиционных терапевтических средств, минимальное влияние на здоровые клетки. Открытие онколитических вирусов заложило основу для создания нового перспективного направления терапии рака — виротерапии [1–6]. В настоящее время число публикаций, посвященных тематике онколиза, в том числе в реферативном журнале «Онкология», неуклонно растет, что указывает на интерес исследователей к этому направлению противоопухолевой терапии.

Характеристика вирусов, обладающих онколитическими свойствами

Онколитическое действие вирусов обнаружено в начале прошлого века. Клиницисты давно подметили, что иногда у больных даже с генерализованными онкологическими заболеваниями опухоли спонтанно регрессируют [7]. Примером может служить опубликованное в 1912 г. одно из первых сообщений, описывающее регрессию рака шейки матки у женщины, которой после укуса собаки была введена вакцина на основе аттенуированного вируса бешенства, что позволило установить взаимосвязь между регрессией опухоли и вирусной инфекцией [8]. Такие наблюдения навели исследователей на идею использования вирусов для лечения онкологических заболеваний.

В последней трети прошлого века в СССР применение онколитических вирусов для виротерапии злокачественных новообразований изучалось в основном на модели энтеровирусов в Институте микробиологии им. Кирхенштейна (Рига, Латвия) [9–13]. Однако такие причины, как низкий тропизм онколитических вирусов к конкретным опухолям, слабая избирательность, недостаточность информации о молекулярных механизмах онколиза, а также отсутствие адекватных моделей *in vitro* и *in vivo* тормозили развитие этого направления. И только начиная с 90-х годов прошлого столетия успехи молекулярной биологии, генетики и вирусологии привели к относительному прогрессу в понимании фундаментальных механизмов вирусного канцерогенеза, молекулярных процессов взаимодействия вируса и клетки-хозяина, создали предпосылки для возобновления поиска специфических онколитических вирусов.

В 1991 г. появилась успешная разработка способа лечения глиомы человека генетически модифицированным вирусом простого герпеса [14]. В настоящее время интенсивно изучаются ДНК- и РНК-содержащие вирусы различных семейств (аденовирусы, герпесвирусы, поксвирусы, парвовирусы, реовирусы, энтеровирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, тогавирусы и др.), обладающие онколитическими свойствами.

Онколитические вирусы имеют различные типы генома, морфологию, тропизм, происхождение (природные или генномодифицированные), относятся к условно-патогенным или патогенным для человека. Известно, что отнесение вируса к конкретному семейству определяется типом нуклеиновой кислоты, структурой генома, а также наличием или отсутствием внешней оболочки. Ниже мы охарактеризуем ряд семейств вирусов, обладающих онколитическими свойствами.

Аденовирусы (семейство *Adenoviridae*). Идентифицировано более 50 серотипов аденовируса, вызывающих инфекции (острые респираторные заболева-

ния, тонзиллит, отит, конъюнктивит, гастроэнтерит) у позвоночных и человека. Аденовирусы используются в качестве вирусных векторов для генотерапии и в онколитической терапии [15–23]. Для лизиса опухолей часто применяется аденовирус серотипа 5 (*Ad5*) [20].

К герпесвирусам человека (семейство *Herpesviridae*) относят вирусы простого герпеса 1 и 2, вирус Эпштейна–Барр, вирус ветряной оспы, цитомегаловирус, ассоциированный с саркомой Капоши герпес-вирус, герпесвирусы человека типов 6 и 7 (розеоловирусы) [24, 25]. Перечисленные герпесвирусы вызывают у человека разные по тяжести заболевания, чаще всего кожи, слизистых оболочек, наружных половых органов, нервной системы, способны длительное время находиться в организме хозяина в латентном состоянии. В качестве онколитических используются вирусы простого герпеса типов 1 и 2, модифицированные методами генной инженерии [14, 25–28].

Семейство **поксвирусов** (*Poxviridae*) включает вирус осповакцины, вирус натуральной оспы и вирусы оспы позвоночных (обезьян, верблюдов, мышей, крупного рогатого скота, кур и других животных), а также вирус Орф, вирус папулезного стоматита крупного рогатого скота и ряд других. Для онколиза используются аттенуированные штаммы вируса осповакцины [3, 29–31].

К патогенным для человека **парвовирусам** (семейство *Parvoviridae*) в числе прочих относят вирус *RA-1*, обнаруженный в синовиальной оболочке суставов при ревматоидном артрите, аденоассоциированный вирус, репродукция которого происходит в присутствии аденовируса, что осложняет течение аденовирусных инфекций, а также вирус *B19*, вызывающий инфекционную эритему и хроническую гемолитическую анемию [32–33]. Парвовирусы могут реплицироваться в опухолевых клетках, вызывая их лизис [34–38].

В семействе **реовирусов** (*Reoviridae*) выделяют более 10 родов, которые вызывают инфекции у растений, рыб, птиц, диких и домашних животных, человека. Значимы для человека и животных вирусы рода ротавирусов и рода ортовирусов, вызывающие развитие желудочно-кишечных и респираторных инфекций, особенно у детей. Онколитические свойства реовирусов связаны с их способностью размножаться в трансформированных клетках и подавлять развитие опухолей различной локализации (желудочно-кишечный тракт, молочная железа, яичники, головной мозг, кровеносная система) [5, 39–44].

Семейство **пикорнавирусов** (*Picornaviridae*) насчитывает 31 род, из которых наибольшее значение имеют роды *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus* и *Hepatovirus*, вызывающие инфекции у позвоночных и человека. К энтеровирусам относятся поражающий

нервную систему вирус полиомиелита, вирус Коксаки, риновирусы, а также различные типы энтеровирусов, вызывающие кишечные инфекции. Способность к онколизу вируса Коксаки обнаружили в середине прошлого века [45–62]. В 1970-е годы М.К. Ворошилова и соавт. [46–63], А.Я. Муцениеце и соавт. [11] показали противоопухолевую активность эховирусов и вируса Коксаки. Онколитические энтеровирусы, такие как вирус полиомиелита, вирус Коксаки, эховирус, активно изучаются и находят применение в клинике для лечения различных опухолей [47–49].

К семейству **парамиксовирусов** (семейство *Paramyxoviridae*) относятся такие патогенные для человека и животных вирусы, как вирус болезни Ньюкасла (*NDV*) (птицы), вирус эпидемического паротита (человек), вирус Сендай (человек, мыши), вирусы парагриппа серотипов 1–4 (человек, млекопитающие, птицы), вирус кори (человек, обезьяны). Репликация вирионов происходит в цитоплазме, при этом в клетках образуются цитоплазматические или внутриядерные включения. Парамиксовирусы вызывают заболевания дыхательных путей, энцефалит, множественные точечные геморрагические поражения внутренних органов, конъюнктивит, пятнисто-папулезную сыпь кожных покровов, общую интоксикацию. Некоторые парамиксовирусы обладают онколитической активностью [4, 53–57]. К ним относятся аттенуированные штаммы вируса кори, *NDV*, вируса Сендай, которые разрушают опухолевые клетки и могут использоваться в составе противоопухолевых композиций [58–61].

Семейство **рабдовирусов** (семейства *Rhabdoviridae*) включает 13 родов. Среди них такие, как *Vesiculovirus* (9 вирусов млекопитающих, в их числе вирус везикулярного стоматита), *Lyssavirus* (14 серологически родственных вирусов, среди них вирус бешенства), *Sigmavirus* (единственный представитель – вирус сигма дрозофилы). Рабдовирусы вызывают инфекционные заболевания у растений, беспозвоночных и позвоночных животных, а также у человека. Заражение вирусом везикулярного стоматита млекопитающих приводит к соответствующим высыпаниям на слизистых оболочках и коже, но для человека он слабо патогенен. Обнаружены онколитические свойства этого вируса, который реплицируется в опухолевых клетках различного тканевого происхождения (глиома, рак легкого, рак толстой кишки, рак желудка и др.), подавляя их пролиферацию и индуцируя апоптоз [62–64].

Семейство **тогавирусов** (семейство *Togaviridae*) включает роды *Alphavirus* и *Rubivirus*. К альфавирусам относятся вирус Синдбис, вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей, вирус Карельской лихорадки, вирус Чикунгунья, вирус Ньонг-Ньонг, вирус леса Семлики. К рубивирусам относят вирус красну-

хи. Вызываемые тогавирусами инфекции у животных и человека ассоциированы с лихорадкой, энцефалитом, миалгией, сыпью, синдромом общей интоксикации [65]. Перспективен в отношении онколитической активности вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей, оказывающий выраженное деструктивное действие на клетки-мишени карциномы Эрлиха *in vitro* [66–69].

Ведется активная работа по оптимизации генома онколитических вирусов, проходят клинические испытания и уже применяются оптимизированные вирусы на основе вируса простого герпеса, аденовируса, *NDV* и ряда других [15, 19, 24, 53].

Механизмы действия онколитических вирусов

В настоящее время основными путями гибели инфицированных клеток считаются апоптоз, некроз и аутофагия [70]. При первичном контакте вируса и клетки происходит его адсорбция посредством электростатического взаимодействия разнозаряженных комплементарных групп (так называемых рецепторов) на поверхностях вируса и клетки, причем структура и состав контактных областей зависят от типа вируса и клетки. Контактные области взаимодействия «опухолевая клетка – вирус» содержат различные молекулы: сиаловые кислоты, пептиды и гликопротеины. Кроме того, вирусы, как паразиты, используют рецепторы, экспрессируемые на поверхности клеток различных органов, которые в норме осуществляют различные биологические функции. В частности, рецептор аденовирусов CD46 в норме участвует в регуляции активации комплемента, индукции аутофагии; рецептор полиовирусов CD155 в нормальных клетках участвует в процессах межклеточных взаимодействий. Функции так называемого первичного рецептора аденовирусов и вирусов Коксаки (CAR), вирусов герпеса и других вирусов в нормальных клетках еще до конца не изучены, но известно, что они участвуют в процессах клеточной адгезии. Возможно, именно уровень экспрессии таких рецепторов в тканях и определяет эффективность инфицирования и тропность вирусов к определенным тканям. Далее вирус проникает в клетку, в основном по типу пиноцитоза. Инфицирование клетки вирусом вызывает полное репрограммирование ее метаболизма, направленное на биосинтез молекул для создания новых вирионов, с результатом, зависящим как от типа клетки, так и от типа вируса. Конечная стадия репродукции вируса – его выход из клетки. Цитолитическое действие вирусов проявляется как взрывоподобный одновременный выброс большого числа вирусных частиц, что во многих случаях приводит к лизису клетки, после которого происходит резкое увеличение локальной концентрации вирусов. Это может приводить к увеличению

эффективности адсорбции вирусов на соседних клетках, даже с низким числом сайтов связывания. Вновь образованные вирусы распространяются либо от клетки к клетке, либо с током биологических жидкостей по тканям организма. Вирусы, инфицирующие и лизирующие опухолевые клетки, называют онколитическими и, как уже было сказано, принадлежат к различным семействам, которые объединяет способность избирательно лизировать опухолевые клетки. Хотя опухолевые клетки бессмертны (у них отсутствует лимит Хайфлика), они становятся более чувствительными к вирусной инфекции по сравнению с нормальными клетками как вследствие увеличения в процессе канцерогенеза уровня молекул, служащих рецепторами для вирусов, так и в результате нарушения индуцируемого интерфероном пути антивирусной защиты, важным компонентом которого является зависимость от двунизовой РНК (днРНК) протеинкиназа PKR. Появление днРНК в результате вирусной инфекции активирует PKR, которая фосфорилирует регуляторную субъединицу эукариотического фактора инициации трансляции eIF2a, блокируя синтез вирусных белков, и индуцирует апоптоз, в результате которого опухолевая клетка погибает, что предотвращает репликацию вируса и дальнейшее его распространение [71]. Известно, что у ~30 % опухолей активирован онкоген *Ras*, снижающий активность PKR, которая останавливает процесс трансляции вирусных белков. Вследствие того, что большинство опухолевых клеток дефектны по киназе PKR, в частности из-за ингибирования PKR активированным онкогеном *Ras*, в опухолевых клетках происходит репликация вируса, вызывающая их гибель [72]. Таким образом, онколитические вирусы, обладающие тропностью к определенным тканям, могут лизировать опухоли этих тканей, а избирательность литического действия обеспечивается свойствами самой опухоли, неспособной бороться с вирусной атакой [73]. Природные онколитические вирусы либо должны быть слабовирулентными для нормальных тканей, либо аттенуированными (искусственно ослабленные вакцинные штаммы). Метаболизм клеток человека препятствует репликации вирусов, вызывающих заболевания у животных (поражающий птиц *NDV*, вакцинный штамм вируса венесуэльского энцефалита лошадей и другие вирусы).

Разрушение опухолевых клеток при инфицировании онколитическими вирусами происходит по различным, еще недостаточно изученным механизмам.

С помощью электронной микроскопии показано, что в результате заражения *NDV* опухолевых клеток изменяется морфология цитоскелета, происходит нарастающее во времени повреждение их ультраструктуры, подавление роста. В зависимости от типа трансформации опухолевых клеток развивается апоптоз

или, при невозможности его реализации вследствие нарушения регуляторных сигнальных путей, аутофагия, тогда как в клетках культуры нормальных фибробластов человека отсутствуют связанные с инфекцией *NDV* признаки значимого нарушения морфологии [74]. Изучение влияния вакцинного штамма цитолитического вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей на клетки рака Эрлиха показало, что он стимулирует увеличение числа патологических митозов и повышение уровня хромосомных aberrаций [45]. Механизмы избирательности онколитических вирусов пока не совсем ясны.

Одним из основных факторов, препятствующих развитию опухолей в организме, служит ген-супрессор *p53*. Он картирован в геноме человека на коротком плече хромосомы 17 и кодирует белок из 393 аминокислотных остатков [75]. В ответ на повреждение ДНК и активацию онкогенов *p53* стимулирует задержку клеточного цикла и апоптоз. Нарушение сигнальных путей с участием *p53* вызывает пролиферацию и трансформацию клеток [76]. В клетках с геном *p53* дикого типа вирусы, как правило, быстро элиминируются, однако ряд ДНК-содержащих вирусов, например аденовирусы, вирусы папилломы, способны инактивировать ген *p53*, обеспечивая эффективную репликацию вирионов в клетке. Геном аденовирусов содержит особый ген *E1B*, который кодирует белок, способный связываться с *p53* и инактивировать его [77]. Этот ген необходим для репликации аденовирусов в нормальных клетках человека, при этом дефектные по *E1B* аденовирусные штаммы становятся неспособными к репликации в нормальных тканях, но могут размножаться в клетках, несущих мутантный ген-супрессор *p53*, что характерно для ~50 % опухолей человека и может быть использовано для онколиза опухолей [19, 78].

Одним из механизмов цитотоксического действия онколитических вирусов на опухолевые клетки является индукция синтеза цитотоксических белков. К ним относятся цитотоксические белки E3 и E4orf4 аденовирусов [79]. D. Zeng и соавт. установили, что вирус везикулярного стоматита, селективно реплицирующийся в опухолевых клетках различного тканевого происхождения (глиома, рак легкого, рак желудка, рак толстой кишки и др.) с нарушенными интерферонзависимыми противовирусными путями или дефектной функцией гена-супрессора *p53*, онкогенов *Ras* или *Myc*, индуцирует в них апоптоз, причем матриксный белок играет главную роль в этом процессе. Обработка матриксным белком вируса везикулярного стоматита культуры клеток рака желудка MKN-28 эффективно ингибирует пролиферацию и индуцирует апоптозную гибель клеток. Протеомный анализ обработанных матриксным белком клеток выявил снижение характерного для них уровня

ферментов аэробного гликолиза, приводящего к накоплению молочной кислоты, что, в свою очередь, способствует избеганию опухолевыми клетками элиминации со стороны иммунной системы. Кроме того, матриксный белок вируса везикулярного стоматита индуцирует избыточную продукцию активных форм кислорода, что вызывает нарушение созревания и транспорта мРНК и приводит к гибели раковых клеток. Хотя вирус везикулярного стоматита проявляет активность в качестве цитолитического агента, его клиническое использование считается нецелесообразным вследствие быстрой элиминации [62].

Кроме непосредственного лизиса клеток, наступающего в результате репликативного цикла, вирусы вызывают элиминацию опухолевых клеток посредством индукции неспецифического и специфического иммунитета у макроорганизма, в том числе противоопухолевого. При инфицировании вирусом возникает местное воспаление, приводящее к повышению ответа Т-клеток, а при дальнейшем лизисе независимо от клеточной локализации высвобождаются опухолеассоциированные антигены, что может индуцировать специфический противоопухолевый иммунитет. Инфицирование вирусом клеток вызывает ответную реакцию организма, которая выражается в активации макрофагов, естественных киллерных клеток, Т-лимфоцитов и усилении продукции ими цитокинов и ряда интерлейкинов. В частности, установлено, что, несмотря на свою внутреннюю онколитическую активность, парвовирус *H-IPV* усиливает опосредованную естественными киллерными клетками гибель клеток Панс-1 протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, поскольку инфекция *H-IPV* стимулирует способность естественных киллерных клеток высвобождать интерферон гамма, фактор некроза опухоли альфа и макрофагальный белок воспаления 1α (MIP- $1\alpha/\beta$) в этих клетках [37]. Активация классических апоптозных путей в раковых клетках не является преимущественным путем их гибели, кроме того, перекрестная устойчивость опухолевых клеток к стандартной радио- и химиотерапии также не позволяет реализовать апоптоз. При этом влияние иммунного ответа может разрушать реплицированные вирионы и снижать непосредственное литическое действие на опухолевые клетки [80].

Оптимизация генома онколитических вирусов

При любой противоопухолевой терапии необходимо минимизировать цитотоксическое действие на ткани, окружающие опухоль. Оптимальный онколитический вирус должен реплицироваться исключительно в опухолевых клетках и даже при системном введении концентрироваться в опухоли. Кроме того, вирус должен быстро реплицироваться с высоким титром как в покоящихся, так и в делящихся

опухолевых клетках и затем проникать через опухолевую массу, непосредственно разрушая клетки или повышая их чувствительность к другим противоопухолевым агентам, в то же время оставаясь минимально безопасным для окружающих нормальных тканей. Оптимальный терапевтический вирус характеризуется эффективной репликацией даже в условиях активно работающего противовирусного иммунного ответа, для чего требуется синтез вирусных белков, контролирующих направленную на инфекционный агент активность организма. Следовательно, такой вирус должен вызывать минимальную иммунологическую реакцию и хорошо переноситься больными. Более того, вирусная инфекция должна стимулировать эффективный противоопухолевый иммунитет и разрушать метастазы.

Современные методы генной инженерии позволяют изменять геном таких вирусов с целью повышения их селективной способности к репликации в опухолях. В настоящее время оптимизация генома онколитических вирусов ведется в направлении их избирательного нацеливания на опухолевые ткани. Проводятся работы по встраиванию в промоторные области вирусного генома элементов, специфичных для опухолевого роста, в частности промотора теломеразы [81], промотора циклооксигеназы-2 [82, 83] и др., создаются рН-чувствительные наноконструкции аденовируса и блок-сополимера, реагирующие на кислотность микроокружения [84], а также используются элементы, специфичные для опухолей различного тканевого происхождения — многие тканеспецифические диагностические маркеры, а именно специфический антиген предстательной железы для лечения рака предстательной железы [85], альфа-фетопротейн для лечения рака печени и др. [1, 7, 86].

Первый рекомбинантный вирус для онколитической терапии, полученный методами генной инженерии, создан на основе вируса простого герпеса в 1991 г. R. Martuza и соавт. [14]. Мутантный онколитический аденовирус, который избирательно реплицируется в дефектных по гену-супрессору *p53* опухолевых клетках человека, получен в 1996 г. [19]. Как правило, с помощью методов генной инженерии удаляют гены, необходимые для репликации онколитического вируса в нормальных клетках. Известно, что аденовирусы продуцируют белок E1B, инактивирующий *p53* и тем самым способствующий репликации вирусов в здоровых тканях [87]. С целью повышения избирательности аденовируса к опухолевым тканям создали рекомбинантный штамм, в котором делетирована область E1b55K. Этот репликационно компетентный аденовирус размножается в опухолевых клетках поздних стадий рака с мутантным *p53*, но не способен размножаться в нормальных клетках с *p53* дикого типа, что усиливает его противоопухолевую

избирательность [88]. Более сложную модификацию аденовируса *SG611* произвели J. Zhou и соавт. (2016). Учитывая тот факт, что в основе патогенеза лейкоза лежит, в частности, недостаточность экспрессии гена *VSTM1* и синтезируется теломераза, они создали аденовирус *SG611-VSTM1*, экспрессирующий *VSTM1* под контролем промотора цитомегаловируса. Таким образом, получили рекомбинантный вирус *SG611-VSTM1*, в котором объединены свойства онколитического вируса и вектора для генотерапии. В экспериментах на лейкозных клетках K562 как *in vitro*, так и *in vivo* *SG611-VSTM1* более активно индуцирует апоптоз, чем исходный вирус *SG611*, причем дополнительная обработка клеток низкими дозами даунорубицина синергично усиливает индуцирующее апоптоз действие *SG611-VSTM1* [89]. На модели рака предстательной железы, трансплантированного в обе конечности мышей, показано, что онколитический аденовирус теломелизин (ОВР-301, репликационно компетентный аденовирус с промотором гена *hTERT* человека, поражающий клетки, экспрессирующие *hTERT*) при его внутриопухоловом введении эффективно подавляет рост контралатеральной опухоли и может быть использован для удаления метастатических поражений [90, 91].

В рекомбинантные вирусы могут быть введены гены, содержащие регуляторные элементы с тканеспецифическим действием, которые участвуют в регуляции экспрессии вирусных генов в конкретных тканях. Особо следует отметить возможности применения онколитических вирусов для элиминации метастазов (циркулирующих опухолевых клеток или их конгломератов) после удаления первичной опухоли. С использованием методов обратной генетики получен вариант онколитического *NDV* на основе мезогенного штамма *NDV-73T*, содержащий модификацию участка, кодирующего сайт расщепления белка слияния (F) (для снижения эффективности расщепления белка F) и инсерцию размером 198 нуклеотидов в межгенной области *HN-L*, что приводит к снижению уровня экспрессии вирусных генов и подавлению репликации в клетках птиц, но не млекопитающих. В тканях последних, за исключением гена вирусной полимеразы, экспрессия других вирусных генов никак не модулируется в результате межгенной инсерции *HN-L*. Показана также возможность создания варианта *NDV* для экспрессии чужеродного гена, который сохраняет способность к росту с высоким титром в клеточной культуре. При внутриопухоловом или внутривенном введении на модели мыши избирательная репликация рекомбинантного *NDV* в опухолевых клетках приводит к их гибели и обеспечивает ингибирование роста опухоли, что указывает на его функцию как онколитического вируса [92]. Т. Kojima и соавт. установили, что

виротерапия мышей с трансплантированными в кишечник клетками HT29 рака толстой кишки до хирургического удаления опухоли путем внутриопухолевого введения онколитического вируса ОВР-301 (теломелизин, аттенуированный аденовирус, содержащий элемент промотора гена *hTERT* человека) эффективно очищает регионарные лимфатические узлы от опухолевых клеток [93].

С целью усиления природной онколитической активности вируса осповакцины получен рекомбинантный штамм *VVdGF-ApoS24/2*, в геном которого встроен ген апоптина, индуцирующий апоптоз опухолевых клеток. На модели мышей с привитым раком Эрлиха после внутриопухолевого введения рекомбинантного штамма *VVdGF-ApoS24/2* вируса осповакцины обнаружено снижение числа опухолевых клеток в результате блока S-фазы митоза, т. е. противоопухольевый эффект апоптинпродуцирующего рекомбинантного штамма вируса осповакцины *in vivo* связан с блокированием клеточного цикла опухолевых клеток. [31].

Примером тонкого генетического программирования служит модификация с помощью микроРНК цитолитической функции входящего в семейство пикорнавирусов менговируса, который проявляет широкий диапазон клеточного тропизма и вызывает энцефалит и миокардит у многих видов млекопитающих. Аттенуация менговируса достигается путем укорочения полицитидинового участка в 5'-некодирующей области генома (NCR). Штамм *vMC₂₄* менговируса с поли(С)-укорочением приводит к значимой опухолевой регрессии у иммунокомпрометированных опухоленосущих мышей BALB/c с сингенными плазмацитомами MPC-11, что, однако, связано с недопустимо высоким уровнем токсичности. С целью повышения профиля безопасности в 5'-NCR генома штамма *vMC₂₄* ввели адресные для микроРНК (miR) последовательности, комплементарные miR-124 или miR-125 (повышенный уровень экспрессии в нервной ткани), miR-133 и miR-208 (повышенный уровень экспрессии в сердечной ткани) или miR-142 (контроль, повышенный уровень в гемопоэтических тканях). Установлено, что перенацеленные посредством микроРНК вирусы проявляют сниженный уровень репликации и киллинг клеток, экспрессирующих родственные микроРНК. Тестирование токсичности *in vivo* подтвердило, что miR-124, нацеленная на 5'-NCR, подавляет репликацию вируса в центральной нервной системе, тогда как miR-133 и miR-208, нацеленные на 3'-NCR, подавляют репликацию вируса в сердечной мышце. Вирус *vMC₂₄-NC* с двойным перенацеливанием (несущий miR-124, адресную для 5'-NCR, и miR-133/miR-208, совместно нацеленные на 3'-NCR) характеризуется отсутствием способности к репликации в нервной ткани

и сердечной мышце, но остается полностью онколитически активным при внутриопухолевом введении в дозе 10^6 TCID₅₀ (50 % инфекционной дозы в культуре ткани) и при внутривенном введении в дозе 10^7 – 10^8 TCID₅₀ опухоленесущим мышам BALB/c сингенными плазмацитомами MPC-11. Общая выживаемость обработанных генетически модифицированным штаммом *vMC₂₄-NC* менговируса опухоленесущих мышей значимо увеличивается по сравнению с контрольной группой. Таким образом, перенацеленные посредством микроРНК менговирусы служат высокоперспективной платформой онколитической виротерапии, которая представляет интерес для клинической практики [94].

Апробация способов лечения опухолей онколитическими вирусами

В настоящее время в пре- и клинических исследованиях получены четкие доказательства того, что виротерапия онкологических заболеваний может занять достойное место в ряду других традиционных методов лечения [95]. Тестируемые в качестве противоопухолевых средств онколитические вирусы либо выбраны из существующих в природе, либо получены методом генной инженерии. Онколитические вирусы проявляют опухолевую селективность как *in vitro*, так и *in vivo* при внутриопухолевом, внутрибрюшинном или внутривенном введении. Одно из первых сообщений о клинических испытаниях в 2001 г. онколитического вируса относится к аденовирусу *ONYX-015* с делегированным геном *E1B-55kD*. Свыше 250 больных различными типами рака, соответствующего по 10 клиническим признакам фазам I–III, получили курс инъекций *ONYX-015*, которые хорошо переносились в дозе 2×10^{12} частиц *ONYX-015* при внутриопухолевом, внутрибрюшинном, внутривенном введении и введении в печеночную артерию. Репликация аденовируса *ONYX-015* была опухолеселективной, но зависела от гистологии опухоли. Частота регрессии локальных опухолей составила 0–14 %, но в комбинации с химиотерапией зарегистрирована значимая противоопухолевая активность [96].

К природным онколитическим вирусам, которые могут быть использованы в исходном немодифицированном виде, относятся *NDV*, вирус везикулярного стоматита, парвовирусы [38], некоторые штаммы вируса кори, реовирусы, которые селективно реплицируются в опухолевых клетках. Y. Nishiyama и соавт. для лечения больных раком молочной железы и плоскоклеточным раком головы и шеи успешно применили репликативно-компетентный природный мутант *HF10* вируса герпеса [97]. Клинические испытания (фаза I) онколитического герпесвируса *G207* у больных злокачественной глиомой показали, что его однократная внутриопухолевая инъекция у 8 из

21 больных вызывает, по данным МРТ, значимое уменьшение объема опухоли [98]. После многократного внутривенного введения онколитического *NDV* (штамм *HUJ*) 14 больным рецидивирующей мультиформной глиобластомой у 1 больного произошла полная регрессия опухоли, у 3 больных продолжительность жизни увеличилась более чем на 6 лет [99].

Для лечения злокачественных глиом, наиболее распространенных заболеваний головного мозга с чрезвычайно плохим прогнозом (средняя выживаемость больных не превышает 14 мес, и мало надежды на прорыв как в областях лекарственной, так и лучевой терапии) изучена возможность использования онколитических вирусов. В статьях А.О. Сосновцевой [100–101], а также большом обобщающем обзоре [102], посвященном виротерапии глиом, представлены данные клинических исследований за последние 25 лет. Показано, что онколитическое действие на глиомы с разной степенью эффективности оказывают вирусы различных семейств, в том числе вирусы герпеса, *NVD*, аденовирусы, реовирусы, парвовирусы и др. Причем во всех клинических испытаниях фаз I–III отмечается положительная динамика терапии заболевания и низкая токсичность лечения. Если учитывать тот факт, что больные глиобластомой обычно уже перенесли хирургическое лечение и получают облучение и кортикостероиды, виротерапия не только не снижает качество жизни, но и оказывает выраженное иммуномодулирующее действие. В обзоре обсуждают существование корреляции между индукцией иммунитета и противоопухолевым действием вирусов в зависимости от генотипа опухоли, генотипа вируса и противоопухолевого иммунного ответа, стимулированного вирусной инфекцией [103].

Как уже упоминалось ранее, онколитические вирусы оказывают не только непосредственно цитотоксическое действие на опухоли, но и стимулируют иммунитет. В частности, *NDV* способен выступать в качестве адъюванта, поскольку стимулирует активность Т-лимфоцитов, индукцию цитокинов, RANTES, IL-10, а также TNF- α , который повышает Т-хелперную активность. Кроме того, *NDV*, попадая в опухолевые клетки, запускает в них синтез стрессовых белков, в частности HSP70, что может быть использовано для получения аутологичных вакцин. Лечение 36 больных с диссеминированными, резистентными к химио- и лучевой терапии опухолями различных локализаций (рак молочной железы, меланома, рак яичника) аутологичной вакциной с престоимуляцией *NDV* привело к полному исчезновению опухолевых узлов через 5–6 курсов терапии с длительностью ремиссий в среднем 11 мес [104]. В некоторых случаях онколитические вирусы используют в качестве противоопухолевых вакцин. Возможности иммунотерапии для лечения онкологических заболеваний

в настоящее время ограничены как токсичностью, так и невысокой эффективностью. Использование *NDV* показало, что опухолевые клетки могут быть уничтожены как непосредственно вирусом, так и через активацию иммунной системы. Неoadьювантная иммунотерапия больных раком молочной железы вызывает стабилизацию заболевания у всех 30 больных, а у 18 больных индуцирует лечебный метаморфоз опухоли [105]. Пока остаются неясными механизмы реализации противовирусного и противоопухолевого иммунитета. У онкологических больных с генерализованными стадиями заболевания может сохраняться достаточный резерв иммунитета для элиминации вируса, поэтому, вероятно, будет целесообразно использовать виротерапию после удаления первичной опухоли для предотвращения ее рецидивирования и метастазирования. Изучение возможностей влияния на эффективность действия онколитических вирусов цитостатических и/или лучевых средств, иммунотерапевтических средств, а также потенцирование их действия важно для применения виротерапии в клинических схемах. Например, учитывая тот факт, что стандартом лечения распространенной саркомы мягких тканей служит химиотерапия доксорубицином или комбинацией доксорубицина с ифосфамидом, исследована эффективность лечения хомячков и мышей с установившимися опухолями саркомы мягких тканей комбинацией онколитического (репликативно-компетентного в клетках, дефектных по *p16/Rb*) аденовируса *CGTG-102* и комбинации доксорубицина с ифосфамидом. Установлено, что доксорубицин и ифосфамид как по отдельности, так и совместно синергично увеличивают эффективность киллинга клеток саркомы мягких тканей, что создает предпосылки исследования возможности использования комбинации этого аденовируса и цитостатиков [106]. Для лечения рака толстой кишки запатентовано использование мезогенного варианта *NDV* линии МК107 в комбинации с фторпиримидинами и камптотецинами [107]. Кроме того, в преclinical и клинических испытаниях получены данные о том, что использование репликативно-компетентных вирусов в комбинации с химио- и лучевой терапией оказывает хороший клинический эффект [80, 108]. Аденовирус *ONYX-015* – первый среди вирусов, примененных в комплексном лечении больных [27].

Как следует из вышеизложенного, действие виротерапии может быть синергично усилено комбинированием с рутинно применяемыми цитотоксическими средствами. Однако некоторые современные таргетные препараты, а именно ингибиторы тирозинкиназ, такие как сорафениб, регорафениб и пазопаниб, оказывают не только противоопухолевое, но и антибактериальное и противовирусное действие. Показано, что эти препараты ингибируют развитие,

в частности, серотипа 5 аденовируса, варианты которого используются в качестве основы для получения онколитических вирусов [109]. По-видимому, в каждом конкретном случае необходимо проверять совместимость компонентов либо применять их последовательно, учитывая тот факт, что препараты, используемые в химиотерапии опухолей, могут как потенцировать действие виротерапии, так и ослаблять его. L. M. Berghauer Pont и соавт. (2015 г.) провели скрининг 446 лекарственных средств на культуре клеток глиобластомы, подобных стволовым, обработанных онколитическим вирусом *Delta24-RGD*. На этой модельной системе выявили 4 вирусных сенсibilизатора: флуфеназин, индирубин, лопепрамин и ранолазин, которые не только синергично с вирусом *Delta24-RGD* индуцировали гибель клеток глиобластомы, но так же синергично увеличивали киллинг клеток под действием ряда других онколитических вирусов [110].

При проведении большинства клинических испытаний используют внутриопухолевую доставку вирусов. Очевидно, что отработка методики системного введения вирусов при лечении онкологических больных значительно расширит возможности виротерапии. Получены данные о максимально переносимом титре вирусов *PV701* и *ONYX-015* при внутривенном введении [111]. Исследована возможность введения в печеночную артерию вируса *ONYX-015* при лечении больных раком толстой и прямой кишки с метастазами в печени [112]. Следует отметить, что потенциал локорегионарного и системного лечения онколитическими вирусами пока не раскрыт, что предполагает необходимость разработки надежных преclinical моделей предсказания результатов лечения человека. Ответы на вопросы, касающиеся виремии, клиренса вирусов, гуморального и клеточного иммунного ответа, распространения вируса от опухоли к опухоли (при множественных опухолях), повышения устойчивости вируса в организме могут дать только исследования на человеке.

Среди вышеупомянутых природных онколитических вирусов в человеческой популяции широко распространены реовирусы, которые часто выявляют в дыхательных и пищеварительных путях человека. С этими вирусами не связывают серьезных заболеваний, но они могут быть полезны для лечения онкологических заболеваний. Показано, что реовирусы поражают преимущественно клетки с активированными генами семейства *RAS* или с активированными сигнальными путями *RAS*, но не влияют на нормальные клетки [40, 113]. Такая избирательность может представлять большой интерес для онкологов, поскольку примерно в 60–80 % опухолей человека активированы пути онкогена *Ras*. В опухолевых клетках с активированными путями *RAS* реовирусы свободно

реплицируются и, как правило, лизируют эти клетки. После того как инфицированная клетка погибает, вновь синтезированные вирионы становятся способными инфицировать соседние опухолевые клетки. Такой процесс продолжается до тех пор, пока в наличии имеются клетки с активированными путями RAS либо пока вирус не будет элиминирован клетками иммунной системы. Однако даже высоковирулентные вирусы поражают не все опухолевые клетки в чувствительных к такому вирусу опухолях, что может частично объясняться внутриопухолевой гетерогенностью. Для преодоления этого эффекта может быть использована комбинация типов или штаммов онколитических вирусов.

Сравнительное исследование цитопатического эффекта природного реовируса линии *Dearing* серотипа 3 на клетки медуллобластомы и нормальные культивируемые фибробласты показывает, что цитопатический эффект на клетках медуллобластомы проявляется в течение 4 дней, в то время как фибробласты остаются интактными [114]. Реовирусы значительно усиливают цитотоксический эффект цисплатина на клетки глиобластомы. Компания Oncolytic Biotech Inc производит на основе реовирусов противоопухолевый препарат реолизин, который успешно проходит клинические испытания в Великобритании, США и Канаде [115]. В настоящее время идет оптимизация методов введения реолизина при различных онкологических заболеваниях, в частности при лечении глиом и меланомы человека [116, 117]. В Латвии для лечения больных меланомой применяется иммуномодулятор вирусного происхождения RIGVIR – генетически модифицированный онколитический непатогенный эховирус (*ECHO-7*), который в 2004 г. апробирован и зарегистрирован для виротерапии, а с 2011 г. включен в список компенсируемых лекарственных средств для больных меланомой. Клинически показано, что RIGVIR непатогенен для человека и животных, проявляет онкотропное, онколитическое и иммуномодулирующее действия в отношении таких опухолей, как меланома, рак желудка, рак толстой и прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак почки, рак легкого, рак матки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, различные виды сарком. Основа противоопухолевого действия препарата RIGVIR – вирусный онколиз в комбинации с реакцией иммунологического отторжения опухоли [49]. Проведенный ретроспективный анализ эффективности RIGVIR у 79 больных меланомой на субстадиях IB, IIA, IIB и IIC (после удаления первичной опухоли) показал, что RIGVIR значительно повышает выживаемость больных, снижая летальность в 4,4–6,6 раза. Препарат RIGVIR также значительно увеличивает выживаемость больных на ранних стадиях меланомы без проявления побочных эффектов [118].

На сегодняшний день в клиническую практику введено 2 препарата на основе репликационно-компетентных вирусов – Oncorine (Китай) [119] для лечения опухолей головы и шеи и Imlygic (США) для лечения меланомы [120]. Целый ряд вирусов в настоящее время проходят клинические испытания на больных раком различных локализаций и будут доступны для клиницистов в самое ближайшее время [121–123].

Российские исследователи также проявляют интерес к использованию вирусов в биотерапии опухолей. В ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» создана перевиваемая культура клеток 293, которая может быть использована для культивирования противоопухолевого препарата канцеролизин, представляющего собой мутантный вариант аденовируса *Adel2*, который с эффективностью, близкой к вирусу дикого типа, инфицирует опухолевые клетки, дефектные по *p53* [124]. Введение мышам с трансплантируемой опухолью HeLa канцеролизина (клетки 293) предотвращает развитие первичной опухоли и ее метастазов. Клетки 293 рекомендованы для производства препаратов для лечения онкологических больных [125].

Исследования по виротерапии опухолей ведутся также в Новосибирском государственном университете, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Национальном исследовательском университете им. Н.И. Пирогова, НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, НИИ экспериментальной и клинической медицины (Новосибирск) и ряде других научных центров России.

Заключение

Из-за недостаточной эффективности и высокой токсичности классических противоопухолевых средств, применяемых для химиотерапии рака, которая часто сопровождается дисфункцией органов, тканей, иммунной и кроветворной систем, во всем мире активно идет поиск новых возможностей уничтожения опухолевых клеток. Из всех групп существующих противоопухолевых средств репликативно-компетентные онколитические вирусы обладают наиболее привлекательным фармакологическим профилем из-за их специфической способности реплицироваться и распространяться в опухолевой ткани. Следует отметить, что наряду с хорошей переносимостью препараты на основе онколитических вирусов могут вводиться адресно – внутриопухолево (солидные опухоли), внутривенно (гемобластомы), местно (меланома), вагинально (рак шейки матки), интраназально или посредством ингаляционного спрея (рак легкого). Опыт применения онколитических вирусов

свидетельствует об относительной безопасности и выраженном синергическом эффекте при комбинировании с другими средствами химио- и лучевой терапии, но недостаточно высокой эффективности при монотерапии, что указывает на необходимость разработки новых эффективных схем лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Russell S.J., Peng K.W., Bell J.C. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 2012; 30:658–70. DOI:10.1038/nbt.2287.
- Святченко В.А., Тарасова М.В., Нетесов С.В. и др. Онколитические аденовирусы в терапии злокачественных новообразований: современное состояние и перспективы. *Молекулярная биология* 2012;46(4):556–69. [Sviatchenko V.A., Tarasova M.V., Netesov S.V., Chumakov P.M. Oncolytic adenoviruses in anti-cancer therapy: current status and perspectives. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2012;46(4):556–69 (In Russ.)].
- Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Юдина К.В. и др. Онколитические поксвирусы. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология* 2012;1:8–15. [Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Iudina K.V. et al. Oncolytic poxviruses. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2012;1:8–15 (In Russ.)].
- Матвеева О.В., Кочнева Г.В., Нетесов С.В. и др. Механизмы онколитического действия парамиксовируса Сендай. *Acta Naturae* 2015;7(2):6–17. [Matveeva O.V., Kochneva G.V., Netesov S.V., et al. Mechanisms of oncolysis by paramyxovirus Sendai. *Acta Naturae* 2015;7(2):6–16 (In Russ.)].
- Баклаушев В.П., Горяинов С.А., Потапов А.А. и др. Онколитические вирусы в лечении низкодифференцированных глиом. *Клиническая практика* 2015;2:46–59. [Baklaushev V.P., Goryainov S.A., Pavlova G.V. et al. Oncolytic viruses in high-grade gliomas treatment. *Klinicheskaiia praktika = Clinical praktike* 2015;2:46–59 (In Russ.)].
- Donina S., Strēle I., Proboka G. et al. Adapted ECHO-7 virus Rigvir immunotherapy (oncolytic virotherapy) prolongs survival in melanoma patients after surgical excision of the tumour in a retrospective study. *Melanoma Res* 2015;25(5):421–26. DOI: 10.1097/CMR.000000000000180. PMID: 26193376.
- Ring C.J. Cytolytic viruses as potential anti-cancer agents. *Gen Virol* 2002;83:491–502. DOI: 10.1099/0022-1317-83-3-491. PMID: 11842243.
- de Pace N.G. Sulla scomparsa di un enorme cancro vegetante del collo dell'utero senza cura chirurgica. *Ginecologia* 1912;9:82–8.
- Приедите И.Ю., Гарклава Р.Р., Муцениеце А.Я. Лечение больных раком желудка после паллиативных операций. *Материалы III конференции онкологов ЭССР, ЛитССР и ЛатвССР. Рига, 1971. 77 с.* [Priedite I.Yu., Garklava R.R., Mutsienitsene A.Ya. Treatment of patients with gastric cancer after palliative operations. *Proceedings of the III Conference of Oncologists of the ESSR, the Lithuanian SSR and the Latvian SSR. Riga, 1971. 77 p.* (In Russ.)].
- Муцениеце А.Я. Онкотропизм вирусов и проблема виротерапии злокачественных опухолей. *Рига: Зинатне, 1972. 442 с.* [Mutsienitsene A.Ya. Oncotropism of viruses and the problem of virotherapy of malignant tumors. *Riga: Zinatne, 1972. 442 p.* (In Russ.)].
- Муцениеце А.Я., Фердат А.К. Феномен усиления иммуногенности опухолевых клеток вирусами. *Вирусы в терапии опухолей. Рига: Зинатне, 1978. С. 5–34.* [Mutsienitsene A.Ya., Ferdat A.K. The phenomenon of increased immunogenicity of tumor cells by viruses. *Viruses in the treatment of tumors. Riga: Zinatne, 1978. P. 5–34* (In Russ.)].
- Моисеев В.М., Балдуева И.А., Хансон К.П. Вакциноterapia злокачественных опухолей. *Вопросы онкологии* 1999;45(3):327–32. [Moiseenko V.M., Baldueva I.A., Khanson K.P. Vaccination therapy for malignant tumors. *Voprosy onkologii = Problems of Onkology* 1999;45(3):327–32 (In Russ.)].
- Voroshilova M.K. Potential use of non-pathogenic enteroviruses for control of human disease. *Prog. Med. Virol.* 1989;36:191–202. PMID: 2555836.
- Martuza R., Malick A., Markert J. et al. Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 1991;252:854–6. DOI:10.1126/science.1851332. PMID: 1851332.
- Pesonen S., Nokisalmi P., Escutenaire S. et al. Prolonged systemic circulation of chimeric oncolytic adenovirus Ad5/3-Cox2LD24 in patients with metastatic and refractory solid tumors. *Gene Ther* 2010;17:892–904. DOI: 10.1038/gt.2010.17. PMID: 20237509.
- Калинин В.Л. Введение в молекулярную вирусологию. СПб.: СПбГТУ, 2002. 120 с. [Kalinin V.L. Introduction to molecular virology. SPb.: SPbSTU, 2002. 120 p. (In Russ.)]. Graham F.L., Prevec L. Manipulation of adenovirus vectors. *Methods in Molecular Biology* 1991;7:109–28. DOI: 10.1385/0-89603-178-0:109.
- Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Nat Canc Inst* 2006;98:298–300. DOI: 10.1093/jnci/djj111. PMID: 16507823.
- Bischoff J.R., Kim D.H., Williams A. et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 1996;274:373–6. DOI:10.1126/science.274.5286.373. PMID: 8832876.
- Shirakawa T. The current status of adenovirus-based cancer gene therapy. *Mol Cells* 2008;25(4):462–6. PMID: 18460898.
- Hanna E., Quick J., Libutti S.K. The tumour microenvironment: a novel target for cancer therapy. *Oral Dis* 2009;15:8–17. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2008.01471.x. PMID: 18992016.
- Cerullo V., Pesonen S., Diaconuet I. et al. Oncolytic adenovirus coding for granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces antitumoral immunity in cancer patients. *Canc Res* 2010;70:4297–309. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3567. PMID: 20484030.
- Kosaka T., Davydova J., Ono H.A. et al. Imaging and antitumoral effect of a cyclo-oxygenase 2-specific replicative adenovirus for small metastatic gastric cancer lesions. *Anticancer Res* 2015;35:5201–10. PMID: 26408678.
- Hardcastle J., Kurozumi K., Dmitrieva N. et al. Enhanced antitumor efficacy of vasculostatin (Vstat120) expressing oncolytic HSV-1. *Mol Ther* 2010;18:285–94. DOI: 10.1038/mt.2009.232. PMID: 19844198.
- Manservigi R., Argnani R., Marconi P. HSV recombinant vectors for gene therapy. *Open Virol J* 2010;4:123–56.

- DOI: 10.2174/1874357901004030123. PMID: 20835362.
25. Reid V., Yu Z., Schuman T. et al. Herpes oncolytic therapy of salivary gland carcinomas. *Int J Canc* 2008;122:202–8. DOI: 10.1002/ijc.23030. PMID: 17764117.
 26. Aghi M., Martuza R.L. Oncolytic viral therapies – the clinical experience. *Oncogene* 2005;24:7802–16. DOI: 10.1038/sj.onc.1209037. PMID: 16299539.
 27. Currier M.A., Gillespie R.A., Sawtell N.M. et al. Efficacy and safety of the oncolytic herpes simplex virus rRp450 alone and combined with cyclophosphamide. *Mol Ther* 2008;16:879–85. DOI: 10.1038/mt.2008.49. PMID: 18388918.
 28. Thorne S.H., Tae-Ho H. Hwang, O’Gorman W.E. et al. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J Clin Invest* 2007;117:3350–8. DOI: 10.1172/JCI32727. PMID: 17965776.
 29. Lee J., Roh M., Lee Y. et al. Oncolytic and immunostimulatory efficacy of a targeted oncolytic poxvirus expressing human GM-CSF following intravenous administration in a rabbit tumor model. *Canc Gene Ther* 2010;17:73–9. DOI: 10.1038/cgt.2009.50. PMID: 19629143.
 30. Зонов Е.В., Кочнева Г.В., Тупицина А.В., Рябчикова Е.И. Противоопухолевый эффект апоптин-продуцирующего рекомбинантного штамма вируса осповакцины *in vivo* связан с блокированием митотического деления опухолевых клеток. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2016;34(4):154–9. [Zonov E.V., Tupitsyna A.V., Ryabchikova E.I., Kochneva G.V. The *in vivo* antitumor effect of the apoptin-producing recombinant vaccinia virus strain is associated with blockage of mitotic division of cancer cells. *Molekuliarnaia genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2016;34(4):154–9 (In Russ.)].
 31. Tattersall P. The evolution of parvoviral taxonomy. In *The parvoviruses*. London: Hodder Arnold, 2006. Pp. 5–14.
 32. Maxwell I.H., Terrell K.L., Maxwell F. Autonomous parvovirus vectors. *Methods* 2002;28(2):168–81. DOI:10.1016/s1046-2023(02)00221-9. PMID: 12413415.
 33. Cornelis J.J., Deleu L., Koch U. et al. Parvovirus oncosuppression in “The parvoviruses”. London: Hodder Arnold, 2006. P. 365–84. DOI:10.1201/b13393-31.
 34. Moehler M.H., Zeidler M., Wilsberg V. et al. Parvovirus H-1-induced tumor cell death enhances human immune response *in vitro* via increased phagocytosis, maturation, and cross-presentation by dendritic cells. *Hum Gene Ther* 2005;16(8):996–1005. DOI: 10.1089/hum.2005.16.996. PMID: 16076257.
 35. Rommelaere J., Geletneky K., Angelova A.L. et al. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21(2–3):185–95. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.02.011. PMID: 20211577.
 36. Bhat R., Dempe S., Dinsart C. et al. Enhancement of NK cell antitumor responses using an oncolytic parvovirus. *Int J Cancer* 2011;128:908–19. DOI: 10.1002/ijc.25415. PMID: 20473905.
 37. Geletneky K., Herrero Y.C. M., Rommelaere J. et al. Oncolytic potential of rodent parvoviruses for cancer therapy in humans: a brief review. *J Vet Med* 2005;52:327–30. DOI: 10.1111/j.1439-0450.2005.00877.x. PMID: 16316394.
 38. Hashiro G., Loh P.C., Yau J.T. The preferential cytotoxicity of reovirus for certain transformed cell lines. *Arch Virol* 1977;54(4):307–15. DOI:10.1007/bf01314776. PMID: 562142.
 39. Coffey M.C., Strong J.E., Forsyth P.A. et al. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 1998;282:1332–4. DOI:10.1126/science.282.5392.1332. PMID: 9812900.
 40. Clarke P., Tyler K.L. Down-regulation of cFLIP following reovirus infection sensitizes human ovarian cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:211–23. DOI: 10.1007/s10495-006-0528-4. PMID: 17136319.
 41. Kilani R.T., Tamimi Y., Hanel E.G. et al. Selective reovirus killing of bladder cancer in a coculture spheroid model. *Virus Res* 2003;93(1):1–12. DOI:10.1016/s0168-1702(03)00045-5. PMID: 12727337.
 42. Samson A., Bentham M., Scott K. et al. Oncolytic reovirus as a combined antiviral and antitumor agent for the treatment of liver cancer. *Gut* 2018;67(3):562–73. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-312009. PMID: 27902444.
 43. Thirukkumaran C.M., Nodwell M.J., Hirasawa K., et al. Oncolytic viral therapy for prostate cancer: efficacy of reovirus as a biological therapeutic. *Cancer Res* 2010;70(6):2435–44. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-240. PMID: 20215509.
 44. Suskind R.G., Huebner R.J., Rowe W.P. et al. Viral agents oncolytic for human tumors in heterologous host. *OncoLytic effect of Coxsackie B viruses. Proc Soc Biol Med* 1957;94:309–18. DOI:10.3181/00379727-94-22931. PMID: 13408245.
 45. Ворошилова М.К., Ваганова Н.Т. Опыт лечения больных опухолями желудочно-кишечного тракта живыми энтеровирусными вакцинами. Материалы симпозиума по вирусному онколизу и искусственной гетерогенизации опухолей. 1969. [Voroshilov M.K., Vaganova N.T. Experience in treating patients with gastrointestinal tumors with live enterovirus vaccines. Materials of the Symposium on Viral Oncolysis and Artificial Heterogenization of Tumors 1969. (In Russ.)].
 46. Goetz C., Gromeier M. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010;21:197–203. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.02.005. PMID: 20299272.
 47. Shafren D.R., Sylvester D., Johansson E. et al. Oncolysis of human ovarian cancers by Echovirus Type 1. *Int J Cancer* 2005;115:320–8. DOI: 10.1002/ijc.20866. PMID: 15688406.
 48. Муцениеце А.Я., Фелдмане Г.Я., Шаповалова Е.А. и др. Биотерапия иммуномодуляторами вирусной природы RIGVIR и LARIFANS для профилактики прогресси злокачественных опухолей: клинический опыт с 1968. *Российский биотерапевтический журнал* 2007;6(1):61. [Mutsienitsene A.Ya., Feldmane G.Ya., Shapovalova E.A. Biotherapy of viral immunomodulators RIGVIR and LARIFANS for the prevention of progression of malignant tumors: clinical experience since 1968. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2007;6(1):61. (In Russ.)].
 49. Haley E.S., Au G.G., Carlton B.R. et al. Regional administration of oncolytic echovirus 1 as a novel therapy for the peritoneal dissemination of gastric cancer. *J Mol Med* 2009;87:385–99. DOI: 10.1007/s00109-008-0433-0. PMID: 19139835.
 50. Toyoda H., Yin J., Mueller S. et al. Oncolytic treatment and cure of neuroblastoma by a novel attenuated poliovirus in a novel poliovirus-susceptible animal model. *Cancer Res* 2007;67:2857–64. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3713. PMID: 17363609.
 51. Gromeier M., Lachmann S., Rosenfeld M.R. et al. Intergeneric poliovirus recombinants for the treatment of malignant glioma. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000;97:6803–8. PMID: 10841575.

52. Zamarin D., Palese P. Oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy: old challenges and new directions. *Future Microbiol* 2012;7:347–67. DOI: 10.2217/fmb.12.4. PMID: 22393889.
53. Lorence R., Reichard K., Katubig B. et al. Complete regression of human neuroblastoma xenografts in athymic mice after local Newcastle disease virus therapy. *J Nat Canc Inst* 1994;86(16):1228–34. DOI:10.1093/jnci/86.16.1228. PMID: 8040891.
54. Galanis E. Therapeutic potential of oncolytic measles virus: promises and challenges. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:620–5. DOI: 10.1038/clpt.2010.211. PMID: 20881957.
55. Peng K.-W., Hadae E. M., Anderson B. D. et al. Pharmacokinetics of oncolytic measles virotherapy: eventual equilibrium between virus and tumor in an ovarian cancer xenograft model. *Canc Gene Ther* 2006;13:732–8. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700948. PMID: 16543921.
56. Msaouel P., Iankov I. D., Allen C. et al. Noninvasive imaging and radiovirotherapy of prostate cancer using an oncolytic measles virus expressing the sodium iodide symporter. *Mol Ther* 2009;17:2041–8. DOI: 10.1038/mt.2009.218. PMID: 19773744.
57. Altomonte J., Marozin S., Schmid R. M. et al. Engineered Newcastle disease virus as an improved oncolytic agent against hepatocellular carcinoma. *Mol Ther* 2010;18:275–84. DOI: 10.1038/mt.2009.231. PMID: 19809404.
58. Gainey M. D., Manuse M. J., Parks G. D. A hyperfusogenic F protein enhances the oncolytic potency of a paramyxovirus simian virus 5 P/V mutant without compromising sensitivity to type I interferon. *J Virol* 2008;82:9369–80. DOI: 10.1128/JVI.01054–08. PMID: 18667520.
59. Pap M., Bator J., Szeberenyi J. Sensitivity of human malignant melanoma cell lines to Newcastle disease virus. *Anticancer Res* 2015;35:5401–6. PMID: 26408702.
60. Матвеева О. В., Кочнева Г. В., Нетесов С. В. и др. Механизмы онколитического действия парамиксовируса Сендай. *Acta Naturae* 2015;7(2):617. [Matveeva O. V., Kochneva G. V., Netesov S. V. et al. Mechanisms of Oncolysis by Paramyxovirus Sendai. *Acta Naturae* 2015;7(2):6–16 (In Russ.)].
61. Zeng D., Zang T., Zhou S. et al. Proteomic analysis gastric cancer cells treated with vesicular stomatitis virus matrix protein. *Protein J* 2011;30:308–17. DOI: 10.1007/s10930-011-9331-3. PMID: 21574062.
62. Kournioti C., Park M.-S., Garcia-Sastre A. et al. Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. *Cancer Res* 2004;64:3265–70. DOI:10.1016/j.ymthe.2004.06.980. PMID: 15126368.
63. Zhang K., Matsui Y., Hadaschik B. A. et al. Down-regulation of type I interferon receptor sensitizes bladder cancer cells to vesicular stomatitis virus-induced cell death. *Int J Cancer* 2010;127(4):830–8. DOI: 10.1002/ijc.25088. PMID: 19957332.
64. Шлезингер М. Д. Репликация тогавирусов. В кн.: Вирусология. Под ред. Б. Филдса, Д. Найпа. М., 1989. Т. 2. С. 343–366. [Shlezinger M. D. Replication of togaviruses. In: *Virology*. Ed. B. Fields, D. Nuyra. Moscow, 1989. Vol. 2. Pp. 343–66. (In Russ.)].
65. Рогозин Е. А., Уразова Л. Н., Ильинских Н. Н. Влияние вируса венесуэльского энцефаломиелиита на жизнеспособность и уровень цитогенетических нарушений в клетках карциномы Эрлиха in vitro. *Экспериментальная онкология* 1999;21(1):70–2. [Rogozin E. A., Urazova L. N., Il'inskikh N. N. The effect of Venezuelan encephalomyelitis virus on viability and the level of cytogenetic disorders in Ehrlich carcinoma cells in vitro. *Experimental oncology* 1999;21(1):70–2 (In Russ.)].
66. Рогозин Е. А., Уразова Л. Н., Серебров В. Ю. Изменения цитологических показателей опухоли Эрлиха, индуцированные комплексной терапией винкристином и вакцинным штаммом вируса венесуэльского энцефаломиелиита. *Сибирский научный медицинский журнал* 2003;2:121–4. [Rogozin E. A., Urazova L. N., Serebrov V. Yu. Experimental therapy of Ehrlich carcinoma with vincristine and the vaccine Venezuelan encephalomyelitis virus strain and its cytological evolution. *Sibirskiy naushniy medicinskiy journal = Siberian scientific medical journal* 2003;2:121–4 (In Russ.)].
67. Громова А. Ю. Противоопухолевые свойства вакцинного штамма вируса венесуэльского энцефаломиелиита и его онколизата. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1999. [Gromova A. Yu. Antitumor properties of the vaccine strain of Venezuelan encephalomyelitis virus and its oncolysate. *Abstr. dissertation (Biology)*. St. Petersburg, 1999 (In Russ.)].
68. Shino Y., Sunouchi K., Asano T. et al. Patent № 7270812 B2, Sep. 18, 2007. Pharmaceutical composition for treatment of cancers.
69. Ito H., Aoki H., Kuhnel F. et al. Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Nat Cancer Inst* 2006;98:625–36. DOI: 10.1093/jnci/djj161. PMID: 16670388.
70. García M. A., Krupa M., Esteban M. Antitumor activity of oncolytic vaccinia virus expressing the interferon-induced dsRNA dependent protein kinase PKR. *An R Acad Nac Farm* 2010;76(3):327–42.
71. Munschau L., Faller D. Oncogenic ras induces an inhibitor of double-strand RNA-dependent eukaryotic initiation factor 2a-kinase activation. *J Biol Chem* 1992;267:23092–98.
72. Smith K. D., Mezhr J. J., Bickenbach K. et al. Activated MEK suppresses activation PKR and enables efficient replication and in vivo oncolysis by delthagamma(1) 34,5 mutants of herpes simplex virus 1. *J Virol* 2006;80:1110–20. DOI: 10.1128/JVI.80.3.1110-1120.2006. PMID: 16414988.
73. Корчагина К. В., Губанова Н. В., Максимова Д. А. и др. Морфологическое изучение влияния вируса болезни Ньюкасла штамма ndv/adigea/duck/8 на ультраструктурную организацию нормальных и опухолевых клеток человека в культуре. *Вестник НГУ. Серия Биология, Клиническая медицина* 2012;10(2):84–93. [Korchagina K. V., Gubanova N. V., Maksimova D. A. et al. Morphological study of influence of Newcastle disease virus strain ndv/adigea/duck/8 on ultrastructural organization of normal and cancer cells in vitro. *Bulletin of the NSU. Biology Series. Clinicheskaya Medicina = Clinical Medicine* 2012;10(2):84–93 (In Russ.)].
74. Volgestein B., Lane D., Levine A. J. Surfing the p53 network. *Nature* 2000;408:307–10. DOI: 10.1038/35042675. PMID: 11099028.
75. Chen G., Zhang S., He X. et al. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. *OncoTargets Ther* 2014;7:1901–9. DOI: 10.2147/OTT.S50483. PMID: 25364261.
76. Querido E., Blanchette P., Yan Q. et al. Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a cullin-containing complex. *Genes Dev* 2001;15:3104–17. DOI: 10.1101/gad.926401. PMID: 11731475.
77. Greenblatt M. S., Bennett W. P., Hollstein M. et al. Mutation in the p53 suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*

- 1994;54:4855–78. DOI:10.1016/0169-5002(94)92083-4. PMID: 8069852.
78. Tollefson A.E., Ryser J.S., Scaria A., et al. The E3–11.6 kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells, infected with adp mutants. *Virology* 1996;220:152–62. DOI: 10.1006/viro.1996.0295. PMID: 8659107.
79. Khuri F.A., Nemunaitis J., Ganly I. et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 2000;6:879–85. DOI:10.1038/78638. PMID: 10932224.
80. Nemunaitis J., Tong A.W., Nemunaitis M. et al. A phase I study of telomerase – specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther* 2010;18:429–34. DOI:10.1038/mt.2009.262.
81. Nakagawa T., Tanaka H., Shirakawa T. et al. Cyclooxygenase 2 Promoter – Based Replication-Selective Adenoviral Vector for Hypopharyngeal Cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;135(3):282–6. DOI: 10.1001/archoto.2008.549. PMID: 19289707.
82. Shirakawa T. Hamada K., Zhang Z. et al. A COX-2 promoter-based replication-selective adenoviral vector to target COX-2 – expressing human bladder cancer cells. *Clin Canc Res* 2004;10:4342–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0267. PMID: 15240520.
83. Choi J.W., Jung S.J., Kasala D. et al. pH-sensitive oncolytic hybrid targeting acidic tumor microenvironment and angiogenesis. *J Conr Release* 2015;205:134–43. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.01.005. PMID: 25575865.
84. Lu Yi., Zang Yu., Chang G. et al. Comparison of prostate specific promoters and the use of PSP – driven virotherapy of prostate cancer. *Biomed Res Int* 2013;2013:624632. DOI: 10.1155/2013/624632. PMID: 23484134.
85. Cervantes-García D., Ortiz-López R., Mayek-Pérez N. et al. Oncolytic virotherapy. *Ann Hepatol* 2008;7(1):34–45. PMID: 18376364.
86. Gonzalez R., Huang W., Finnen R. et al. Adenovirus E1B 55-kilodalton protein is required for both regulation of mRNA export and efficient entry into the late phase of infection in normal human fibroblasts. *J Virol* 2006;80:964–74. DOI: 10.1128/JVI.80.2.964-974.2006. PMID: 16378998.
87. Pei-Hsin C., Wechman S.L., McMasters K.M. Oncolytic replication of E1b-deleted adenoviruses. *Viruses* 2015;7(11):5767–79. DOI: 10.3390/v7112905. PMID: 26561828.
88. Zhou J., Yao Q.M., Li J.L. et al. Synergistic antitumor activity of triple regulated oncolytic adenovirus with VSTM1 and daunorubicin in leukemic cells. *Apoptosis* 2016;21(10):1179–90. DOI: 10.1007/s10495-016-1276-8. PMID: 27472927.
89. Huang P., Watanabe M., Kaku H. et al. Direct and distant antitumor effects of a telomerase – selective oncolytic adenoviral agent OBP-301 in a mouse prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* 2008;15:315–22. DOI: 10.1038/cgt.2008.3. PMID: 18274558.
90. Daisuke S., Yuji K., Seiji K. et al. Antitumor effects of telomerase-specific replication-selective oncolytic viruses for adenoid cystic carcinoma cell lines. *Oncol Reports* 2013;30(6):2659–64. DOI: 10.3892/or.2013.2738. PMID: 24065118.
91. Cheng X., Wang W., Xu Q. et al. Genetic modification of oncolytic Newcastle disease virus for cancer therapy. *J Virol* 2016;90(11):5343–52. DOI: 10.1128/JVI.00136–16. PMID: 27009956.
92. Kojima T., Kuroda S., Yano S. et al. In vivo biological purging for lymph node metastasis of human colorectal cancer by telomerase-specific oncolytic virotherapy. *Ann Surg* 2010;251(6):1079–86. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181deb69d. PMID: 20485131.
93. Ruiz A.J., Hadac E.M., Nace R.A. et al. MicroRNA-detargeted mengovirus for oncolytic virotherapy. *J Virol* 2016;90(8):4078–92. DOI: 10.1128/JVI.02810-15. PMID: 26865716.
94. Lemay C.G., Keller B.A., Edge R.E. et al. Oncolytic Viruses The Best is Yet to Come. *Curr Cancer Drug Targets* 2018;18(2):109–23. DOI: 10.2174/1568009617666170206111609. PMID: 28176648.
95. Kirn D. Clinical research results with dl1520 (ONYX-015), a replication-selective adenovirus for the treatment of cancer: What have we learned? *Gene Ther* 2001;8:89–98.
96. Nishiyama Y., Goshima F. Oncolytic virotherapy using replication-competent herpes simplex viruses. *Uirusu* 2007;57(1):57–65. DOI: 10.2222/jsv.57.57.
97. Markert J.M., Medlock M.D., Rabkin S.D. et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 2000;7:867–4. DOI: 10.1038/sj.gt.3301205. PMID: 10845725.
98. Freeman A.I., Zakay-Rones Z., Gomori J.M. et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Mol Ther* 2006;13:221–8. DOI: 10.1016/j.ymthe.2005.08.016. PMID: 16257582.
99. Сосновцева А.О., Липатова А.В., Гриненко Н.Ф. и др. Чувствительность клеток глиомы С6, несущих полиовирусный рецептор человека, к онколитическим полиовирусам. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2016;161(6):780–4. [Sosnovtseva A.O., Lipatova A.V., Grinenko N.F. et al. Sensitivity of c6 glioma cells carrying the human poliovirus receptor to oncolytic polioviruses. *Bulleten experimentalnoi biologii i medicine = Bulletin of experimental biology and medicine* 2016;161(6):780–4. (In Russ.)].
100. Сосновцева А.О., Гриненко Н.Ф., Липатова А.В. и др. Онколитические вирусы в терапии злокачественных глиом. *Биомедицинская химия* 2016;62(4):376–90. DOI: 10.18097/PBMC20166204376. [Sosnovtseva A.O., Grinenko N.F., Lipatova A.V. Oncolytic viruses for therapy of malignant glioma. *Biomedicinskaiia Khimiia = Biomedical Chemistry* 2016;62(4):376–90 (In Russ.)].
101. Foreman P.M., Friedeman G.K., Cassady K.A. et al. Oncolytic virotherapy for the treatment malignant glioma. *Neurotherapeutics* 2017;14(2):333–44. DOI: 10.1007/s13311-017-0516-0.
102. Gardeck A.M., Sheehan J., Low W.C. Immune and viral therapies for malignant primary brain tumors. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17(4):457–74. DOI: 10.1080/14712598.2017.1296132. PMID: 28274139.
103. Кешелова В.В., Ляшенко А.А. Патент RU 2379055 от 20.01.2010. Способ лечения онкологических заболеваний. [Keshelova V.V., Lyashenko A.A. Patent RU 2379055 dated January 20, 2010. A method of treating cancer. (In Russ.)].
104. Подольская М.В., Гамарник Т.В. Неoadъювантная иммунотерапия рака молочной железы онколитическим вирусом болезни Ньюкасла. *Сибирский онкологический журнал* 2009; прил. № 1:156–7. [Podol'skaia M.V., Gamarnik T.V. Neoadjuvant immunotherapy of breast cancer with the oncolytic Newcastle disease virus. *Sibirskii onkologicheskii journal = Siberian*

- journal of Oncology 2009; suppl No 1:156–7. (In Russ.).
105. Siurala M., Bramante S., Vassilev L. et al. Oncolytic adenovirus and doxorubicin-based chemotherapy results in antitumor activity against soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer* 2015;136:945–54. DOI: 10.1002/ijc.29048. PMID: 24975392.
 106. Лоренс Р.М., Робертс М.С. Патент RU 2435586 от 10.01.2011. Лечение рака с применением вирусов фторпиримидинов и камптотецинов. [Lorens R.M., Roberts M.S. Patent RU 2435586 dated 10.01.2011. Cancer therapy with fluoropyrimidine and camptothecin viruses. (In Russ.)].
 107. Kleijn A., van den Bossche W., Haefner E.S. et al. The Sequence Delta24-RGD and TMZ Administration in malignant Glioma Affects Role of CD8+T Cell Anti-tumor Activity. *Mol Ther Oncolytics* 2017;1(5):11–9. DOI: 10.1016/j.omto.2017.02.002. PMID: 28480325.
 108. Roberts J.L., Tavallai M., Nourbakhsh A. et al. GRP/Dna K a target for nexavar/stivagra/votrient in the treatment human malignancies, viral infections and bacterial diseases. *J Cell Physiol* 2015;230:2552–78. DOI: 10.1002/jcp.25014. PMID: 25858032.
 109. Berghauer Pont L.M., Balvers R.K., Kloezeman J.J. et al. In vitro screening of clinical drugs identifies sensitizers of oncolytic viral therapy in glioblastoma stem-like cells. *Gene Ther* 2015;22(13):947–59. DOI: 10.1038/gt.2015.72. PMID: 26196249.
 110. Reid T., Galanis E., Abbruzzese J. et al. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl 1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther* 2001;8:1618–26. DOI:10.1038/sj.gt.3301512
 111. Pecora A.L., Rizvi N., Cohen G.I. et al. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. *J Clin Oncol* 2002;20(9):2251–66. DOI: 10.1200/JCO.2002.08.042. PMID: 11980996.
 112. Norman K.L., Lee P.W. K. Reovirus as a novel oncolytic agent. *J Clin Invest* 2000;105(8):1035–38. DOI:10.1172/JCI9871. PMID: 10772645.
 113. Figova K., Hrabeta J., Eckschlager T. Reovirus – possible therapy of cancer. *Neoplasma* 2006;53(6):457–62. PMID: 17167712.
 114. Mita A.C. Phase II study of REOLYSIN® in patients with bone and soft tissue sarcomas metastatic to the lung who had been deemed by their physicians to be unresponsive to or untreatable by standard therapies. 15th Annual Connective Tissue Oncology Meeting Miami Beach FL, 2009.
 115. Volimann G., Ozduman K., van der Pol A.N. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: Concepts and candidates. *Canc J* 2012;18(1):69–81. DOI: 10.1097/PPO.0b013e31824671c9. PMID: 22290260.
 116. Mahalingam D., Fountzilias C., Moseley J. et al. A phase II study Reolysin(pelareoper) in combination with carboplatin and paclitaxel for patients with advanced malignant melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;79(4):697–703. DOI: 10.3390/cancers10060160. PMID: 29799479.
 117. Babiker H.M., Riaz I.B., Husnain M., Borad M.J. Oncolytic virotherapy including Rigvir and standard therapies in malignant melanoma. *Oncolytic Virother* 2017;9(6):11–8. DOI:10.2147/OV.S100072. PMID: 28224120.
 118. Halldén G, Portella G. Oncolytic virotherapy with modified adenoviruses and novel therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16(10):945–58. DOI: 10.1517/14728222.2012.712962. PMID: 22880939.
 119. Gangi A., Zager J.S. The safety talimogene laherparepvec for the treatment of advanced melanoma. *Expert Opin Drug Saf* 2017;16(2):265–9. DOI: 10.1080/14740338.2017.1274729. PMID: 27989216.
 120. Martin C. Oncolytic viruses: treatment and implication for patients with gliomas. *Clin J Oncol Nurs* 2017;21(2):60–4. DOI: 10.1016/j.nurt.2009.04.011. PMID: 19560745.
 121. Msaouel P., Opyrchal M., Dispenzieri A. et al. Clinical trials with oncolytic measles virus: current status and future prospects. *Curr Cancer Drug Targets* 2018;18(2):177–87. DOI: 10.2174/1568009617666170222125035. PMID: 28228086.
 122. Taguchi S., Fukuchara H., Homma Y., Todo T. Current status clinical trials oncolytic virus therapy for urologic cancer. *Int J Urol* 2017;24(35):342–51. DOI: 10.1111/iju.13325. PMID: 28326624.
 123. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А. и др. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата «Канцеролизин». *Вопросы вирусологии* 2006;6:39–42. [Vdovichenko G.V., Petrishchenko V.A., Sergeev A.A. et al. Preclinical studies of the anticancer adenovirus cancerolysin preparation. *Voprosy virusologii* = *Problems of Oncology* 2006;51(6):39–42 (In Russ.)].
 124. Вдовиченко Г.В., Радаева И.Ф., Сергеев А.А. и др. Создание банков перевиваемой культуры клеток 293 для производства антиракового вирусного лечебного препарата «Канцеролизин». *Биотехнология* 2006;1:62–7. [Vdovichenko G.V., Radaeva I.F., Sergeev A.A. et al. Development of Banks of a 203-Cell Continuous Culture for Manufacturing the Anti-Tumor Therapeutic Preparation Cancerolysin. *Biotechnologia* = *Biotechnology* 2006;1:62–7. (In Russ.)].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ПРОИЗВОДНЫЕ ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КЛАСС ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

М.П. Киселева¹, В.С. Покровский^{1,2}, В.В. Татарский¹, Л.М. Борисова¹, И.С. Голубева¹, Л.В. Эктова¹

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

²Российский университет дружбы народов; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Марина Петровна Киселева marina-kiselyova@mail.ru

В работе обсуждаются возможные механизмы противоопухолевого действия соединений класса индокарбазолов. Приводятся литературные данные о способности препаратов на основе производных индокарбазолов взаимодействовать с несколькими внутриклеточными мишенями и, следовательно, индуцировать разные пути клеточной гибели. Представлены данные по изучению механизма противоопухолевого действия соединений ЛХС-1006 и ЛХС-1208, синтезированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Ключевые слова: производные индокарбазолов, механизм противоопухолевого действия, внутриклеточные мишени

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-20-26

INDOLOCARBAZOLE DERIVATIVES – A PROMISING CLASS OF ANTICANCER DRUGS

M.P. Kiseleva¹, V.S. Pokrovsky^{1,2}, V.V. Tataskiy¹, L.M. Borisova¹, I.S. Golubeva¹, L.V. Ektova¹

¹N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;

24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

²RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

The paper discusses the possible mechanisms of antitumor action of indolocarbazole derivatives. Here we present a data that show interaction drugs based on indolocarbazole derivatives with several intracellular targets and consequently activation different pathways of cell death. Also we present results of our studies on the mechanisms of antitumor action of compounds LCS-1006 and LCS-1208 synthesized in the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia.

Key words: indolocarbazole derivatives, mechanism of antitumor action, intracellular target

Введение

Основными недостатками большинства препаратов, используемых в химиотерапии злокачественных заболеваний, являются ограниченная избирательность действия и развитие устойчивости к ним опухолевых клеток. В связи с этим актуально создание новых противоопухолевых химиопрепаратов, действующих на конкретные биомишени опухолевых клеток [1–3]. Поэтому идентификация молекулярных мишеней и изучение их взаимодействия с исследуемыми препаратами – важный этап исследования перспективных противоопухолевых средств.

В клинических исследованиях за рубежом активно изучаются противоопухолевые свойства производных индокарбазола, в частности эффективный ингибитор протеинкиназы С (РКС) алкалоид стауропорин и его аналоги (энзастаурин, мидостаурин), а также близкий к стауропорину по структуре анти-

биотик ребеккамицин и его водорастворимое производное бекатекарин, обладающие противоопухолевой активностью, связанной с подавлением топоизомеразы I. Энзастаурин в сочетании с цитостатическими препаратами показал эффективность в лечении мелкоклеточного рака легкого [4]. Отмечена результативность комбинаций энзастаурина с темозоломидом у пациентов с рецидивом глиобластомы и с бевацизумабом при рецидивах злокачественных глиом [5, 6]. Оценена эффективность применения мидостаурина у пациентов с острым нелимфобластным лейкозом и острым миелобластным лейкозом, а также для лечения устойчивых к иматинибу желудочно-кишечных стромальных опухолей [7–9].

Клинические испытания показали умеренную эффективность бекатекарина в терапии рака молочной железы [10]. Отмечено, что бекатекарин при лечении мелкоклеточного рака легкого менее активен

в сравнении с существующими препаратами [11]. При метастатическом колоректальном раке бекатекарин оказался практически неэффективным [12]. Ингибитор топоизомеразы I эдотекарин проходит исследование в комбинации с цисплатином у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями (рак пищевода, рак желудка) [13].

Результаты клинических исследований различных производных индолокарбазолов продемонстрировали широкий спектр потенциальных показаний к их применению, а также хорошую сочетаемость с известными препаратами. В то же время эффективность производных индолокарбазолов была сопоставимой с существующими препаратами при наличии выраженной токсичности, прежде всего гематологической. Поэтому установление механизмов гибели опухолевых клеток при действии индолокарбазолов необходимо для поиска производных этого ряда соединений, обладающих оптимальной противоопухолевой активностью при минимальной токсичности.

У индолокарбазолов, производных стауроспорина и ребеккамицина, обнаружен широкий спектр различных биологических эффектов, включая фунгицидное, гипотензивное действие и способность ингибировать протеинкиназы [14]. Из наиболее значимых воздействий на клетки млекопитающих необходимо выделить способность индолокарбазолов ингибировать ряд протеинкиназ, эукариотические ДНК-топоизомеразы и связываться с ДНК.

Следует отметить, что классические киназные ингибиторы имеют минимальную молекулярную основу, определяющую биологическую активность соединения, называемого фармакофором, в котором соседние ароматическая аминогруппа и ароматический азот или кислород карбонильной группы образуют пару координированных водородных связей с шарнирной областью киназного домена (АТФ-связывающий участок), имитируя водородные связи молекулы АТФ. Стауроспорин стал одной из первых молекул, использованных в качестве фармакофорной основы для моделирования идеальной структуры ингибиторов протеинкиназ [15]. Возможность использования моделирования фармакофора позволила синтезировать высокоспецифичные ингибиторы целого ряда протеинкиназ, включая РКС, циклинзависимые киназы, киназы, связанные с G-протеином, тирозинкиназы и белок pUL97 цитомегаловируса [16].

Структурную часть молекулы, которая статистически часто повторяется среди специфического большинства уже известных биологически активных соединений, или среди известных лигандов данного типа соединений, или же известных ингибиторов данного фермента, называют привилегированной [17]. Исследование механизма действия способствует тому, что такие привилегированные элементы

химической структуры, как у N-гликозидов индолокарбазолов, могут быть предложены для разработки новых биологически активных соединений.

Известно, что производные индолокарбазолов с двумя N-гликозидными связями, такие как стауроспорин и родственные ему соединения (сограстаурин, мидостаурин и др.), являются мощными ингибиторами РКС – фермента, участвующего во внутриклеточной передаче сигналов [18–20].

Соединения, содержащие индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазольный хромофор с одной N-гликозидной связью, например ребеккамицин и его аналоги, обладают высокой противоопухолевой активностью, которую связывают с их способностью ингибировать фермент топоизомеразу I и/или II [21–23].

Клеточные мишени производных стауроспорина

Экспрессия гена множественной лекарственной устойчивости *MDR1* регулируется РКС-зависимым путем сигнальной трансдукции, ингибиторы РКС могут снижать экспрессию Р-гликопротеина в резистентных опухолевых клетках и тем самым повышать их чувствительность к химиотерапии [24]. Исследования, выполненные *in vitro* и *in vivo*, показали, что селективный ингибитор протеинкиназы 7-гидрокси-стауроспорин UCN-01 повышает противоопухолевую активность митомицина С и карбоплатина за счет усиления апоптоза, индуцируемого химиотерапевтическими агентами [3, 25, 26].

Кроме того, активация РКС необходима для ангиогенеза опухоли [2, 27]. К настоящему времени идентифицировано большое количество про- и антиангиогенных факторов, а также их рецепторов и путей сигнальной трансдукции. Все они могут быть мишенями для терапии. Многие из этих факторов связаны с тирозинкиназной активностью. Являясь клеточными рецепторами VEGF (Vascular endothelial growth factor), тирозинкиназы инициируют процесс ангиогенеза [28]. Производное карбазола CEP-5214 и его водорастворимый аналог CEP-7055 оказались мощными ингибиторами VEGF, инактивируя при этом внутриклеточные тирозинкиназы и нарушая каскад фосфорилирования, что задерживает пролиферацию эндотелиальных клеток и тормозит рост новых сосудов [29].

Активация регуляторных белков (циклинов) на разных стадиях клеточного цикла происходит с образованием комплекса с циклоспецифичной циклинзависимой киназой CDK1. Блокирование киназ приводит к остановке клеточного цикла. Среди индолокарбазолов способность ингибировать циклинзависимые киназы 1 и 2 проявили стауроспорин и его 7-гидроксианалог UCN-01 [30].

Другой производный аналог стауроспорина РКС-412 (мидостаурин) относится к агентам,

ингибирующим внутриклеточную тирозинкиназу FLT3. Как известно, FLT3-киназа экспрессирована на тех же стволовых CD34⁺ кроветворных клетках, на которых определяется высокий уровень экспрессии фактора стволовых клеток (c-kit) [31]. Однако следует отметить, что мидостаурин не имеет узконаправленного действия. Угнетая активность c-kit, мидостаурин ингибирует рецепторные тирозинкиназы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR) и сосудисто-эндотелиального фактора роста (VEGFR), отвечающие за пролиферацию и рост клеток [32].

Ациклический бисиндолмалеимид энзастаурин (LY-317615), разработанный в качестве мощного и селективного АТФ конкурентного ингибитора РКСβ, инициирует гибель опухолевых клеток путем подавления пролиферативной активности и ингибирует процесс опухолеиндуцированного ангиогенеза [33].

Энзастаурин в клинически нетоксичных концентрациях индуцирует апоптоз и влияет на передачу сигналов киназы Akt [34]. Необходимо отметить, что РКС способствует активации PI3K/Akt-сигнального внутриклеточного пути, интегрирующего митогенные и антиапоптотические стимулы. PI3K (фосфатидилинозитол 3-киназа) является одним из важнейших регуляторных белков, находящихся на пересечении разных сигнальных путей и контролирующих ключевые функции клетки. PI3K/Akt-путь вовлечен в рост и выживание гематологических злокачественных новообразований, и ингибирование этого пути рассматривается в качестве терапевтической мишени [35].

Клеточные мишени производных ребеккамицина

Другие производные индолокарбазолов – ребеккамицин и его аналоги – способны эффективно подавлять активность топоизомераз – ядерных ферментов, отвечающих за образование разрывов в цепи ДНК в процессе репликации и транскрипции. Ингибиторы топоизомеразы I вызывают обратимые нарушения отдельных нитей ДНК. Химиотерапевтические агенты, подавляющие активность топоизомеразы II, приводят к обратимым нарушениям разрыва двойных нитей. Ингибиторы топоизомеразной активности стабилизируют ДНК-топоизомеразный комплекс, делая клетку неспособной к синтезу ДНК, и являются эффективными индукторами апоптоза [36].

Ребеккамицин и его водорастворимый аналог бекатекарин (NSC-655649) интеркалируют в ДНК, ингибируют связь топоизомеразы I и II с местом расщепления ДНК, предотвращая дальнейшие действия в каталитическом цикле, и инициируют апоптоз [37].

К эффективным ингибиторам топоизомеразы I относится эдотекарин (J-107088), который образует стабильный комплекс ДНК – топоизомеразы I, что приводит к нарушению синтеза ДНК [38].

Индолокарбазолы ЭД-110 и NB-506, воздействуя на ДНК-зависимые топоизомеразы опухолевой клетки, нарушают структуру двойной спирали и, препятствуя репарации разрывов, активизируют накопление поврежденных молекул ДНК, вызывая гибель клетки [39, 40].

К настоящему времени накоплена обширная база данных об антипролиферативной активности индолокарбазолов различной химической структуры, позволяющая считать соединения этого класса перспективными для дальнейшего изучения [41].

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России синтезирован ряд соединений производных индолокарбазолов, среди которых изучен механизм противоопухолевого действия арабинопиранозидов ЛХС-1006 и ЛХС-1208 с разной структурой агликона [42–45].

Внутриклеточной мишенью для индолокарбазола ЛХС-1006 является двухцепочечная ДНК. Количественный расчет констант связывания ЛХС-1006 с ДНК позволил установить, что соединение образует 2 типа комплексов с высокой и низкой константой связывания. Так, при взаимодействии индолокарбазола с нативной ДНК формируется комплекс с высокой константой связывания с дуспиральной ДНК ($K^1 = 60 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$). Анализ сайт-специфичности связывания показал, что предпочтительными для ЛХС-1006 являются пары GC, что также характерно для углеводных производных индолокарбазола. Эти участки представлены местами первоначального связывания ЛХС-1006 и образования высокоаффинных комплексов с нативной ДНК (~20 % всех мест связывания). С возрастанием концентрации лиганда и заполнением этих участков формируются более слабые комплексы. При насыщении мест связывания молекулами ЛХС-1006 на каждые 2 пары оснований приходится 1 молекула лиганда с меньшей константой связывания [46].

Встраивание молекулы индолокарбазола ЛХС-1006 между основаниями нуклеиновых кислот способствует раскручиванию двойной спирали ДНК и вносит изменения в ее конформацию. Такие изменения могут приводить к ингибированию комплекса ДНК – топоизомеразы I, блокированию матричных синтезов и активации сенсоров повреждений ДНК, в том числе p53, что инициирует запрограммированную клеточную гибель (апоптоз).

Так как фиксация комплекса ДНК – топоизомеразы I является характерной для ряда индолокарбазолов, авторами исследовательской работы был проведен анализ действия ЛХС-1006 на релаксацию суперскрученной ДНК в бесклеточной системе. Ингибирование 50 % реакции релаксации суперскрученной ДНК обнаружено при концентрации ЛХС-1006 ~2 мкМ, полное ингибирование активности

топоизомеразы I наблюдалось при концентрации 5 мкМ. Для других производных индолокарбазолов было показано, что ингибирование активности топоизомеразы I происходило на этапе сшивки нитей ДНК, что приводило к образованию множества одностранных разрывов ДНК при репликации. Блокирование репликации исследовали по включению ³H-тимидина клетками линии НСТ-116. Согласно полученным данным, ЛХС-1006 эффективно ингибировал репликацию в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 мкМ уже в течение 3 ч [47].

Следует отметить, что повреждение ДНК и ингибирование репликации вызывает активацию АТМ- и АТР-киназ с последующей активацией каскада ответа на повреждение ДНК (в том числе стабилизацию и активацию p53 chk1 и chk2, p21 и т. д.), блокирование прохождения клеток по клеточному циклу и индукцию апоптоза [48, 49].

Результатами взаимодействия ЛХС-1006 с ДНК являются нарушение конформации дуплекса, снижение активности топоизомеразы I и p53-зависимая трансактивация генной транскрипции. Так, p53-зависимая активация транскрипции была изучена на сублинии НСТ-116, стабильно трансфицированной плазмидой с репортерным геном, находящимся под контролем p53-зависимого промотора. При обработке клеток препаратом активация p53 возрастала до 3-кратного увеличения экспрессии репортерного гена при концентрации 1 мкМ, а затем падала до уровня, составляющего половину контрольного. Необходимо отметить, что такое падение типично для агентов, связывающихся с ДНК, таких как цитарабин, митоксантрон, этопозид и доксорубин, и может быть связано с ингибированием транскрипции при увеличении концентраций или невозможности для p53 связаться со своими респонсивными элементами в промоторе. Для установления значимости p53 для цитотоксичности авторы проводили сравнение гибели клеток в МТТ-тесте для линии НСТ-116 с диким типом гена *TP53* и делецией этого гена (НСТ-116p53KO). Полученные различия между кривыми гибели не превышали погрешность метода, что определило второстепенную роль p53 в цитотоксичности ЛХС-1006. Это могло быть обусловлено ролью ингибирования активности топоизомеразы I в цитотоксичности, так как в ряде исследований показано, что ингибиторы топоизомеразы I могут вызывать активацию апоптоза независимо от статуса p53 в клетке [50].

Ингибирование репликации, повреждение ДНК, активация p53 могут приводить к блокированию клеток в одной или нескольких фазах клеточного цикла и запуску запрограммированной клеточной гибели. Анализ распределения клеток по фазам цикла показал, что увеличение концентрации индолокарбазола ЛХС-1006 приводило к увеличению количе-

ства клеток с деградацией ДНК (до максимума 70 % при наиболее высокой изученной концентрации). При этом цитотоксическое действие ЛХС-1006 сопровождалось фрагментацией ядерного материала у большинства клеток. Количество клеток в G1- и S-фазах стабильно падало при увеличении концентрации. Процент клеток, находящихся в G2/M-фазе, незначительно возрастал до максимума в 42 % при концентрации 1 мкМ, а затем резко снижался при дальнейшем увеличении концентрации. Предположительно, блокирование клеток в G2/M-фазе может предотвращать клеточную гибель, которая происходит в других фазах цикла. При этом уменьшение процента клеток в G2/M-фазе происходит в тех же концентрациях, что и падение p53-зависимой транскрипции, что может свидетельствовать о важности этого механизма для блокирования клеток в G2/M-фазе при действии индолокарбазола ЛХС-1006. Другими причинами уменьшения количества клеток в этой фазе цикла могут служить ингибирование транскрипции и соответствующее уменьшение экспрессии белков, необходимых для блока митоза. Также возможно, что при увеличении концентрации индолокарбазола ЛХС-1006 происходит ингибирование других внутриклеточных мишеней, что вызывает гибель клеток в G2/M-фазе [51].

ЛХС-1006 эффективно воздействует на клетки с делецией каспазы 3 (MCF-7), подтверждая, что апоптоз является не единственным индуцируемым видом гибели при действии ЛХС-1006. Таким образом, делеции генов, контролирующих процесс апоптоза, не блокируют гибель клеток, обработанных индолокарбазолом, что является важным свойством вещества как потенциального средства для химиотерапии [52].

По результатам морфологического анализа при действии ЛХС-1006 в клетках НСТ-116 отмечаются фрагментированные ядра, а также формирование апоптотических телец. Это согласуется с данными, полученными с помощью анализа плоидности и изучения характера деградации ДНК в вышеописанных экспериментах, и подтверждает, что основным типом клеточной гибели является апоптоз.

Итак, механизмы гибели клеток при действии ЛХС-1006 включают ингибирование пролиферации, остановку клеточного цикла и активацию апоптоза. Эти механизмы проявляются в зависимости от концентрации индолокарбазола ЛХС-1006 и его взаимодействия с конкретными внутриклеточными мишенями.

Компьютерное моделирование взаимодействия молекулы арабинопиранозила ЛХС-1006 с ДНК показало, что соединение интеркалирует индолокарбазольной частью, а углеводная группа образует в малой бороздке дополнительные водородные связи [46].

Особенностью взаимодействия ЛХС-1006 с ДНК является образование сильного комплекса с нативной ДНК, причем лиганд занимает ~20 % всех мест связывания. При насыщении мест связывания молекулами ЛХС-1006 на каждые 2 пары оснований приходится 1 молекула лиганда. В результате образования интеркаляционных комплексов нарушается конформация двойной спирали за счет сильного растяжения и раскручивания при максимальном заполнении ДНК лигандом. Вызываемые комплексобразованием изменения конформации двойной спирали ДНК нарушают матричные синтезы. Гибель опухолевых клеток наступает в основном за счет образования сильного типа интеркаляционных комплексов между лигандом и ДНК [43].

Определены мишени и молекулярные механизмы противоопухолевого действия производного индолокарбазола ЛХС-1208. Арабинопиранозил ЛХС-1208 интеркалирует в двухцепочечную ДНК с образованием высокоаффинных комплексов, характеризующихся различными константами связывания и максимальным числом мест посадки лиганда. Одна молекула ЛХС-1208 занимает участок, соответствующий 4×5 нуклеотидным остаткам. Анализ функций лиганда подтверждает его влияние на проникновение через мембраны, внутриклеточную миграцию, сортировку и секрецию белков [44, 45]. Установлено, что ЛХС-1208 в микромолярных концентрациях ингибирует ядерный белковый фермент топоизомеразу I, необходимую для образования временного комплекса с разорванной спиралью опухолевой ДНК во время процесса репликации.

Таким образом, непосредственными мишенями производных индолокарбазолов могут служить топоизомеразы I и II, серин-треониновые протеинкиназы, PKC, связанная с G-протеином и P-гликопротеином, Akt и PI3K киназы, циклинзависимые киназы 1 и 2, тирозинкиназа FLT3. Вместе с тем ингибирование этих киназ не всегда достаточно для реализации цитотоксичности, тогда как не только антипролиферативный эффект, а именно индукция гибели существенна для элиминации опухолевых клеток.

Кроме того, действие индолокарбазолов может стимулировать дополнительные механизмы, например вакуолизацию цитоплазмы, связанную с активацией вакуолярной АТФазы. Так, отличительной особенностью гибели клеток при действии производного индолокарбазола ЛХС-1006 является фенотип вакуолизации цитоплазмы, связанный с быстрым расширением лизосомального компартмента в результате активности вакуолярной АТФазы [43]. Некоторые представители класса индолокарбазолов могут встраиваться в участок АВЛ-тирозинкиназы, называемый «тирозиновым карманом», блокируя процесс фосфорилирования и последовательно всю цепь событий, приводя к пролиферации патологических клеток [29].

Заключение

Открытие ряда биологических активностей у индолокарбазолов привело к поиску и созданию их синтетических аналогов и низкомолекулярных производных, представляющих терапевтически важный класс противоопухолевых средств с меньшими токсическими свойствами. В ряде работ предложены различные подходы к химической модификации соединений указанного класса, позволяющие повысить их противоопухолевый эффект, исходя из их структурных особенностей и молекулярного механизма действия.

Исследование механизма действия способствует тому, что различные модификации химической структуры индолокарбазолов могут быть использованы в качестве основы для разработки новых биологически активных соединений или новых лекарств со сходными или, возможно, улучшенными по сравнению с исходными соединениями свойствами, а также для разработки библиотек таких соединений.

Разработка новых потенциальных противоопухолевых препаратов из класса производных индолокарбазолов необходима для расширения возможностей химиотерапевтического лечения злокачественных новообразований и перспективна для преодоления лекарственной резистентности опухолевых клеток за счет индукторов, связанных с механизмом их действия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shtil A.A. Signal transduction pathways and transcriptional mechanisms as targets for prevention of emergence of multidrug resistance in human cancer cells (invited review). *Current Drug Targets* 2001;2:57–77. PMID: 11465539. DOI:10.2174/1389450013348957.
2. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза, апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2011;10(3):25–30. [Blokhin D.Y., Chmutin E.F., Ivanov P.K. Molecular targets for anticancer therapy: growth factors, angiogenesis and apoptosis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal* 2011;10(3):25–30. (In Russ.)].
3. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: пути передачи сигнала и эпигенетические

- модуляторы. Российский биотерапевтический журнал 2011;10(4):81–8. [Blokhin D.Y., Chmutin E.F., Ivanov P.K. Molecular targets for anticancer therapy: signaling pathways and epigenetic modulators. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2011;10(4):81–8. (In Russ.)].
4. Oh Y., Herbst R.S., Burris H. et al. Enzastaurin, an oral, serine/threonine kinase inhibitor, as second- or third-line therapy of non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(7):1135–41. PMID: 18309949. DOI: 10.1200/jco.2007.14.3685.
 5. Rampling R., Sanson M., Gorlia T. et al. A phase I study of LY317615 (enzastaurin) and temozolomide in patients with gliomas (EORTC trial 26054). *Neuro-Oncology* 2012;14:344–50. PMID: 22291006. DOI: 10.1093/neuonc/nor221.
 6. Oda Y., Iwamoto F.M., Moustakas A. et al. A phase II trial of enzastaurin (LY317615) in combination with bevacizumab in adults with recurrent malignant gliomas. *J Neurooncol* 2016;127(1):127–35. PMID: 26643807. DOI: 10.1007/s11060-015-2020-x.
 7. Stone R.M., De Angelo D.J., Klimek V. et al. Patients with acute myeloid leukemia and an activating mutation in FLT3 respond to a small-molecule FLT3 tyrosine kinase inhibitor, PKC 412. *Blood* 2005;105:54–60. PMID: 15345597. DOI: 10.1182/blood-2004-03-0891.
 8. Cools J., Mentens N., Furet P. et al. Prediction of resistance to small molecule FLT3 inhibitors: implications for molecularly targeted therapy of acute leukemia. *Cancer Res* 2004; 64(18): 6385–9. PMID: 15374944. DOI: 10.1158/0008-5472.can-04-2148.
 9. Колс Ян. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей. Патент США № 5093330 от 03.03.1992 г. [Kols Jan (BE) Administration of Midostaurin for treating gastrointestinal stromal tumours. RU2 410 098 C2. (In Russ.)].
 10. Burstein H.J., Overmoyer B., Gelman R. et al. Rebeccamycin analog for refractory breast cancer: a randomized phase II trial of dosing schedules. *Invest New Drugs* 2007;25(2):161–4. PMID: 16969707. DOI: 10.1007/s10637-006-9007-6.
 11. Schwandt A., Mekhail T., Halmos B. et al. Phase-II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and -II inhibitor, in relapsed “sensitive” small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012;7(4):751–4. PMID: 22425925. DOI: 10.1097/jto.0b013e31824abca2.
 12. Goel S., Wädler S., Hoffman A. et al. A phase II study of rebeccamycin analog NSC 655649 in patients with metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2003;21(1):103–7. PMID: 12795535.
 13. Clinical Trials. gov: A service of the U.S. National Institutes of Health. (Accessed on 20 June 2015). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.clinicaltrials.gov>
 14. Sánchez C., Méndez C., Salas J.A. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. *Nat Prod Rep* 2006;23:1007–45. PMID: 17119643. DOI: 10.1039/b601930g
 15. Fabbro D., Ruetz S., Buchdunger E. Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs. *Pharmacol Ther* 2002;93(2–3):79–98. PMID: 12191602. DOI: 10.1016/S0163-7258(02)00179-1.
 16. Zimmermann A., Wilts H., Lenhardt M. et al. Indolocarbazoles exhibit strong antiviral activity against human cytomegalovirus and are potent inhibitors of the pUL97 protein kinase. *Antiviral Res* 2000;48:49–60. PMID: 11080540. DOI: 10.1016/S0166-3542(00)00118-2.
 17. Kombarov R., Altieri A., Genis D. et al. BioCores: identification of a drug/natural product-based privileged structural motif for small-molecule lead discovery. *Mol Divers* 2010;14(1):193–200. PMID: 19468851. DOI: 10.1007/s11030-009-9157-5.
 18. Kleinschrot J., Hartenstein J., Rudolf C., Schachtele C. Novel indolocarbazole protein kinase C inhibitors with improved biochemical and physicochemical properties. *Bioorg Med Chem Lett* 1995;5:55–60.
 19. Goekjian P.G., Jirousek M.R. Protein kinase C in the treatment of disease: signal transduction pathways, inhibitors, and agents in development. *Curr Med Chem* 1999;6:877–903. PMID: 10495357.
 20. Bridges A.J. Chemical Inhibitors of Protein Kinases. *Chem Rev* 2001; 101:2541–71. DOI: 10.1021/cr000250y.
 21. Bush J.A., Long B.H., Catino J.J., Bradner W.T. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent. *J Antibiotics* 1987;40:668–78. PMID: 3112080. DOI: 10.7164/antibiotics.40.668.
 22. Sordet O., Khan Q.A., Kohn K.W., Pommier Y. Apoptosis induced by topoisomerase inhibitors. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2003;3(4):271–90. DOI: 10.2174/1568011033482378.
 23. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск ингибиторов топоизомераз I и/или II среди N-гликозидов производных индоло- [2,3-а]карбазолов для лечения злокаче-
 - ственных опухолей. Материалы симпозиума «Результаты фундаментальных и прикладных исследований для создания новых лекарственных средств» (Москва, 9–11 июня 2008 г.). М.: Фирма «Слово», 2008. С. 191–92. [Smirnova Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Search for inhibitors of topoisomerases I and/or II among n-glycosides of indolo derivatives [2,3-a] carbazoles for the treatment of malignant tumors. Materials of the Symposium “results of fundamental and applied research for the development of new drugs” (Moscow, June 9–11, 2008). М.: Company “Word”, 2008. P. 191–92. (In Russ.)].
 24. List A.F. Non-P-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance. *Semin Hematol* 1997; 34(4 Suppl 5):40–7. PMID: 9408957.
 25. Gescher A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1998;31:721–28. PMID: 9809468.
 26. Akinaga S., Gomi K., Morimoto M. et al. Antitumor activity of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C, in murine and human tumor models. *Cancer Res* 1991;51:4888–92. PMID: 1893379.
 27. Sikic B.I. Pharmacologic approaches to reversing multidrug resistance. *Semin Hematol* 1997;34(4 Suppl 5):40–7. PMID: 9408960.
 28. Xia P., Aiello L.P., Ishii H. et al. Characterization of vascular endothelial growth factor’s effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest* 1996;98:2018–26. PMID: 8903320. DOI: 10.1172/JCI119006.
 29. Ruggeri B., Singh J., Gingrich D. et al. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models. *Cancer Res* 2003;63(18):5978–91. PMID: 14522925.
 30. Bredel M., Pollack I.F., Freund J.M. et al. Protein kinase C inhibition by UCN-01 induces apoptosis in human glioma cells in a time-dependent fashion. *J Neurooncol* 1999;41:9–20. PMID: 10222418.
 31. Rosnet O., Buhning H.J., Marchetto S. et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinases expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 1996;10:248. PMID: 8637232.
 32. Weiseberg E., Boulton C., Kelly L.M. et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC. *Int J Cancer* 2002;1(5):433–43.

- PMID: 12124173. DOI:10.1016/s1535-6108(02)00069-7.
33. Faul M.M., Gillig J.R., Jirousek M.R. et al. Acyclic N-(azacycloalkyl) bisindolylmaleimides: isozyme selective inhibitors of PKC β . *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13:1857–9. PMID: 12749884. DOI:10.1002/chin.200336180.
 34. Querfeld C., Rizvi M.A., Kuzel T.M. et al. The selective protein kinase C β inhibitor enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway. *J Invest Dermatol* 2006;126(7):1641–7. PMID: 16645590. DOI: 10.1038/sj.jid.5700322.
 35. Rizvi M.A., Ghias K., Davies K.M. et al. Enzastaurin(LY317615), a protein kinase C β inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1783–9. PMID: 16891464. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0465.
 36. Denny W.A. Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* 2004;9:105–33. DOI: 10.1517/14728214.9.1.105.
 37. Long B.H., Rose W.S., Vyas D.M. et al. Discoveri of antitumor indolocarbazoles: Rebeccamycin, NSC 655649, and fluoroloindolocarbazoles. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2002;2:255–66. PMID: 12678746. DOI: 10.2174/156801102354218.
 38. Yoshinari T., Ohkubo M., Fukasawa K. et al. Mode of action of a new indolocarbazole anticancer agent, J-107088, targeting topoisomerase I. *Cancer Res* 1999;59:4271–5. PMID: 10485471.
 39. Yoshinari T., Yamada A., Uemura D. et al. Induction of Topoisomerase I-mediated DNA Cleavage by a New Indolocarbazole, ED-110. *Cancer Res* 1993;53:490–4. PMID: 8381047.
 40. Ohkubo M., Kojiri K., Kondo H. et al. Synthesis and Biological Activities of Topoisomerase I Inhibitors, 6-N-amino analogues of NB-506. *Bioorg Med Chem Letters* 1999;9:1219–24. PMID: 10340602.
 41. Sherer C., Snape T.J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope of indole and carbazole derivatives. *Eur J Med Chem* 2015;97:552–60. PMID: 25466446. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.11.007.
 42. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М. и др. Изучение противоопухолевой активности производного индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1006. *Российский биотерапевтический журнал* 2005;4(1):70–1. [Smirnova Z.S., Kubasova I.Yu., Borisova L.M. et al. The study of the antitumor activity of the indolo[2,3-a] carbazole derivative LHS-1006. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2005;4(1):70–1. (In Russ.)].
 43. Татарский В.В. Механизмы гибели опухолевых клеток при действии новых углеводных производных индолокарбазолов. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2 сентября 2010. 22 с. [Tatarsky V.V. Mechanisms of tumor cell death under the action of new carbohydrate derivatives of indolocarbazoles. Abstracts. Dis kand. biol. sciences. Moscow, September 2, 2010. 22 p. (In Russ.)].
 44. Киселева М.П., Шпрах З.С., Деженкова Л.Г. и др. Действие производного индолокарбазолов ЛХС-1208 на топоизомеразу I. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):89. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Dezhenkova L.G. et al. Effect of indolocarbazole derivative LHS-1208 on topoisomerase I. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(1):89. (In Russ.)].
 45. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. *Сообщение II. Российский биотерапевтический журнал* 2015;3:41–8. [Kiseleva M.P., Shprakh Z.S., Borisova L.M. et al. Preclinical study of antitumor activity of indolocarbazoles N-glycosides derivative LCS-1208. Report II. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;3:41–8. (In Russ.)].
 46. Kaluzhny D.N., Tatarskiy V.V., Dezhenkova L.G. et al. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to DNA. *Chem Med Chem* 2009;4(10):1641–8. PMID: 19672918. DOI:10.1002/cmcd.200900227.
 47. Tatarskiy V.V., Kaluzhny D.N., Shchyolkina A.K. et al. High antitumor activity of novel glycosylated indolocarbazole is determined by strong intercalation into DNA. Proc. 14th Euroconference on Apoptosis “Death or Survival: Fate in Sardinia”, Chia, Italy, 2006 230 p.
 48. Denny W.A. Emerging DNA topoisomerase inhibitors as anticancer drugs. *Expert Opin Emerg Drugs* 2004;9:105–33. PMID: 15155139. DOI:10.1517/14728214.9.1.105.
 49. Jackson J.R., Gilmartin A., Imburgia C. et al. An indolocarbazole inhibitor of human checkpoint kinase (Chk1) abrogates cell cycle arrest caused by DNA damage. *Cancer Res* 2000;60:566–72. PMID: 10676638.
 50. Kaluzhny D.N., Borisova O.F., Shchyolkina A.K. et al. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to the duplex and telomeric G-quadruplex DNA. *Second International Meeting on Quadruplex DNA*, Louisville, KY, 2009 60 p.
 51. Калужный Д.Н., Татарский В.В., Бондарев Ф.С. и др. Взаимодействие с ДНК как фактор цитотоксичности нового гликозидного производного индолокарбазола. *Доклады РАН*. 2006;411(6):833–836. [Kaluzhny D.N., Tatarskiy V.V., Bondarev F.S. et al. Interaction with DNA as a Factor of Cytotoxicity of Novel Glycosylated Derivative of Indolocarbazole. *Reports of RAS*. 2006;411(6):833–36. (In Russ.)].
 52. Татарский В.В., Плихтык И.Л., Мельник С.Я. и др. Механизмы противоопухолевого действия нового производного индолокарбазолов. *Материалы конференции «Фундаментальная онкология. 2-е Чтения им. проф. Н.Н. Петрова»*. Санкт-Петербург, 2006. *Вопросы онкологии* 2006;52:38–9. [Tatarskiy V.V., Plihtyay I.L., Mel'nik S.Ya. et al. Mechanisms of the antitumor action of a new derivative of indolocarbazoles. Proceedings of the conference “Fundamental Oncology. 2nd Readings to them. prof. N.N. Petrov. St. Petersburg. *Voprosy oncologiy = Oncology issues* 2006;52:38–9. (In Russ.)].

ORCID авторов/ORCID of authors

В.С. Покровский/V.S. Pokrovsky: 0000-0003-4006-9320

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА И ИХ КСЕНОГРАФТЫ С МУТАЦИЯМИ BRAF ИЛИ NRAS В КАЧЕСТВЕ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ. ОБЗОР

И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина, Л.Ф. Морозова, Н.В. Андропова, И.Ж. Шубина, А.А. Лушникова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Николаевна Михайлова irmikhaylova@gmail.com

В обзоре представлен свод статей и патентов, описывающих новые модели пигментированной или амеланотической меланомы кожи человека *in vitro* и *in vivo*, полученные в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из метастазов пациентов. Помимо фактического материала, в обзоре обсуждаются молекулярно-генетические особенности новых моделей меланомы кожи, охарактеризованных как тест-системы для предклинических исследований. Объекты, описанные в публикации – 3 поликлональные клеточные линии, 2 субклона и 4 подкожных ксенографта у иммунодефицитных мышей *Balb/c nude*. Все модели хранятся в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, а клеточные линии также в Российской коллекции культур клеток позвоночных (Санкт-Петербург). Эта мини-коллекция предназначена для фундаментальных исследований меланомы кожи и доклинических испытаний антимеланомных средств. Основанием для этого служат адекватные цитологические, иммунологические, трансплантационные и молекулярно-генетические характеристики моделей, а также их лекарственная чувствительность *in vivo* к соответствующей таргетной терапии.

Ключевые слова: мини-коллекция, меланома человека, культура клеток, ксенографты, мутации

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-27-35

CELL LINES OF HUMAN MELANOMA AND THEIR XENOGRRAFT WITH BRAF OR NRAS MUTATIONS A TARGETS FOR TARGETED THERAPY. REVIEWS

I.N. Mikhaylova, E.M. Treshalina, L.F. Morozova, N.V. Andronova, I.Zh. Shubina, A.A. Lushnikova

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

The review presents a discussion on articles and patents, describing new *in vitro* and *in vivo* models of pigmented or non-pigmented human cutaneous melanoma, received in NMRCO from the patients» metastases. Molecular genetic characteristics of the new models is supported by the arguments in addition to the given data and visual materials. The subjects of the discussed publications are 3 polyclonal cell lines, 2 subclones and 4 subcutaneous (s/c) xenografts in immunodeficient mice *Balb/c nude*. All the models are stored in Cryo Collection with xenografts at N.N. Blokhin NMRCO as well as in the Russian Collection of Cell Cultures of Vertebrata (RCCCV, St. Petersburg). This mini-collection is recommended for use in basic research of cutaneous melanoma and pre-clinical studies of anti-melanoma agents. The basis for these studies are the appropriate characteristics of the models, including cytological, immunologic, transplantation and molecular-genetic ones, as well as *in vivo* drug sensitivity to the corresponding target therapy.

Key words: mini-collection, human melanoma, mutation, cell culture, xenograft

Введение

Меланома кожи (МК) человека – гетерогенное по фенотипу и молекулярно-генетическим характеристикам заболевание, диссеминированная форма которого отличается чрезвычайно низкой чувствительностью к различным видам терапии [1, 2]. Приоритетом при создании моделей МК *in vitro/in vivo* остается прогрессия опухоли, развивающаяся при наличии генных мутаций, дефектные продукты которых нарушают клеточную пролиферацию, диф-

ференцировку и ингибируют апоптоз. Клинически значимые мутации – V600E/K в экзоне 15 гена *BRAF*, приводящая к гиперактивации серинтреониновой *BRAF*-киназы, и Q61R/K/H в экзоне 3 гена *NRAS*, кодирующего малую ГТФазу. Мутации *NRAS* нередко выявляются в метастазах меланомы после терапии *BRAF*-ингибиторами [2–5]. Для избирательного блокирования терапевтически значимых мутаций создан ряд таргетных препаратов. Одними из наиболее эффективных являются направленный на V600E *BRAF*

Вемурафениб (Зелбораф) и применяемый для терапии распространенной МК селективный ингибитор киназ MEK1 и MEK2 Траметиниб (Мекинист), а направленные на мутантный Q61R NRAS Пимазертиб и Биниметиниб проходят клинические испытания [6–11]. В качестве модели для изучения антимеланомных таргетных препаратов представлены клеточные линии (КЛ) или субклоны КЛ и полученные из них подкожные (п/к) ксенографты [12–22]. Создание *in vitro/in vivo* доклинической тест-системы на основе культуры клеток и ксенографтов меланомы с терапевтически значимыми мутациями способствует исследованиям механизмов развития заболевания и доклиническому изучению новых антимеланомных лекарственных средств.

В обзоре описаны стабильные КЛ пигментной и малопигментной МК, полученные из хирургически удаленных метастазов. Один из клонов полностью охарактеризован по биологическим признакам в соответствии с целью исследования. Ксенографты получали путем адаптации к росту под кожей иммунодефицитных мышей-самок Balb/c nude – клеточных линий меланомы и субклонов одной из линий, как описано ранее [23]. В качестве контроля за адаптацией использовали следующие критерии: 100 % прививочную дозу клеток на «нулевом» пассаже *in vivo*, устойчивую трансплантацию взвесью опухолевой ткани со 100 % прививаемостью при многократном пассировании *in vivo*, стабильную кинетику роста на поздних (4–9-й) пассажах *in vivo*, идентичность клеточного состава ксенографта и КЛ, верификацию мутации в опухолевой ДНК и чувствительность опухоли к таргетной терапии Вемурафенибом и другими ингибиторами сигнального пути RAS/RAF/MEK/ERK.

Клеточная линия меланомы кожи mel Cher с высоким содержанием меланина

Клеточная линия mel Cher имеет высокий митотический потенциал, стабильные цитоморфологические и культуральные характеристики, индивидуальные фенотипические особенности и мутацию V600E в экзоне 15 гена *BRAF* [24]. КЛ mel Cher депонирована в Коллекции клеточных культур института цитологии РАН РККК (П) 704Д и хранится в криобанке НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Цитоморфологически КЛ mel Cher представлена низкодифференцированными, резко полиморфными клетками с множеством гигантских уродливых форм. На цитограмме выявляется большое количество округлых, овальных, удлинённых клеток, с неправильной формой ядер. Хроматин грубоглыбчатый, ядерная оболочка утолщена и неровная, ядрышки в количестве от 1 до 6 в ядре, выраженная гиперхромия, отмечены многочисленные атипичные митозы (рис. 1).

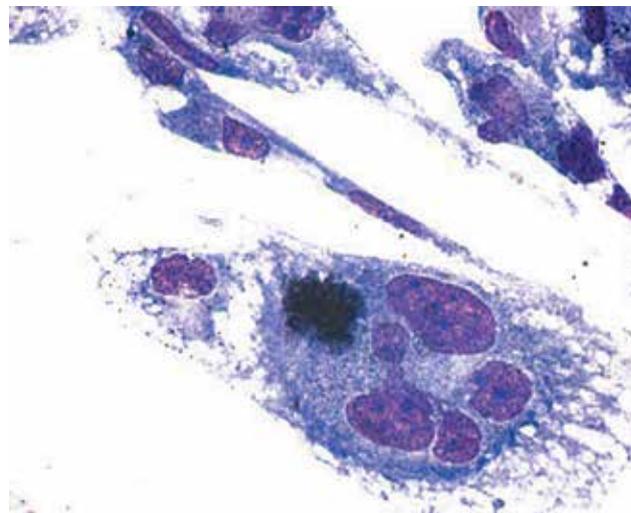


Рис. 1. Цитоморфологическая картина культуры клеток Cher/BRAF⁺ с выраженным пигментом. Окраска гематоксилином и эозином ×400

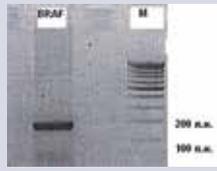
Для клеток линии mel Cher характерны различия по диаметру ядра при одинаковой плотности их окрашивания и при сходной структуре интерфазного хроматина. Цитогенетический анализ 25 метафаз показал, что число хромосом колеблется от 85 до 92, модальное число соответствует тетраплоидному набору (4n). В кариотипе обнаружена делеция короткого плеча хромосомы 4 (p12-pter), транслокация длинных плеч хромосомы 7 с образованием изохромосомы, дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на коротком плече хромосомы 9 в районе 9p21. Суммарный кариотип КЛ mel Cher: 85~92<4n>, XXYY, del (4) (p12), i (7) (q10), add (9) (p21) x2, inc 143.

В клетках линии mel Cher выявлена экспрессия следующих антигенов: дифференцировочных маркеров CD63, HMB45, тирозиназы (Tyrosinase) и мРНК генов, кодирующих раково-тестикулярные антигены класса MAGE [25–27]. Особенностью данной линии является экспрессия антигенов гистосовместимости I и II классов. Выявлена терапевтически значимая мутация V600E BRAF, активирующая RAF/MEK/ERK-сигнальный путь (табл. 1).

Подкожный ксенографт mel Cher

Ксенографт получен в результате имплантации $1,0 \times 10^7$ клеток п/к ксенографта «нулевого» пассажа *in vivo* пигментированной mel Cher с мутацией BRAF V600E. При последующей трансплантации по 50 мг клеточной взвеси мышам-самкам Balb/c nude вплоть до 9-го пассажа *in vivo* наблюдали стабильную кинетику роста с латентной фазой 8 дней, экспоненциальной – до 14 дней, стационарной – до 24 дней [15]. Кинетика роста п/к ксенографта mel Cher у мышей-самок Balb/c nude на 4–9-м поздних пассажах *in vivo* показана на рис. 2.

Таблица 1. Антигенный и мутационный профиль КЛ *mel Cher*

Антигены				Мутация/экзон			
дифференцировочные	раково-тестикулярные	гистосовместимости		<i>NRAS</i> /3-й	<i>BRAF</i> /15-й	Анализ ПЦР-продукта, М	
CD63	+	MAGE-3	+	Wt	V600E		
HMB45							HLA (I класс)
Tyrosinase +							HLA-DR (II класс)

Примечание. ПЦР – полимеразная цепная реакция. М – молекулярная масса.

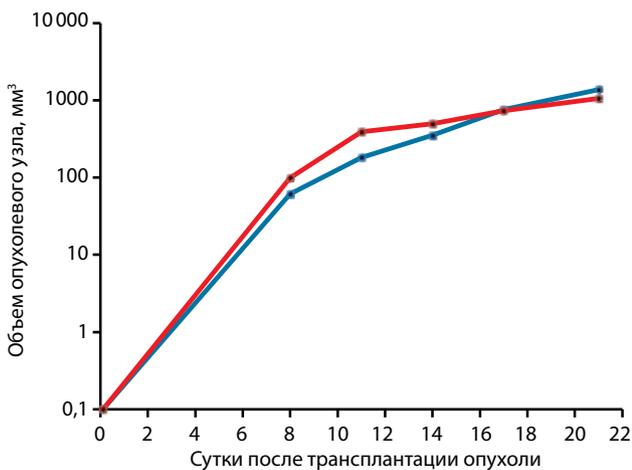


Рис. 2. Устойчивая кинетика роста п/к узлов 4-й и 9-й генерации у мышей *Valb/c nude* после имплантации $1,0 \times 10^7$ клеток («нулевой» пассаж *in vivo*) пигментированной МК человека *mel Cher*

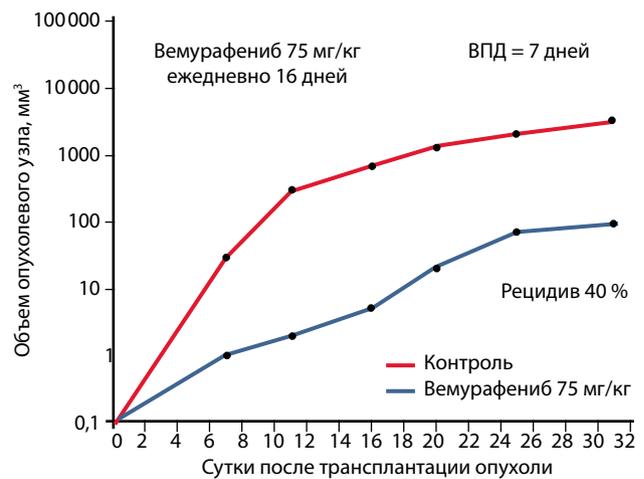


Рис. 3. Чувствительность п/к ксенографта *mel Cher/BRAF⁺* к вемурафенибу

Чувствительность п/к ксенографта *mel Cher/BRAF⁺* к Вемурафенибу, примененному в разовой дозе 75 мг/кг ежедневно 16-кратно, спустя 4–19 с после трансплантации, проявилась в достижении 7-дневной полной ремиссии с последующим рецидивом (рис. 3), [15, 18].

Таким образом, КЛ и п/к ксенографт пигментированной МК *mel Cher/BRAF⁺* с чувствительностью к ингибитору *BRAF*-киназы представляют собой адекватную тест-систему для поиска лечебных агентов пролонгированного действия, направленных на мутантную *BRAF*-киназу *in vivo*.

Клеточные линии меланомы кожи *mel Ras* с низким содержанием меланина

Клеточная линия *mel Ras* МК человека получена по описанному выше алгоритму из фрагмента мета-статического узла в мягких тканях правого бедра пациента с диссеминированной МК. Стабильно растущая КЛ хранится в Специализированной коллекции культур клеток позвоночных Российской коллекции клеточных культур под номером РККК (П) 710Д [17].

Цитограмма КЛ *mel Ras* представлена полиморфной популяцией клеток округлой, веретенообразной, вытянутой удлиненной, неправильной формы. Ядра клеток резко гиперхромные с зернистой структурой хроматина в виде крупных глыбок и зачастую содержат гипертрофированные ядрышки. В клетках наблюдается фрагментация и почкование ядер. Цитоплазма клеток негомогенная, интенсивно базофильная (рис. 4).

Кариологический анализ выявил 2 клон клеток с различными хромосомными нарушениями. Из 33 проанализированных метафаз 22 представляли 1 клон и 11 – другой. В клетках этих клонов обнаружено от 70 до 84 хромосом, модальное число соответствует гипертриплоидному набору ($3n+$). Обнаружено также 12 клеток с гексаплоидным ($6n$) набором (≈ 150 хромосом), что говорит о повышенном уровне полиплоидизации. В клетках первого клона выявлена нуллисомия по Y-хромосоме. В каждой из метафазных пластинок этого клона обнаружены две нормальные хромосомы 1, две хромосомы 1 с дополнительными фрагментами неизвестного происхождения на

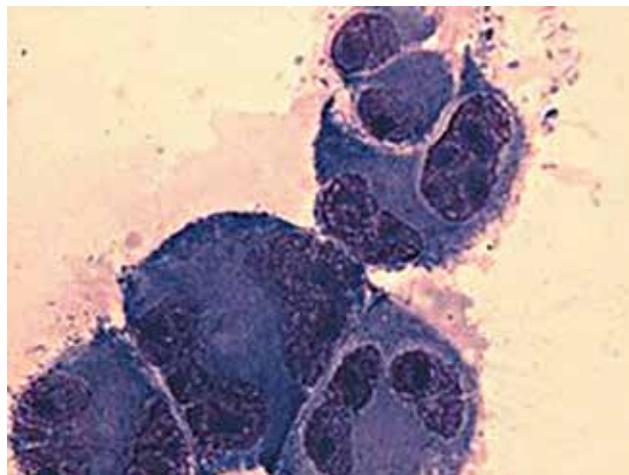
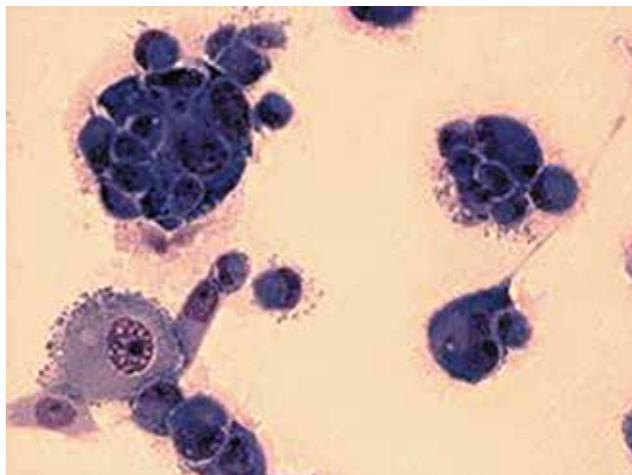


Рис 4. Морфология клеток из КЛ *mel Ras*. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$, $\times 400$

коротких плечах. Кроме того, выявлены транслокации фрагмента длинных плеч двух хромосом 1 (1q12 qter) с неидентифицированной хромосомой. Обнаружена делеция двух фрагментов длинных плеч хромосом 6 в районе 6q21, транслокация двух длинных плеч хромосомы 7 с образованием пары изохромосом и транслокация длинных плеч хромосом 9 и 14. В клетках первого клона линии *mel Ras* выявлено также по 2–3 маленьких маркерных хромосом и по 4 морфологически нормальных хромосомы 3. В 159 клетках 2-го клона выявлена дисомия по Y-хромосоме и нуллисомия по X-хромосоме. На длинном плече хромосомы 5 и на коротком плече хромосомы 9 обнаружен дополнительный хромосомный фрагмент неизвестного происхождения. В этих клетках выявлено по 4 морфологически нормальных хромосомы 3.

Суммарный кариотип КЛ *mel Ras*:

70~84<3n>XX,-Y,add(1)(p36),+add(1)(p36),del(6)(q21) $\times 2$,
i(7)(q10) $\times 2$,der(9;14)(q10;q10),+der(?)t(?;1)(?;q12) $\times 2$,+2~3mar, inc

70~84<3n>,YY,X,+3,add(5)(q35),add(9)(p21),inc.

Иммунофенотип КЛ включает экспрессию дифференцировочных антигенов CD63, HMW, экспрессии MelanA, HMB45, Tyrosinase не выявлено. Наблюдалась экспрессия мРНК генов, кодирующих раково-тестикулярные маркеры класса MAGE [25]. Особенностью данной линии является экспрессия антигенов гистосовместимости I и II класса [26, 27].

В результате полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице геномной ДНК получен ампликон длиной 143 п. н., соответствующий экзону 3 гена *NRAS*. При секвенировании ПЦР-продукта обнаружена мутация *NRAS* p. Q61R (с. 182A>G). Эта мутация верифицирована затем в п/к ксенографтах 9-го пассажа со стабильной кинетикой роста на пике экспоненциальной фазы.

Подкожный ксенографт *mel Ras*

Оценка прививаемости КЛ *mel Ras* после п/к имплантации показала, что оптимальной является прививочная доза $1,0 \times 10^7$ клеток на мышь, приводящая к 100 % выходу пальпируемых опухолевых узлов «нулевого» пассажа *in vivo* через 11 дней латентной фазы после имплантации. Стабильный рост получен после 4-го пассажа *in vivo*, при этом латентная фаза сократилась до 7 дней с достижением $V_{cp} = 40,0 \pm 19,0$ мм³, что почти в 3 раза больше объема опухоли «нулевого» пассажа *in vivo*. Вплоть до 9-го пассажа сохранялась устойчивая динамика роста опухоли с близкими временными характеристиками и к 19-му дню объем опухолевого узла составил: $V_{cp} = 1353,7 \pm 543,0$ мм³.

Гистологическая картина п/к ксенографта *mel Ras* на этот срок была идентичной КЛ. Как видно на рис. 5, п/к ксенографт состоит из полиморфных клеток округлой, овальной, веретенообразной формы с крупными ядрами, содержащими ядрышки. Цитоплазма опухолевых клеток обычно темноокрашенная, но в отдельных местах – светлая. Пигмент в опухолевых клетках не обнаружен. В опухолевом узле клетки образуют солидные поля и местами формируют тяжи различного размера, ячейки, альвеолярно-подобные структуры, разделенные тонкими соединительно-тканными прослойками на отдельные дольки. В так называемых горячих точках встречается до 7 митозов в поле зрения, участки некрозов в опухоли единичные и мелкие. По периферии опухолевого узла располагаются жировая и мышечная ткань, в которую он прорастает.

При гистологической верификации крупного опухолевого узла диаметром 0,8–1,0 см выявлено преимущественно альвеолярно-дольчатое строение узла с участками солидного типа. Оценка чувствительности п/к ксенографтов *mel Ras/NRAS⁺* к таргетному препарату Траметинибу показала полную ремиссию

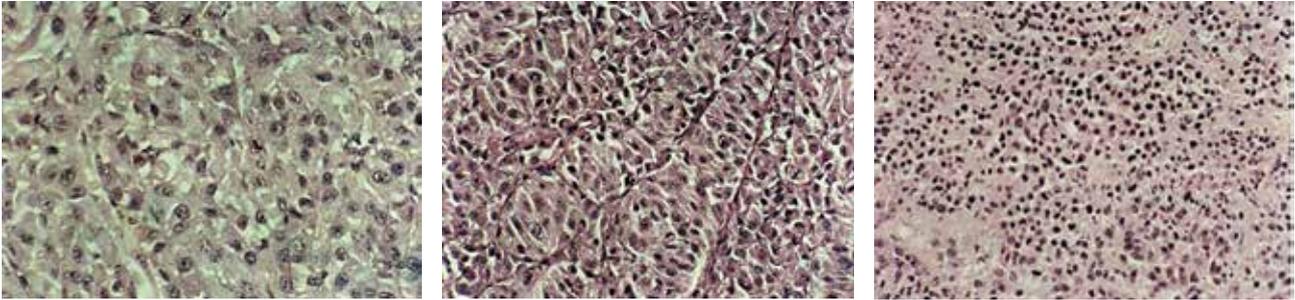


Рис. 5. Гистологические срезы п/к ксенографта МК человека *mel Rac* 9-го пассажа *in vivo* на 19-е сутки роста. Окраска гематоксилином, $\times 100$

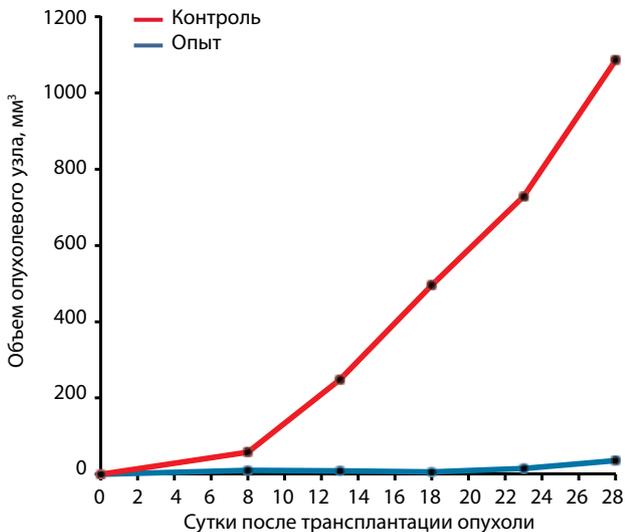


Рис. 6. Полная ремиссия п/к ксенографтов МК человека *mel Rac* 9-го пассажа с мутацией *NRAS* после 14-дневного воздействия Траметинибом в разовой дозе 0,3 мг/кг

роста опухоли у всех мышей в течение 28 дней после лечения, вплоть до гибели контрольной группы без лечения (рис. 6) [19].

Таким образом, *in vivo* показана высокая эффективность Траметиниба. Чувствительность КЛ как модели *in vitro* с определением величины IC_{50} не оценивали. Однако для клеток с аналогичными мишенями она составляет 0,92 нМ/1,8 нМ [22, 23].

Экспериментальные данные позволяют рассматривать комбинацию КЛ и п/к ксенографта *mel Rac/NRAS⁺* в качестве тест-системы для оценки чувствительности *in vitro/in vivo* к Траметинибу и для поиска новых эффективных агентов, направленных на Q61R *NRAS*.

Клеточные линии меланомы кожи *mel Ibr* как источник субклонов

Стабильно перевиваемая КЛ человека *mel Ibr* получена из фрагмента метастатического узла пациентки с диссеминированной МК [16].

Клетки *mel Ibr*, культивируемые с добавлением в среду 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, формировали адгезионный монослой. Они имели

преимущественно округлую эпителиоидную форму с признаками низкой дифференцировки, полиморфные ядра и цитоплазму, содержащую множество мелких светло окрашенных вакуолей (рис. 7). Около 1 % клеток в монослое имели веретеновидную форму. При культивировании в в чашках $D = 60$ мм и в среде с 5 % сывороткой при редком посеве клеток (около 200 клеток на чашку), выросшие колонии включали 3 морфологических типа клеток: эпителиоподобные, веретеновидные и смешанного типа [28].

В клетках *mel Ibr* и производных субклонах выявлена мутация V600E *BRAF*. Имплантационные характеристики КЛ *mel Ibr/BRAF⁺* были недостаточными из-за неполной прививаемости $1,0 \times 10^7$ клеток («нулевой» пассаж *in vivo*) с длительным развитием относительно небольшого п/к узла: латентная фаза составила 12 дней, на 20-е сутки роста $V_{cp} = 120$ мм³. Благодаря полиморфизму клеток в КЛ *mel Ibr/BRAF⁺* удалось получить 2 разных субклона, способных к адаптации *in vivo*.

Субклон *mel Ibr EE*

Субклон МК *mel Ibr EE* получен из стабильно перевиваемой родительской КЛ *mel Ibr* [16]. Клетки родоначальной линии культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 5–10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин и гентамицин при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 . Клетки 23 раза пересекали в ростовой среде с 5 % сывороткой и 13-кратно — в среде с 10 % сывороткой [16]. В отличие от округлых эпителиоидных клеток родительской линии, клетки субклона *mel Ibr EE* имеют признаки эпителиально-мезенхимального перехода, что требует дальнейшего изучения. Такие клетки имеют веретеновидную форму с резким изменением уровней экспрессии E-кадгерина и виментина в зависимости от обогащения питательной среды. В частности, при культивировании клеток в среде с добавлением 5 % сыворотки базальный уровень экспрессии E-кадгерина составил 0,56 оптических единиц (о. е.) против 2,02 о. е., а уровень виментина — 1,77 о. е. против 1,61 о. е. В среде с 10 % сывороткой уровни экспрессии указанных маркеров в клетках этого субклона были существенно выше,

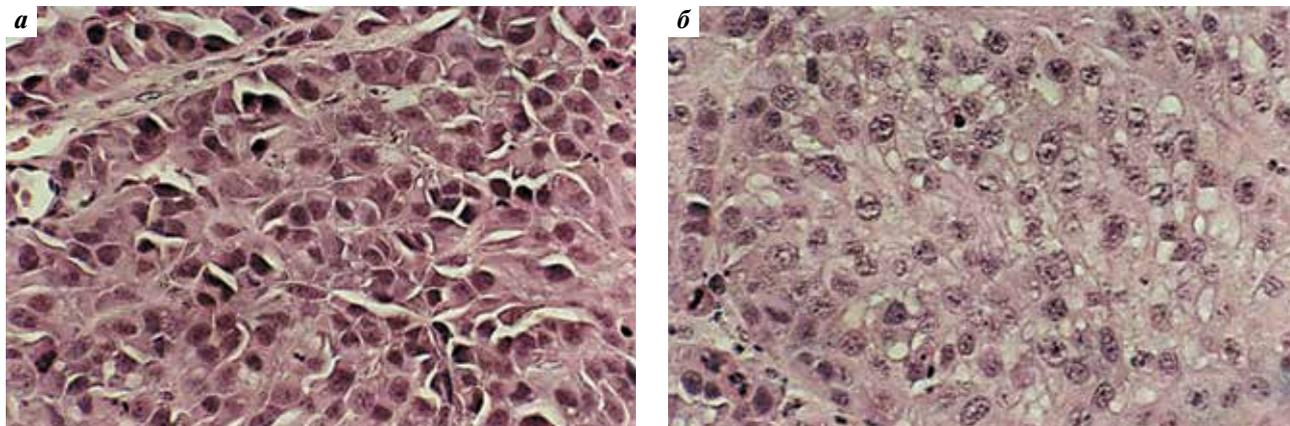


Рис. 7. Морфология клеток *mel Ibr*: а – крупные полиморфные опухолевые клетки с темной цитоплазмой и гиперхромными ядрами, видны единичные митозы; б – часть опухолевых клеток со светлой цитоплазмой и крупными ядрами округло-овальной формы, содержащими глыбки хроматина. Окраска гематоксилином, $\times 200$

а уровень виментина превышал уровень Е-кадгерина: 9,52 о. е. против 3,84 о. е. для Е-кадгерина [28].

Иммунологический фенотип клеток субклона *mel Ibr EE* оказался беднее, чем в исходной линии. В субклоне не выявлено заметной экспрессии CD90 – маркера ранних гемопоэтических клеток-предшественников, не связанного с опухолевой прогрессией, а также CD95 – активатора CD95/Fas-сигнального пути апоптоза и CD271. Отсутствие двух первых маркеров указывает на возможное приобретение клетками субклона свойств стволовых клеток. Низкий уровень CD271 в исходной линии не обнаруживался в субклоне. Роль антигена CD271 в прогрессии меланомы CD271 остается спорной [29].

Подкожная имплантация субклона *mel Ibr EE*

В отличие от исходной линии, при имплантации $3,0 \times 10^6$ клеток/мышь субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* прививка состоялась у всех 3 реципиентов (100 % прививочная доза клеток). Измеряемые п/к опухолевые узлы субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* «нулевого» пассажа *in vivo* при коротком латентном периоде – 5 дней – с устойчивым экспоненциальным ростом увеличились более чем в 20 раз. За 72 ч в п/к опухолевом узле субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* число клеточных делений по сравнению с исходной линией *mel Ibr* составило 3 против 6. Это свидетельствует о пригодности субклона для получения солидной опухоли у мышей Balb/c nude из культуры клеток уже на «нулевом» пассаже *in vivo*. Полученная модель КЛ *mel Ibr EE/BRAF⁺* адекватна *in vitro* для оценки антипролиферативной активности и эффективности многократной таргетной или цитостатической терапии *in vivo*, направленной на клетки с мутацией BRAF V600E [29].

Субклон *mel Ibr 5C*

Субклон клеток меланомы *mel Ibr 5C* получен в результате культивирования КЛ *mel Ibr* в ростовой

среде со сниженным до 5 % содержанием эмбриональной телячьей сыворотки по описанному выше протоколу. Для получения субклона под микроскопом были отобраны колонии, состоящие только из клеток веретеновидной формы. После 30-го и более пассажей клетки оставались мономорфными и сохраняли свой иммунологический фенотип.

По морфологическим характеристикам клетки субклона *mel Ibr 5C* близки к субклону *mel Ibr EE* и отличаются от родительских клеток значительно меньшим размером, крупными ядрами, занимающими практически весь объем цитоплазмы, длинными вытянутыми отростками и интенсивной пролиферацией [29, 30]. Эти клетки растут в виде плотного монослоя и формируют на его поверхности выпуклые образования в виде сфероидов. Клетки субклона *mel Ibr 5C* отличаются веретеновидной формой, в процессе роста образуют колонии сфероидного типа с резким уменьшением уровней экспрессии HLA-DR⁺, CD54⁺ и значительным повышением уровня CD63⁺, а также экспрессией в некоторых клетках маркера CD133⁺, характерного для стволовых клеток. Иммунологический фенотип и маркеры стволовых опухолевых клеток субклона и родоначальной КЛ различаются в отношении уровней экспрессии антигенных маркеров аналогично субклону *mel Ibr EE*. В клетках субклона уменьшились уровни HLA-DR⁺, CD95⁺ и CD54⁺. Вместе с тем, на фоне отрицательного Oct-4A выявлено 24,9 % клеток, экспрессирующих CD133⁺. Экспрессия антигена CD63 в клетках субклона повысилась, а экспрессия антигенов гистосовместимости I класса: HLA-ABC, CD24, CD34, CD44, CD117 и CD105 не изменилась (табл. 2) [29, 30].

Цитогенетический анализ показал, что кариотип клеток субклона *mel Ibr 5K* и родоначальной КЛ различен [24, 29, 30].

Суммарный кариотип клеток субклона *mel Ibr 5K* и исходной КЛ *mel Ibr*:

Таблица 2. Различия иммунологических фенотипов КЛ *mel Ibr* и субклона *mel Ibr 5C*

Антиген*	Клеточная линия (48-й пассаж)	Субклон (30-й пассаж)
HLA-DR	87,9	18,6
CD133	1,6	24,9
CD63	0,9	92,4
CD54	93,1	24,9
CD 95	21,5	2,8

*Нет отличий в маркерах HLA-A, B, C; CD24; CD34; CD44; CD117; CD105 и Oct-4A.

- субклон *mel Ibr 5K-92-100<4n+>,XXX,-X,del(6)(p21),?der(6)del(6)(12)dup(6)(q?q?),der(9)t(1;9)(q12;p21),inc;*
- КЛ *mel Ibr-71-87<4n->,XX,add(X)(q28),del(1)(q12),+7,+7,+7,i(21)(q10),inc.*

При анализе 25 метафаз установлено, что число хромосом в клетках колеблется от 92 до 100, модальное число соответствует гипертетраплоидному набору (4n+). Обнаружены следующие структурные перестройки: дериватная хромосома 9, образованная в результате транслокации хромосом 1 и 9; делеция короткого плеча хромосомы 6 (p21-pter), как следствие возможной терминальной делеции короткого плеча (p12-pter) – дериватная хромосома 6 с дубликацией фрагмента ее длинного плеча. Перестройка, затрагивающая локус p21 хромосомы 9, в котором расположен ген-супрессор опухоли CDKN2A (p16), кодирующий белок-регулятор клеточного цикла и старения клеток, характерна для многих злокачественных новообразований.

В клетках исходной КЛ (анализ 15 метафаз) число хромосом колеблется от 71 до 87, модальное число соответствует гипертетраплоидному набору (4n). В популяции клеток повышена копияность хромосомы 7. Кариотип не соответствует стандартному набору также и по их структуре. Во всех клетках выявлены дополнительные хромосомные фрагменты неизвестного происхождения, транслоцированные на длинное плечо X-хромосомы. Обнаружены 2 различные по морфологии хромосомы 1: с делецией практически всего короткого плеча (p21-pter) и с делецией – (q12-qter). Также выявлена изохромосома, образованная при слиянии длинных плеч хромосомы 21. Копийность хромосомы 7 увеличена, что характерно для клеток меланомы. На коротком плече хромосомы 7 в районе 7p12.3-p12.1 локализован ген рецептора эпидермального фактора роста, гиперэкспрессия которого индуцирует и усиливает клеточную пролиферацию и прогрессию опухоли.

Полученные данные указывают на ряд особенностей субклонов *mel Ibr*, возникших при селекции клеток, в частности веретенновидную морфологию, утрату антигенов гистосовместимости II класса, появление антигена стволовых клеток CD133 без экспрессии Oct-4A. Такие клетки с высокой пролиферативной активностью имеют преимущество по сравнению с клетками исходной родительской линии и при наличии локомоторных свойств могут формировать метастазы *in vivo*.

Подкожный ксенографт субклона *mel Ibr 5C*

Субклон МК человека *mel Ibr 5C* получен из соответствующей КЛ по описанной выше схеме. Показано, что оптимальная прививочная доза клеток, обеспечивающая 100 % прививаемость «нулевого» пассажа *in vivo* составляет $6,0 \times 10^6$ клеток, через 10 сут латентного периода выявляются пальпируемые опухоли. Стабильная кинетика роста опухолей достигнута к 4-му пассажу *in vivo*. Латентная фаза сократилась до 7 дней, а объем опухолевого узла составил $V_{cp} = 64,0 \pm 15,0$ мм³, т. е. почти в 1,6 раза превысил размеры узла при первом пассаже *in vivo*. На 14-е сутки $V_{cp} = 380,0 \pm 132,0$ мм³, $V_t/V_{t-1} = 5,9$. На 14, 17, 21-е сутки кинетика роста опухоли соответствовала стационарной фазе с колебаниями $V_t/V_{t-1} = 1,9-2,1-1,8$. На 21-е сутки $V_{cp} = 956,0 \pm 237,0$ мм³, что в 10 раз превысило размеры опухолевого узла при первом пассаже. Устойчивая кинетика роста опухоли сохранялась до 9-го пассажа с одинаковыми временными характеристиками: латентной фазой до 8 дней ($V_{cp} = 17,0 \pm 44,0$ мм³), экспоненциальной фазой роста до 14 дней ($V_{cp} = 517,0 \pm 184,0$ мм³) и стационарной фазой роста до 19-го дня после трансплантации ($V_{cp} = 1254,0 \pm 415,0$ мм³). Отсутствие значимых различий кривых роста опухоли двух пассажей в полулогарифмической системе координат подтверждает устойчивость кинетических характеристик роста п/к ксенографтов МК человека *mel Ibr 5C* у мышей Balb/c nude.

При гистологическом исследовании срезов опухоли 9-го пассажа, окрашенных гематоксилином и эозином, она верифицирована как беспигментная МК, цитологически идентичная субклону КЛ *mel Ibr 5C*. Патоморфологические признаки п/к опухоли идентичны таковым в исходной культуре клеток (рис. 7).

Данные экспериментальных исследований позволяют считать комбинацию субклонов *mel Ibr EE/BRAF⁺* и *mel Ibr 5C/BRAF⁺* адекватной тест-системой *in vitro/in vivo* для поиска новых таргетных средств и терапии амеланотической МК человека.

Заключение

Аналитический обзор статей и патентов за 2000–2017 гг., посвященных полученным в НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина КЛ, их субклонам и п/к

ксенографтам МК человека, позволяет считать эти модели, охарактеризованные по основным биологическим параметрам, адекватными тест-системами для решения фундаментальных и прикладных задач онкологии. Предложенная мини-коллекция

позволяет изучать механизмы прогрессии опухолей, выявить прогностические факторы и способствует разработке новых молекулярно-направленных препаратов и подходов к комбинированной терапии МК человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Демидов Л.В., Утяшев И.А., Харкевич Г.Ю. Подходы к диагностике и терапии меланомы кожи: эра персонализированной медицины. *Дерматология. Consilium medicum (приложение)* 2013;2–3:42–7. [Demidov L.V., Utyashev I.A., Kharkevich G.Y. Approaches to the diagnosis and therapy of melanoma: the era of personalized medicine. *Dermatology. Consilium medicum (Annex)* 2013;2–3:42–7. (In Russ.)].
2. Inman S. GSK drug combination approved for advanced melanoma. *Am J Manag Care* 2014;20(2 Spec No.): E10. PMID: 25764581.
3. Jaiswal B.S., Janakiraman V., Kljavin N.M. et al. Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One* 2009;4(5):e5717. PMID: 19492075. DOI: 10.1371/journal.pone.0005717.
4. Colombino M., Capone M., Lissia A. et al. BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 2012;30(20):2522–9. PMID: 22614978. DOI: 10.1371/journal.pone.0005717.
5. Ascierto P.A., Schadendorf D., Berking C. et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. *Lancet Oncol* 2013;14(3):249–56. PMID 23414587. DOI: 10.1016/S1470-2045(13)70024-X.
6. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54. PMID 12068308. DOI: 10.1038/nature00766. PMID: 12068308.
7. Tsai J., Lee J.T., Wang W. et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3041–46. PMID 18287029. DOI: 10.1073/pnas.0711741105.
8. Bollag G., Hirth P., TSA J. et al. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 2010;467:596–9. PMID 20823850. DOI: 10.1038/nature09454.
9. Flaherty K.T., Puzanov I., Kim K.B. et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:809–19. PMID 20818844. DOI: 10.1056/NEJMoa1002011.
10. Joseph E.W., Pratilas C.A., Poulikakos P.I. et al. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:14903–8. PMID: 20668238. DOI: 10.1073/pnas.1008990107.
11. Ribas A., Kim K.B., Schuchter L.M. et al. BRIM-2: an open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAFV600E mutation-positive melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(15): 8509. DOI: 10.1200/jco.2011.29.15_suppl.8509.
12. Graeme J., Walker G.J., Soyer H.P. et al. Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011;24:1158–76. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00923.x.
13. Михайлова И.М., Давыдов М.М. Клеточные линии меланомы человека. СПб.: Научное издание, 2017. 190 с. [Mikhailova I.M., Davydov M.M. Cell lines of human melanoma. SPb.: High technology, 2017. 190 p. (In Russ.)].
14. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. М.: Практическая медицина, 2009. 299 с. [Treshalina E.M. Collection of tumor strains of human. M.: Practical medicine; 2009. 299 p. (In Russ.)].
15. Андронов Н.В., Трещалина Е.М., Черемущкин Е.А. и др. Патент РФ № 2572569, 2015. Способ получения подкожных ксенографтов клеточной линии меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. [Andronova N.V., Treshalina E.M., Cheremushkin E.A. et al. The patent of the Russian Federation № 2572569, 2015. A method of producing a subcutaneous xenograft cell line melanoma human skin mel Cher with a mutation of BRAF v600e was for preclinical studies of targeted anticancer agents. (In Russ.)].
16. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф. и др. Патент РФ № 2287576, 2006. Клеточная линия меланомы человека mel Ibr, используемая для получения противоопухолевых вакцин. [Mikhailova I.N., Baryshnikov A.Yu., Morozova L.F. et al. The patent of the Russian Federation № 2287576, 2006. Cell line of human melanoma mel Ibr used for receiving antitumor vaccines. (In Russ.)].
17. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. Патент РФ № 2402602, 2009. Клеточная линия меланомы человека mel Rac, используемая для получения противоопухолевых вакцин. [Mikhailova I.N., Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V. et al. The patent of the Russian Federation № 2402602, 2009. Cell line of human melanoma mel Rac, used for receiving antitumor vaccines. (In Russ.)].
18. Андронов Н.В., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н. и др. Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF на иммунодефицитных мышцах для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):65–71. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-65-71. [Andronova N.V., Morozova L.F., Mikhaylova I.N. et al. Modeling of a subcutaneous xenograft of human skin melanoma mel Cher with V600E BRAF mutation in immunodeficient mice for preclinical study the targeting anticancer drugs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal* 2016;15(4):65–71. (In Russ.)].
19. Андронов Н.В., Ситдикова С.М., Морозова Л.Ф. и др. Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Rac с мутацией NRAS на иммунодефицитных мышцах для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):40–6.

- DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-40-46. [Andronova N.V., Sitdikova S.M., Morozova L.F. et al. Modeling of a subcutaneous xenograft of human melanoma skin mel Rac with NRAS mutation on immunodeficient mice for preclinical studying the targeting anticancer drugs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapevticheskiy zhurnal* 2016;15(2):40–6. (In Russ.)].
20. Trametinib(GSK1120212), Catalog No. S2673, Synonyms: JTP-74057. <http://www.selleckchem.com/products/gsk1120212-jtp-74057.html>; <https://focusbio.com.au/products/trametinib/>
21. Yamaguchi T., Kakefuda R., Tajima N. et al. Antitumor activities of JTP-74057(GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 2011;39(1):23–31. PMID: 2152331. DOI: 10.3892/ijo.2011.1015.
22. Андропова Н.В., Морозова Л.Ф., Сураева Н.М. и др. Способность клеток беспигментной меланомы кожи человека линии mel Ibr/BRAF+ и ее субклона к росту у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при подкожной имплантации. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;18(2):60–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-60-65. [Andronova N.V., Morozova L.F., Suraeva N.M. et al. Ability to the growth into immunodeficient Balb/c nude mice after subcutaneous implantation of human amelanotic melanoma skin cell line mel Ibr/BRAF+ and its subclone. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapevticheskiy zhurnal* 2017;18(2):60–5. (In Russ.)].
23. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):6–13. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13. [Treshalina E.M. Immunodeficient mice Balb/c nude and modeling of various types of tumor growth for preclinical studies. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapevticheskiy zhurnal* 2017;16(3):6–13. (In Russ.)].
24. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. Патент РФ № 2364624, 2009. Клеточная линия меланомы человека mel Cher, используемая для получения противоопухолевых вакцин. [Mikhailova I.N., Baryshnikov A.Yu., Demidov L.V. et al. The patent of the Russian Federation № 2364624, 2009. Cell line human melanoma mel SEG used for receiving antitumor vaccines. (In Russ.)].
25. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал. Лабораторные и экспериментальные исследования* 2010;37(1):29–39. [Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Burova O.S. et al. Expression of Cancer Testis Antigens in Human Melanoma Cells. *Siberskii onkologicheskii jurnal. Laboratornie i experimentalnie isledovaniia = Siberian Journal of Oncology. Laboratory and experimental studies* 2010;37(1):29–39. (In Russ.)].
26. 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. [Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Barishnikov A.Yu. et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. *Vestnik RAMN = Bulletin of RAMS* 2005;7:37–40 (In Russ.)].
27. Бурова О.А. Получение и характеристика клеточных линий меланомы человека для создания противоопухолевых вакцин. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2010. [Burova O.A. Preparation and characteristics of human melanoma cell lines for the creation of anticancer vaccines. Dis. ... kand. med. sciences. Moscow, 2010. (In Russ.)].
28. Морозова Л.Ф., Сураева Н.М., Бурова О.С. и др. Изменение морфологических, иммунологических и цитогенетических характеристик клеток меланомной линии mel Ibr при культивировании в ростовой среде с низкой концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):19–21. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-90-94. [Morozova L.F., Suraeva N.M., Burova O.S. et al. Changes in the morphological and immunological, immunological and genetic characteristics of mel IBR melanoma cells in response to low concentration of embryo calf serum. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian bioterapevticheskiy zhurnal* 2016;15(2):19–21. (In Russ.)].
29. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самоилов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии(mel Ibr) в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(4):521–24. DOI: 10.1007/s10517-017-3778-y. [Suraeva N.M., Morozova L.F., Burova O.S. et al. Changes in the Morphological and Immunological Characteristics of Mel Ibr Melanoma Cells in Response to Chicken Embryo Extract. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015;159(4):521–24. (In Russ.)].
30. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Рябая О.О. и др. Особенности характеристик клеток субклона меланомной линии(mel Ibr) после воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2017;163(2):221–6. DOI: 10.1007/s10517-015-3007-05. [Suraeva N.M., Morozova L.F., Rabaia O.O. et al. Characteristics of melanoma line subclone cells(mel Ibr) after exposure to chicken embryonic extract. *Byulleten' ehksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2017;163(2):221–6. (In Russ.)].

ORCID авторов/ ORCID of authors

Е.М. Трещалина/E.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

АДЬЮВАНТЫ В ВАКЦИНОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

М.А. Барышникова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_b@mail.ru

Адьюванты — важные составляющие противоопухолевых вакцин, поскольку они усиливают иммунные ответы на вакцинацию. Однако разрешенные к применению адьюванты, например соли алюминия, недостаточно эффективно стимулируют иммунный ответ. Поиск и изучение свойств новых адьювантов, часто сочетающих в себе функции стимуляторов иммунитета с доставкой антигена к иммунным клеткам, на сегодняшний день являются актуальными задачами иммунотерапии. Клинические испытания иммуностимулирующих веществ, в частности лигандов Толл-лайк рецепторов (TLR), выявили их терапевтический потенциал не только как противоопухолевых агентов, но и как адьювантов к вакцинам.

Ключевые слова: вакцинация, неоантигены, адьюванты, лиганды TLR

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-44

CANCER VACCINE ADJUVANTS

M.A. Baryshnikova, V.S. Kosorukov

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

Adjuvants are important components of cancer vaccines because they enhance immune responses to vaccination. However, adjuvants licensed for clinical use, e. g. aluminum salts, fail to stimulate an effective immune response. Research and development of new adjuvants with combined functions, including immune stimulation and antigen delivery, are a vital task for antitumor immunotherapy. Clinical trials of immune stimulating compounds, in particular Toll-like receptor (TLR) ligands, reveal their therapeutic potential as both antitumor agents and vaccine adjuvants.

Key words: cancer vaccine therapy, neoantigens, adjuvants, TLR ligands

Введение

Несмотря на интенсивные исследования рака и развитие новых эффективных методов терапии, онкологические заболевания остаются одной из главных проблем здравоохранения, поражая миллионы людей во всем мире, что подтверждает необходимость разработки новых подходов к противоопухолевой терапии. Среди развивающихся терапевтических стратегий передовым подходом к лечению является иммунотерапия рака, которая использует собственные иммунные клетки организма для борьбы с опухолью.

Одним из ключевых признаков рака является его способность к ускользанию от иммунной системы [1], и главная цель иммунотерапии рака — преодоление иммуносупрессии в опухолевом микроокружении, чтобы иммунные клетки могли эффективно удалять опухоль, не вызывая при этом непереносимых побочных эффектов.

Первые успешные попытки иммунотерапии опухолей были сделаны врачом Вильямом Коли, который в 1891 г. установил взаимосвязь между перенесенной инфекцией (скарлатина, рожа) и регрессией

опухоли у пациентов и начал вводить в неоперабельные саркомы инактивированные бактерии (*Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*), так называемый токсин Коли [2]. Через многие годы обнаружили, что противоопухолевый эффект токсина Коли обеспечивался стимуляцией паттернраспознающих рецепторов (PRPs), к которым относятся и TLR (toll-like receptors) [3].

Сегодня для иммунотерапии опухолей используют различные средства, включая цитокины (например, ГМ-КСФ и интерлейкин 2), онколитические вирусы, адоптивный клеточный перенос (например, адоптивная Т-клеточная терапия), ингибиторы контрольных точек иммунной системы (например, CTLA-4, PD-1), и терапевтические противоопухолевые вакцины (дендритноклеточные, ДНК- или РНК-вакцины, пептидные вакцины) [4].

Генетически нестабильные опухоли с большим числом мутаций содержат опухолеспецифичные неоантигены, способные индуцировать противоопухолевый иммунный ответ. Вакцины, усиливающие иммунное распознавание опухолевых неоантигенов, сегодня представляются многообещающим альтернативным

подходом к лечению злокачественных новообразований и могут стать важной частью комбинированной терапии, включающей также лучевую терапию, химиотерапию и хирургию [5]. Ряд таких противоопухолевых вакцин проходят клинические испытания [6–8].

Исследования последних десятилетий показали, что большинство противоопухолевых вакцин сами по себе слабо иммуногенны и требуют применения адъювантов, повышающих эффективность антигенспецифических иммунных ответов [9]. Анализ результатов исследований противоопухолевой вакцинотерапии с использованием разных типов вакцин, выполненный в 2004 г. S.A. Rosenberg и соавт. [10], показал, что клиническая эффективность вакцинотерапии была чрезвычайно низкой, это могло быть связано с выбором неиммуногенных антигенов или отсутствием сильных адъювантов, способных преодолеть иммуносупрессию у больных раком. Таким образом, мощные адъюванты являются ключевым компонентом противоопухолевых вакцин, так как преодолевают иммунотолерантность опухолевого микроокружения, приводя к генерации выраженных противоопухолевых иммунных ответов.

Адъюванты – вещества, которые усиливают иммунную реакцию на чужеродные антигены или собственные опухолеассоциированные антигены [11]. Термин адъювант происходит от латинского слова «*adjuvare*», означающего «помогающий» или «способствующий». Классическими считаются адъюванты бактериального происхождения – бациллы Кальметта–Герена (БЦЖ) и *Corynebacterium parvum*, компоненты клеточной стенки микроорганизмов (липид А, эндотоксин, мурамил-дипептид, димеколат трегалозы), иммуногенные белки (гемоцианин лимфы улитки), химически синтезированные соединения (DETOX), цитокины (интерлейкины 1, 2, фактор некроза опухоли, интерферон (ИФН), колониестимулирующий фактор) и некоторые другие. Эти вещества в качестве адъювантов стимулируют активную неспецифическую иммунную реакцию, как гуморальную, так и клеточную, и таким образом помогают вакцинам улучшать антигенспецифические иммунные ответы [11]. Помимо этого, к адъювантам относят и вещества, образующие в месте введения вакцины депо с медленно высвобождающимся антигеном, и системы доставки, которые могут эффективно доставлять антиген к антигенпрезентирующим клеткам и тем самым обеспечивать развитие антигенспецифических иммунных ответов.

Поиск и изучение свойств новых адъювантов, часто сочетающих в себе функции стимуляторов иммунитета с доставкой антигена к иммунным клеткам, на сегодняшний день являются актуальными задачами в области иммунотерапии. Требования

к перспективным адъювантам включают безопасность, эффективность и экономическую целесообразность [12].

Адъюванты как системы доставки антигена

К традиционным адъювантам, функционирующим в качестве системы доставки антигенов, относят масляные эмульсии, минеральные соли, липосомы. В ряде исследований показано, что некоторые системы доставки обладают также иммуногенными свойствами.

Алюминий и его производные используются в качестве адъювантов уже более 80 лет. Среди ограниченного количества традиционных адъювантов, разрешенных к применению, они применяются наиболее часто, в частности в противомикробных вакцинах от дифтерии, коклюша и столбняка, от папилломавируса человека, гриппа типа В и вируса гепатита А. Известно, что производные алюминия очень эффективны в обеспечении гуморальных иммунных ответов, но не индуцируют клеточно-опосредованный иммунитет, который является ключевым в удалении опухоли [13]. Несмотря на это, продолжаются исследования производных алюминия в качестве адъювантов противоопухолевых вакцин. Например, в работе S. Alfonso и соавт. описаны результаты клинического испытания противоопухолевой терапевтической вакцины с алюминием, направленной на опухолеассоциированный ганглиозид NeuGcGM3, у больных немелкоклеточным раком легкого [14]. Традиционно предполагалось, что адъювантные свойства солей алюминия реализуются за счет формирования депо в месте инъекции, из которого постепенно высвобождается антиген, что обеспечивает пролонгированное взаимодействие антигена с клетками иммунной системы. Однако S. Hutchison и соавт. показали, что это не так, алюминий не влиял на величину и последовательность иммунных ответов на антиген [15]. T. Marichal и соавт. обнаружили, что в результате клеточной гибели, индуцированной алюминием или его солями, высвобождается ДНК, которая выступает в качестве DAMP (молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением/опасностью) и запускает врожденные иммунные ответы [16].

В последние годы значительно возрос интерес к липосомосодержащим вакцинам. Липосомы – синтетические фосфолипидные везикулы и их производные наночастицы, такие как археосомы и вирусомы, активно используются в вакцинотерапии в качестве систем доставки [17].

Способность липосом индуцировать иммунные ответы к включенным в них антигенам была впервые описана G. Gregoriadis и A. Allison в 1970-е годы [18, 19]. К достоинствам липосом относятся их универсальность,

биосовместимость и биоразлагаемость [20]. Ключевым преимуществом липосомальных систем доставки вакцин является их разнообразие и пластичность. Состав и способы приготовления липосом можно варьировать в зависимости от желаемых свойств, которые зависят от выбора липида, заряда, размера, распределения размера, загрузки и расположения антигенов или дополнительных адъювантов [17]. Водорастворимые антигены (белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, гаптены) можно включать во внутреннее гидрофильное пространство липосом, тогда как липофильные компоненты (липопептиды, антигены, адъюванты, линкерные молекулы) интеркалируют в липидный бислой; также антигены или адъюванты могут быть присоединены к поверхности липосом [21, 22].

К липосомальным системам, проходящим доклинические и клинические испытания или одобренным для использования в качестве адъювантов в ряде противомикробных вакцин, относятся вирусомы, содержащие фосфолипиды и белки оболочки вируса гриппа; липосомы, содержащие натуральные и синтетические нейтральные или анионные фосфолипиды, холестерол, натуральный или синтетический монофосфорил липид А и QS21 сапотин; нефосфолипидные катионные липосомы, комбинации и смеси липосом с иммуностимулирующими комплексами [23].

В исследованиях на животных показана более высокая противоопухолевая эффективность липосомальных вакцин по сравнению с нелипосомальными. Например, на мышинной модели нейробластомы липосомальная доставка CpG ODNs (цитозин-гуанин динуклеотид олигодеоксинуклеотидов) в опухоль привела к выраженному противоопухолевому эффекту [24]. Липосомальные вакцины, содержащие основной фактор роста фибробластов и монофосфорил липид А, индуцировали противоопухолевый иммунитет, вызывали продукцию опухолеспецифичных антител и иммунные ответы Th1-типа у мышей с карциномой легкого Льюиса [25]. Липосомальная доставка липидного антигена α -галактозилцерамида обеспечивала противоопухолевые иммунные ответы, предотвращающие метастазы в легкие у 65 % мышей с меланомой B16F10 [26]. Клинические исследования, в которых липосомы использовали для доставки опухоли-специфичного антигена, показали, что липосомальные вакцины потенциально безопасны и способны индуцировать длительные антиген-специфичные CD4+ и CD8+ Т-клеточные ответы у пациентов с фолликулярной лимфомой [27].

Ряд публикаций посвящен исследованию в качестве адъювантов противоопухолевых вакцин вирусом, сферических вирусных частиц без генетического материала вируса и нуклеокапсида, неспособных

к репликации и инфицированию, но сохраняющих способность родительского вирусного штамма к проникновению в клетки [28, 29]. Впервые вирусомы были созданы в 1975 г. J.D. Almeida и соавт. из липосом и частиц вируса гриппа [30]. Помимо того, что вирусомы способствуют адресной доставке антигена, они могут стимулировать иммунную систему, в частности, вакцинация комплексом из ДНК плазмиды и катионных вирусом индуцировала активацию цитотоксических Т-лимфоцитов [31]. В настоящее время вирусомы на основе ряда вирусов (вируса гриппа, гепатита В, иммунодефицита, болезни Ньюкасла и вируса Сендай) изучают в качестве векторов для доставки лекарств, в том числе различных терапевтических молекул, таких как ДНК, РНК и пептиды [29].

На основе липидов созданы и другие адъюванты. Например, в работе X. Yang и соавт. описан новый иммунный адъювант мицеллы M-COSA, созданный для направленной доставки в цитозоль дендритных клеток (ДК) антигена овалбумина и плазмиды ДНК, кодирующей CCR7, (CCR7 DNA), обеспечивая миграцию ДК в лимфатические узлы для усиления презентации антигена МНС-I. M-COSA показали более высокую эффективность в сравнении с немиецеллярной формой. M-COSA увеличил экспрессию костимуляторных молекул и секрецию цитокинов, приводя к активации и созреванию ДК. Антигены и плазмидная ДНК, инкапсулированные в мицеллы, выходили из эндосом в цитоплазму и улучшали МНС-I презентацию антигена и увеличивали экспрессию CCR7. В результате вакцинации подавлялся рост опухоли и возрастало число CD8+ Т-клеток, которые положительно коррелировали с уменьшением опухоли [32].

F. Qiu и соавт. описали стратегию простой и быстрой упаковки пептидных антигенов в рН-чувствительные наночастицы с возможностью эндосомального высвобождения их содержимого для улучшения иммунного ответа на противоопухолевые персонализированные вакцины, направленные на индивидуальные опухолевые неоантигены [33]. Неоантигенные пептиды обычно вызывают слабые CD8+Т-клеточные ответы и нуждаются в адъювантах для увеличения иммуногенности. Вакцины, направленные на неоантигены, создаются с использованием химически синтезированных пептидных антигенов, присущих индивидуально каждому пациенту. F. Qiu и соавт. изучили электростатически стабильные полиплексные наночастицы (наноплексы), которые получали при смешивании декализинмодифицированных антигенных пептидов и полипропилакриловой кислоты (рРАА), полианиона с рН-зависимой мембрано-дестабилизирующей активностью. Эти наноплексы увеличивали и пролонгировали захват антигена и его презентацию МНС-I молекулами, экспрессируемыми

ДК, приводя к увеличению активации CD8⁺ Т-клеток. При интраназальном пути иммунизации наноплексные вакцины ингибировали формирование метастазов в легкие на модели мышинной меланомы B16. Кроме того, наноплексные вакцины синергичны с адьювантом α -галактозилкерамидом (α -GalCer) в стимуляции выраженных CD8⁺ Т-клеточных ответов, они значительно увеличивали время выживаемости мышей с развившейся меланомой [33]. Таким образом, пептид/pPAA наноплексы могут быть перспективны при разработке неоантигенных противоопухолевых вакцин.

Еще один вид адьювантов на основе липидов – иммуностимулирующие комплексы, состоящие из сапонинов растения *Quillaja saponaria*, холестерина и фосфолипида, которые имеют клеткоподобную структуру диаметром около 40 нм. Из-за удобной структуры они могут обеспечивать эффективную доставку антигена в клетки, приводя к индукции антигенспецифичного клеточного и длительного гуморального иммунного ответов [34]. Механизм действия иммуностимулирующих комплексов включает прямое взаимодействие с ДК для обеспечения кросс-презентации антигена, вызывая индукцию сильных антигенспецифичных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточных ответов. Иммуностимулирующие комплексы ISCOMATRIX использовали как адьюванты в клинических испытаниях противоопухолевых вакцин у пациентов с NY-ESO⁺-опухолями [35, 36]. В 2015 г. A. Silva и соавт. показали, что вакцины с иммуностимулирующим комплексом ISCOMATRIX в комбинации с агонистами TLR3 и TLR9 могут быть перспективной иммунотерапевтической противоопухолевой стратегией, поскольку такая комбинация приводила к снижению роста опухолей на мышинных моделях меланомы, карциномы поджелудочной железы и предстательной железы, причем для терапевтического эффекта было важно наличие в качестве адьюванта именно ISCOMATRIX [37].

Адьюванты-стимуляторы врожденного иммунитета

Исследования последних лет выявили необходимость активации врожденного иммунитета для развития противоопухолевого иммунного ответа [38]. Распознавание чужеродных антигенов, а также опухолеассоциированных антигенов, врожденной иммунной системой обеспечивается группой паттернраспознающих рецепторов (PRRs), экспрессирующихся в ДК и макрофагах. PRRs распознают чужеродные молекулы, такие как патогенассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs), и молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением/опасностью (DAMPs), высвобождающиеся при смерти клеток или клеточном стрессе. Это приводит к индукции воспалительного ответа с продукцией про-

воспалительных цитокинов, которая вызывает генерацию выраженного врожденного и приобретенного иммунных ответов против опухоли. Механизмы, с помощью которых сигнальные пути PRRs могут разрушить иммунотолерантность антигенпрезентирующих клеток к опухолеассоциированным антигенам, включают увеличение количества костимуляторных молекул, таких как CD80, CD86, CD40, и индукцию ИФН I-го типа [39].

PRRs разделяют на семейства согласно их структурной гомологии: TLRs (toll-like receptors), RLRs (retinoic acid-inducible gene I (RIG-1) – like receptors), NLRs (nucleotide-binding oligomerization domain (NOD) – like receptors) и CLRс (C-type lectin receptors). Семейство TLR – одно из самых больших и хорошо изученных с точки зрения известных лигандов, сигнальных путей и функциональной значимости [3]. Лиганды TLR приобрели большое значение в иммунотерапии опухолей как адьюванты вакцинотерапии и как самостоятельные лекарственные препараты.

В связи с тем, что PAMPs и DAMPs имеют высокую способность стимулировать клеточно-опосредованный иммунитет, они широко исследуются в качестве адьювантов для противоопухолевых вакцин. Например, агонист TLR4 – монофосфорил липид А, модифицированное производное липополисахарида, обеспечивает усиление иммунного ответа и является компонентом разрешенной к применению вакцины против рака шейки матки [40, 41].

Проведено много исследований агонистов TLR7/TLR8 в качестве адьювантов противоопухолевых вакцин. TLR7 распознает вирусную одноцепочечную РНК и производные имидазоквинолина, к которым относятся препараты ресиквимод и имиквимод.

Имиквимод разрешен к применению для антивирусной терапии генитальной кандиломы, а также для лечения предраковых повреждений кожи (актинического кератоза) [42]. Жидкая лекарственная форма на основе имиквинода – ТМХ-101 (Vesimune) – проходила в 2015 г. II фазу клинических испытаний для лечения неинвазивного рака мочевого пузыря [43]. Механизм действия имиквинода не до конца изучен, известно, что он вызывает индукцию ИФН I-го типа через активацию TLR7-MyD88-IRF7 сигнальных путей. При изучении комбинированного эффекта агониста TLR7 имиквинода и дендритноклеточной вакцины против мышинной меланомы S. Rep и соавт. обнаружили, что нанесение имиквинода в виде крема на кожу вызывает воспаление и увеличение поступления ДК в дренирующие лимфатические узлы. Имиквимод усиливал эффективность дендритноклеточной вакцины против B16-OVA меланомы. Сочетанное использование имиквинода и дендритноклеточной вакцины усиливало цитотоксичность лимфоцитов селезенки в отношении

опухолевых клеток и ингибировало продукцию CD4+FOXP+Трег-клеток. Экспрессия мРНК TLR7 была подтверждена в MC/9 тучных клетках и в ДК. Клетки MC/9, обработанные растворимой формой имиквимода R837, увеличивали экспрессию на ДК CD80, CD86, МНС-II и CCR7. Также R837 ингибировал рост клеток B16-OVA *in vitro*. Полученные в результате этой работы данные подтвердили, что имиквимод может быть использован как потенциальный адъювант для противоопухолевых дендритноклеточных вакцин [44]. D. Paßlick и соавт. выявили, что комбинация производного имидазоквинолина ресиквимода (R848) и мурамилдипептида (MDP) обладает дополняющим друг друга иммуностимулирующим эффектом [45]. Этой группой ученых были созданы нанокапсулы на основе сперминмодифицированных декстрановых наночастиц, содержащие антиген с комбинацией адъювантов. Данная нановакцина вызывала стимуляцию ДК и антигенспецифическую пролиферацию CD4+ и CD8+ Т-клеток.

В исследовании [46] показали, что агонист TLR7/8 ресиквимод (R848) значительно снижал рост клеток остроуго миелоидного лейкоза человека у иммунодефицитных мышей, вызывая активацию TLR8, которая приводила к дифференцировке и ингибированию роста клеток по сигнальному пути TLR8/MyD88/p38.

К. Chen и соавт. исследовали индукцию специфических Т-клеток у больных гепатоцеллюлярной карциномой при использовании нановакцины LPMan-GPC3/CL097 на основе маннозилированных липосом с глипиканом-3 (GPC3), одним из ключевых тканевых маркеров, который помогает отличать злокачественные и доброкачественные изменения печени у больных циррозом. В качестве адъюванта использовали агонист TLR7/8 CL097 [47]. Иммунизация LPMan-GPC3/CL097 вызывала образование GPC3-специфичных CD4+ ИФН γ - и CD8+ ИФН γ -продуцирующих Т-клеток в селезенке и печени, которые удаляли GPC3-экспрессирующие опухолевые клетки.

TLR9 – эндосомальный TLR, распознающий внутриклеточные молекулы ДНК микробного происхождения по наличию неметилированных повторов CpG. CpG ODN (олигодинуклеотид, содержащий неметилированные CpG повторы) – синтетический лиганд TLR9, способный активировать сигнальный путь TLR9-MyD88-IRF7, приводящий к индукции ИФН 1-го типа, и через активацию сигнального пути TLR9-MyD88-NF κ B индуцирующий продукцию провоспалительных цитокинов иммунными клетками [48].

Клинические испытания CpG ODN в качестве иммунотерапевтического агента у онкологических больных при меланоме или мелкоклеточном раке легкого подтвердили, что комбинация с химиотера-

пией или монотерапия CpG ODN может индуцировать противоопухолевые иммунные ответы, которые коррелируют с клиническим исходом [49]. В. Temizoz и соавт. изучили возможность применения в качестве адъюванта противоопухолевых вакцин комбинацию CpG ODN и стимулятора гена ИФН STING, и показали синергизм их действия; в комбинации адъюванты индуцировали иммунный ответ и уменьшали рост опухоли у мышей [50]. Однако раскрытие потенциала CpG ODN в качестве адъюванта для противоопухолевых вакцин или противоопухолевого агента требует дальнейших исследований [49].

Большой интерес как адъюванты противоопухолевых вакцин представляют агонисты TLR3: в ряде работ как в доклинических исследованиях на животных моделях, так и в клинических испытаниях показано, что они повышают вакциноиндуцированные противоопухолевые иммунные ответы и обеспечивают удаление опухоли [51].

Лиганды TLR3 – полирибоинозиновая-полирибоцитидиловая кислота (*Polyriboinosinic – polyribocytidylic acid*, poly(I:C) и ее производное poly-ICLC (Хилтонол, Hiltonol™), представляющий собой poly(I:C), стабилизированную поли-L-лизинном и карбоксиметилцеллюлозой, – синтетические имитаторы полимеров вирусной двуцепочечной РНК со схожим механизмом действия. Они включены в перечень иммунотерапевтических агентов Национального института рака (National Cancer Institute, США) как агенты с высоким потенциалом к усилению эффекта противоопухолевой иммунотерапии [52]. В настоящее время проходят испытания различные стратегии, включающие poly(I:C)/poly-ICLC в вакцинотерапию рака, цель которых максимально стимулировать противоопухолевый иммунный ответ.

Исследования *in vitro* показали, что poly(I:C) эффективно способствует созреванию и активации ДК, стимулирует Т-клетки, обеспечивает цитотоксичность NK-клеток, повышает кросс-презентацию ДК и стимулирует ДК-NK-взаимодействие. Кроме того, poly(I:C) индуцирует секрецию провоспалительных цитокинов как опухолевыми клетками, так и различными иммунными клетками [51]. В экспериментах на мышах было показано, что из всех агонистов TLR poly(I:C) является наиболее эффективным индуктором ИФН 1-го типа [53].

Кроме того, оказалось, что некоторые опухолевые клетки имеют рецепторы TLR3, RIG-I и MDA5, на которые может воздействовать poly(I:C) и вызывать ингибирование опухолевого роста и индукцию апоптоза [54]. Однако в работе [55] показано, что *in vitro* гибель опухолевых клеток была вызвана poly(I:C) – опосредованным воздействием цитокинов и активацией моноцитов. При внутриопухолевом введении poly(I:C) мышам наблюдали гибель опухолевых клеток

и снижение роста опухоли, независимо от активации TLR-сигнальных путей в опухолевых клетках.

Многочисленные доклинические исследования показали, что использование poly(I:C)/poly-ICLC как отдельного адъюванта в различных антигенсодержащих вакцинах приводило к усилению индукции Т-клеток, специфичных к опухолеассоциированным антигенам. Poly(I:C)/poly-ICLC-содержащие вакцины снижали опухолевый рост во всех исследованиях, независимо от пути введения. Также эффект poly(I:C)/poly-ICLC изучали в комбинации с другими адъювантами. В. Вауурти соавт. разработали липосомальную систему доставки белкового антигена, в которую включили poly(I:C) и агонист TLR9 CpG ODN, экспрессирующий неметилованные CpG повторы) [56]. Исследование противоопухолевого потенциала вакцины показало, что она значительно увеличивает продукцию цитокинов в клетках селезенки мышей, вызывает активацию и созревание ДК; иммунизация мышей обеспечивала длительный противоопухолевый постинъекционный иммунитет и снижение прогрессии опухоли [56].

В работе Н.Т.Т. Duong и соавт. описана система доставки ДНК вакцин, в которой наноинженерная ДНК-вакцина с адъювантом poly(I:C) загружена в микроиглы из двуслойных ультра-рН-чувствительных компонентов [57]. В испытаниях на мышах показали, что вакцина с новой системой доставки более эффективна по сравнению со свободной формой, она вызывала отторжение опухолей у мышей и активировала гуморальный и клеточный иммунитет.

Первые клинические исследования poly(I:C) в качестве препарата для лечения рака проводили в 1970 годы, но они показали отсутствие положительного эффекта на исход заболеваний, возможно, из-за короткого времени полувыведения [51]. Стабилизированная форма – poly-ICLC – обеспечивала 5- или 10-кратную устойчивость к гидролизу в сыворотке приматов и индуцировала значимые уровни сывороточного ИФН [58]. Однако увеличение стабильности привело к усилению токсичности, которая проявлялась лихорадкой, гипотензией, синдромом артралгии-миалгии, снижением количества клеток крови, гриппоподобными симптомами, почечной недостаточностью, болью в костях, изменениями в печени, костном мозге и центральной нервной системе. Токсические эффекты poly-ICLC были облегчены снижением внутривенных доз или внутримышечным введением. Пилотное исследование, проведенное А.М. Salazar и соавт., показало безопасность и эффективность низких доз poly-ICLC при внутримышечном введении пациентам со злокачественной глиомой [59].

Созданы модификации poly(I:C) с более оптимизированной доставкой и минимизированными побочными эффектами [60]. Амплиген, poli-I:C –

Poly(I:C12C), нетоксичный аналог poly(I:C) с замененными однонуклеотидными основаниями (G и U), что повысило его устойчивость к гидролизу и снизило токсичность [61].

В противоположность применению poly(I:C) и его модификаций в качестве лекарственных препаратов, клиническая оценка их как адъювантов противоопухолевых вакцин была начата только около 10 лет назад. В ряде исследований poly-ICLC использовали в качестве адъюванта в дендритноклеточных вакцинах для лечения больных глиомой [62, 63]. В работах 2017 г. приводятся многообещающие результаты клинических испытаний неоантигенных персонализированных пептидных или РНК-вакцин для лечения меланомы, в которых в качестве адъюванта использовали лиганд TLR3 poly-ICLC (Хилтонол) [6, 7].

В ряде исследований poly-ICLC сочетали с другими стимуляторами иммунитета, например ГМ-КСФ или агонистом TLR7/8 ресиквимодом [64, 65], монтанидом ISA-51 [66]. Результаты клинических испытаний poly-ICLC в вакцинотерапии опухолей показывают, что этот адъювант безопасен и хорошо переносим [51].

Заключение

Адъюванты – ключевые компоненты противоопухолевых вакцин, так как они усиливают иммунные ответы на вакцинацию. Помимо использования в качестве вспомогательных компонентов вакцин, некоторые адъюванты, например лиганды TLR3 или TLR7/8, могут быть использованы в качестве противоопухолевых агентов для иммунотерапии рака. Несмотря на многообещающие результаты клинических испытаний новых противоопухолевых вакцин, на данный момент существует только несколько адъювантов, разрешенных к использованию.

Механизмы, с помощью которых адъюванты обеспечивают противоопухолевый иммунный ответ, основываются на стимуляции врожденного иммунитета через паттернраспознающие рецепторы, через которые реализуется развитие приобретенных иммунных ответов против опухоли. При этом некоторые адъюванты могут обеспечивать развитие противоопухолевого иммунного ответа путем эффективной доставки антигена и/или адъюванта в опухоль или в антигенпрезентирующие клетки. Сегодня существует 2 направления развития адъювантов для противоопухолевых вакцин: 1-е – поиск новых соединений с адъювантной активностью, 2-е – оптимизация известных сегодня адъювантов и исследование различных комбинаций адъювантов. Исследования на животных, а также клинические испытания подтвердили, что комбинации адъювантов, способных активировать множественные PRRs, гораздо более эффективны, чем их одиночное применение.

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

- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. PMID: 21376230. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- McCarthy E.F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006;26:154–8. PMID: 16789469.
- Kawai T., Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Nat Immunol* 2010;11(5):373–84. PMID: 20404851. DOI: 10.1038/ni.1863.
- Zhou J. Advances and prospects in cancer immunotherapy. *New J Sci* 2014; Article ID 745808. DOI: 10.1155/2014/745808.
- Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):6–14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):6–14. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14.
- Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547:217–21. PMID: 28678778. DOI: 10.1038/nature22991.
- Sahin U., Derhovanessian E., Miller M. et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* 2017;547:222–6. PMID: 28678784. DOI: 10.1038/nature23003.
- Sonntag K., Hashimoto H., Eylich M. et al. Immune monitoring and TCR sequencing of CD4 T cells in a long term responsive patient with metastasized pancreatic ductal carcinoma treated with individualized, neoepitope-derived multipeptide vaccines: a case report. *J Transl Med* 2018;16(1):23. PMID: 29409514. DOI: 10.1186/s12967-018-1382-1.
- Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics. *Int Immunol* 2016;28(7):329–38. PMID: 27006304. DOI: 10.1093/intimm/dxw015.
- Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004;10(9):909–15. PMID: 15340416. DOI: 10.1038/nm1100.
- Барышников А.Ю. Принципы и практика вакцинотерапии рака. *Бюллетень СО РАМН* 2004;112(2):59–63. [Baryshnikov A.Yu. Principles and practice of cancer vaccinotherapy. *Byulleten SO RAMN = Bulletin of the Siberian Division of Russian Medical Sciences Academy* 2004;112(2):59–63. (In Russ.)].
- Banday A.H., Jeelani S., Hruby V.J. Cancer vaccine adjuvants – recent clinical progress and future perspectives. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2015;37(1):1–11. PMID: 25318595. DOI: 10.3109/08923973.2014.971963.
- Brewer J.M. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006;102(1):10–5. PMID: 16188325. DOI: 10.1016/j.imlet.2005.08.002.
- Alfonso S., Valdes-Zayas A., Santiesteban E.R. et al. A randomized, multicenter, placebo-controlled clinical trial of racotumomab-alum vaccine as switch maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 2014;20(14):3660–71. PMID: 24788102. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1674.
- Hutchison S., Benson R.A., Gibson V.B. et al. Antigen depot is not required for alum adjuvanticity. *Fed Am Soc Exp Biol* 2012;26:1272. PMID: 22106367. DOI: 10.1096/fj.11-184556.
- Marichal T., Ohata K., Bedoret D. et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med* 2011;17:996. PMID: 21765404. DOI: 10.1038/nm.2403.
- Schwendener R.A. Liposomes as vaccine delivery systems: a review of the recent advances. *Ther Adv Vaccines* 2014;2(6):159–82. PMID: 25364509. DOI: 10.1177/2051013614541440.
- Allison A., Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 1974;252(5480):252. PMID: 4424229.
- Allison A., Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Recent Results Cancer Res* 1976;(56):58–64. PMID: 188085.
- Райков А.О., Хашем А., Барышникова М.А. Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):90–6. [Raikov A.O., Hashem A., Baryshnikova M.A. Liposomes as target delivery of antitumor drugs. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(2):90–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-90-96.
- Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия. *Российский химический журнал* 2012;LVI(3–4):60–6. [Baryshnikova M.A., Baryshnikov A.Yu. Immunoliposomes and their targets. *Rossiyskiy Khimicheskii Zhurnal = Russian Journal of General Chemistry* 2012; LVI(3–4):60–6. (In Russ.)].
- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины. *Иммунология* 2014;35(6):317–21. [Afanasyeva D.A., Baryshnikova M.A., Scherbakov A.I. et al. The development of anticancer liposomal vaccine model. *Immunologiya = Immunology* 2014;35(6):317–21. (In Russ.)].
- Alving C.R., Beck Z., Matyas G.R., Rao M. Liposomal adjuvants for human vaccines. *Expert Opin Drug Deliv* 2016;13(6):807–16. PMID: 26866300. DOI: 10.1517/17425247.2016.1151871.
- Brignole C., Marimpietri D., Di Paolo D. et al. Therapeutic targeting of TLR9 inhibits cell growth and induces apoptosis in neuroblastoma. *Cancer Res* 2010;70(23):9816–26. PMID: 20935225. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1251.
- Zhong Z., Wei X., Qi B. et al. A novel liposomal vaccine improves humoral immunity and prevents tumor pulmonary metastasis in mice. *Int J Pharm* 2010;399(1–2):156–62. PMID: 20692327. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.07.053.
- Nakamura T., Yamazaki D., Yamauchi J., Harashima H. The nanoparticulation by octaarginine-modified liposome improves α -galactosylceramide-mediated antitumor therapy via systemic administration. *J Control Release* 2013;171(2):216–24. PMID: 23860186. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.004.
- Neelapu S.S., Baskar S., Gause B.L. et al. Human autologous tumor-specific T-cell responses induced by liposomal delivery of a lymphoma antigen. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8309–17. PMID: 15623607. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1071.
- Saga K., Kaneda Y. Virosome presents multimodel cancer therapy without viral replication. *Biomed Res Int* 2013;2013:764706. PMID: 24369016. DOI: 10.1155/2013/764706.
- Trovato M., De Berardinis P. Novel antigen delivery systems. *World J Virol* 2015;4(3):156–68. PMID: 26279977. DOI: 10.5501/wjv.v4.i3.156.
- Almeida J.D., Edwards D.C., Brand C.M., Heath T.D. Formation

- of virosomes from influenza subunits and liposomes. *Lancet* 1975;2:899–901. PMID: 53375. DOI:10.1016/s0140-6736(75)92130-3.
31. Jamali A., Holtrop M., de Haan A. et al. Cationic influenza virosomes as an adjuvanted delivery system for CTL induction by DNA vaccination. *Immunol Lett* 2012;148(1):77–82. PMID: 22981929. DOI: 10.1016/j.imlet.2012.08.006.
32. Yang X., Lian K., Meng T. et al. Immune adjuvant targeting micelles allow efficient dendritic cell migration to lymph nodes for enhanced cellular immunity. *ACS Appl Mater Interfaces* 2018;10(39):33532–44. PMID: 30192498. DOI: 10.1021/acsami.8b10081.
33. Qiu F., Becker K.W., Knight F.C. et al. Poly(propylacrylic acid) – peptide nanoplexes as a platform for enhancing the immunogenicity of neoantigen cancer vaccines. *Biomaterials* 2018;182:82–91. PMID: 30107272. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.052.
34. Wilson N.S., Duester P., Yang B. et al. Inflammasome-dependent and -independent IL-18 production mediates immunity to the ISCOMATRIX adjuvant. *J Immunol* 2014;192(7):3259–68. PMID: 24610009. DOI: 10.4049/jimmunol.1302011.
35. Davis I.D., Chen W., Jackson H. et al. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(29):10697–702. PMID: 15252201. DOI: 10.1073/pnas.0403572101.
36. Davis I.D., Quirk J., Morris L. et al. A pilot study of peripheral blood BDCA-1(CD1c) positive dendritic cells pulsed with NY-ESO-1 ISCOMATRIX™ adjuvant. *Immunotherapy* 2017;9(3):249–59. PMID: 28183192. DOI: 10.2217/imt-2016-0132.
37. Silva A., Mount A., Krstevska K. et al. The combination of ISCOMATRIX adjuvant and TLR agonists induces regression of established solid tumors in vivo. *J Immunol* 2015;194(5):2199–207. PMID: 25646304. DOI: 10.4049/jimmunol.1402228.
38. Goldberg J.L., Sondel P.M. Enhancing Cancer Immunotherapy Via Activation of Innate Immunity. *Semin Oncol* 2015;42(4):562–72. PMID: 26320061. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.012.
39. Gosu V., Basith Sh., Kwon O.P., Choi S. Therapeutic applications of nucleic acids and their analogues in toll-like receptor signaling. *Molecules* 2012;17:13503–29. PMID: 23151919. DOI: 10.3390/molecules171113503.
40. Schwarz T.F. Clinical update of the AS04-adjuvanted human papillomavirus-16/18 cervical cancer vaccine. *Cervarix Adv Ther* 2009;26(11):983–98. PMID: 20024678. DOI: 10.1007/s12325-009-0079-5.
41. Ferreira Costa A.P., Gonçalves A.K., Machado P.R. L. et al. Immune response to human papillomavirus one year after prophylactic vaccination with AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine: HPV-specific IgG and IgA antibodies in the circulation and the cervix. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(8):2313–7. PMID: 30141308. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2313.
42. Huen A.O., Rook A.H. Toll receptor agonist therapy of skin cancer and cutaneous T-cell lymphoma. *Curr Opin Oncol* 2014;26(2):237–44. PMID: 24441505. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000048.
43. Junt T., Barchet W. Translating nucleic acid-sensing pathways into therapies. *Nat Rev Immunol* 2015;15(9):529–44. PMID: 26292638. DOI: 10.1038/nri3875.
44. Ren S., Wang Q., Zhang Y. et al. Imiquimod enhances the potency of an exogenous BM–DC based vaccine against mouse melanoma. *Int Immunopharmacol* 2018;64:69–77. PMID: 30149266. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.08.026.
45. Paßlick D., Piradashvili K., Bamberger D. et al. Delivering all in one: Antigen-nanocapsule loaded with dual adjuvant yields superadditive effects by DC-directed T cell stimulation. *J Control Release* 2018;289:23–34. PMID: 30219277. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.09.008.
46. Ignatz-Hoover J.J., Wang H., Moreton S.A. et al. The role of TLR8 signaling in Acute Myeloid Leukemia Differentiation. *Leukemia* 2015;29(4):918–26. PMID: 25283842. DOI: 10.1038/leu.2014.293.
47. Chen K., Wu Z., Zang M. et al. Immunization with glypican-3 nanovaccine containing TLR7 agonist prevents the development of carcinogen-induced precancerous hepatic lesions to cancer in a murine model. *Am J Transl Res* 2018;10(6):1736–49. PMID: 30018715.
48. Krieg A.M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(6):471–84. PMID: 16763660. DOI: 10.1038/nrd2059.
49. Temizoz B., Kuroda E., Ishii K.J. Combination and inducible adjuvants targeting nucleic acid sensors. *Curr Opin Pharmacol* 2018;41:104–13. PMID: 29870915. DOI: 10.1016/j.coph.2018.05.003.
50. Temizoz B., Kuroda E., Ohata K. et al. TLR9 and STING agonists synergistically induce innate and adaptive type-II IFN. *Eur J Immunol* 2015;45(4):1159–69. PMID: 25529558. DOI: 10.1002/eji.201445132.
51. Ammi R., De Waele J., Willems Y. et al. Poly(I: C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol Ther* 2015;146:120–31. PMID: 25281915. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.09.010.
52. Cheever M.A. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev* 2008;222:357–68. PMID: 18364014. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2008.00604.x.
53. Longhi M.P., Trumpfeller C., Idoyaga J. et al. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *J Exp Med* 2009;206(7):1589–602. PMID: 19564349. DOI: 10.1084/jem.20090247.
54. Cheng Y.S., Xu F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer Biol Ther* 2010;10(12):1219–23. PMID: 20930504.
55. Klein J.C., Wild C.A., Lang S., Brandau S. Differential immunomodulatory activity of tumor cell death induced by cancer therapeutic toll-like receptor ligands. *Cancer Immunol Immunother* 2016;65(6):689–700. PMID: 27034235. DOI: 10.1007/s00262-016-1828-3.
56. Bayyurt B., Tincer G., Almacioglu K. et al. Encapsulation of two different TLR ligands into liposomes confer protective immunity and prevent tumor development. *J Control Release* 2017;247:134–44. PMID: 28069554. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.01.004.
57. Duong H.T. T., Yin Y., Thambi T. et al. Smart vaccine delivery based on microneedle arrays decorated with ultra-pH-responsive copolymers for cancer immunotherapy. *Biomaterials* 2018;185:13–24. PMID: 30216806. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.09.008.
58. Levy H.B., Baer G., Baron S. et al. A modified polyribonucleoside-polyribocytidylic acid complex that induces interferon in primates. *J Infect Dis* 1975;132(4):434–9. PMID: 810520.
59. Salazar A.M., Levy H.B. et al. Long-term treatment of malignant gliomas with intramuscularly administered polyinosinic-polycytidylic acid stabilized with polylysine and carboxymethylcellulose: an open pilot study. *Neurosurgery* 1996;38(6):1096–103; discussion 1103–4. PMID: 8727138.
60. Hafner A.M., Cortés B., Merkle H.P. Particulate formulations for the delivery of poly (I: C) as vaccine adjuvant. *Adv*

- Drug Deliv Rev 2013;65(10):1386–99. PMID: 23751781. DOI: 10.1016/j.addr.2013.05.013.
61. Jasani B., Navabi H., Adams M. Ampligen: a potential toll-like 3 receptor adjuvant for immunotherapy of cancer. *Vaccine* 2009;27:3401. PMID: 19200817. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.01.071.
62. Okada H., Kalinski P., Ueda R. et al. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with α -type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic – polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethyl-cellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol* 2011;29(3):330–6. PMID: 21149657. DOI: 10.1200/JCO.2010.30.7744.
63. Prins R.M., Soto H., Konkankit V. et al. Gene expression profile correlates with T-cell infiltration and relative survival in glioblastoma patients vaccinated with dendritic cell immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2011;17(6):1603–15. PMID: 21135147. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2563.
64. Morse M.A., Chapman R., Powderly J. et al. Phase I study utilizing a novel antigen-presenting cell-targeted vaccine with Toll-like receptor stimulation to induce immunity to self-antigens in cancer patients. *Clin Cancer Res* 2011;17(14):4844–53. PMID: 2163285. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0891.
65. Dhodapkar M.V., Sznol M., Zhao B. et al. Induction of antigen-specific immunity with a vaccine targeting NY-ESO-1 to the dendritic cell receptor DEC-205. *Sci Transl Med* 2014;6(232):232–51. PMID: 24739759. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008068.
66. Sabbatini P., Tsuji T., Ferran L. et al. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* 2012;18(23):6497–508. PMID: 23032745. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2189.

ORCID авторов/ORCID of authors

М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

В.С. Косоруков/V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

БИОМАРКЕРЫ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОГО РАКА

С.А. Ашуба, Э.Ш. Соломко, Д.А. Хоченков, А.А. Осипова, Е.В. Степанова

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

Контакты: Саида Анатольевна Ашуба Zanda82@mail.ru

Почечно-клеточный рак (ПКР) занимает первое место по смертности среди урогенитальных опухолей и является самым распространенным заболеванием после рака предстательной железы и мочевого пузыря. Раннее выявление ПКР позволяет сразу проводить адекватное лечение и тем самым существенно увеличивать выживаемость пациентов. В случае бессимптомного протекания своевременная диагностика ПКР на ранних стадиях, как правило, затруднена. На сегодняшний день проблема поиска молекулярных маркеров светлоклеточного ПКР, позволяющих определить стадию, метастатический потенциал и прогноз заболевания, подобрать схему лечения остается актуальной. Особый интерес представляют биомаркеры раннего выявления ПКР и его метастатического потенциала, а также маркеры, которые могут быть получены неинвазивными или минимально инвазивными методами. В данном обзоре представлены современные способы диагностики ПКР с помощью биомаркеров.

Ключевые слова: почечно-клеточный рак, биомаркеры, ангиогенез, таргетная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-45-51

BIOMARKERS OF RENAL CELL CARCINOMA

S.A. Aschuba, E.S. Solomko, D.A. Khochenkov, A.A. Osipova, E.V. Stepanova

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

Renal cell carcinoma (RCC) ranks first in mortality among urogenital tumors and is the most common disease after prostate and bladder cancer. Early detection of RCC allows immediately undertaking appropriate treatment, which significantly increases the survival of patients. In the case of the asymptomatic RCC, timely diagnosis in the early stages is usually difficult. To date, the problem of searching for molecular markers of clear cell RCC, which allows to determine the stage, metastatic potential and prognosis of disease, or select a treatment regimen remains topical. Of particular interest are early-stage biomarkers of RCC and its metastatic potential, as well as markers that can be obtained by non-invasive or minimally invasive methods. This review presents modern methods for diagnosing RCC using biomarkers.

Key words: renal cell carcinoma, biomarkers, angiogenesis, targeted therapy

Введение

Почечно-клеточный рак (ПКР) составляет 90 % всех злокачественных опухолей почек и представляет собой одно из наиболее распространенных злокачественных новообразований. В 2015 г. в США зарегистрировано примерно 61 560 новых случаев и 14 080 смертей [1], а в России – 22 846 новых случаев и 8511 смертей. Мужчины страдают от этой патологии в 2 раза чаще, чем женщины, при этом пик заболеваемости приходится на возраст 50–70 лет [2].

Светлоклеточный почечно-клеточный рак (СКПКР) является наиболее распространенным гистологическим типом ПКР (80–90 %) и имеет худший прогноз выживаемости по сравнению с другими типами этого рака [3]. Гиперваскуляризация, наблюдаемая при СКПКР, происходит в результате инактивации гена *VHL*, который, в свою очередь, приводит к ин-

дукции ряда генов: *VEGF*, *PDGF*, *TGF*, ферментов *CA9*, *MMP3*, *MMP9*, цитокинов интерлейкинов 8, 12, ФНО- α и других молекул [4]. В результате смещения баланса между проангиогенными и антиангиогенными факторами активируется опухолевый рост и процессы метастазирования. Установление механизмов, лежащих в основе патогенеза СКПКР, послужило толчком для активного изучения вышеперечисленных сигнальных молекул в качестве маркеров опухолевого роста и метастазирования ПКР.

С появлением технологий геномного профилирования и таргетной терапии биомаркеры играют все более важную роль в лечении больных раком. По определению ВОЗ [5] «биомаркером является любое вещество, структура или процесс, которые могут быть измерены в организме или в продуктах его жизнедеятельности и могут прогнозировать или

влиять на частоту возникновения или исход заболевания». В клинической онкологии биомаркер злокачественных опухолей должен определять не только риск развития рака, локализацию опухоли, степень распространенности заболевания, но и потенциальный ответ на терапию, что очень важно при разработке стратегии персонализированного лечения.

В зависимости от цели использования биомаркеры рака могут быть классифицированы по следующим категориям [6].

1. Диагностические биомаркеры. Используются для определения наличия заболевания и локализации опухоли.
2. Прогностические биомаркеры. Предсказывают характер течения болезни (рецидив или прогрессирование заболевания) в будущем и выживаемость. Прогностические маркеры связаны с опухолевой клеточной пролиферацией, дифференцировкой, ангиогенезом, инвазией или метастазированием.
3. Предиктивные биомаркеры. Позволяют предсказывать реакцию (клинический эффект, безрецидивный период, выживаемость) на конкретные терапевтические вмешательства, а также токсичность различных видов планируемого лекарственного лечения. Предиктивные маркеры напрямую связаны с молекулярной мишенью для таргетного препарата, каскадом внутриклеточных сигналов.

Необходимо учитывать, что эта классификация условная, так как одни и те же биомаркеры могут обладать как прогностическими, так и предиктивными свойствами. В качестве первой линии лечения метастатического ПКР, представляющего собой васкуляризованную опухоль, рекомендовано лечение антиангиогенными препаратами, ингибирующими мультитирозинкиназную активность. Поэтому применение предиктивных маркеров, определяющих васкулярный статус опухоли, имеет большое значение. В этой статье мы рассматриваем перспективные биомаркеры для выбора таргетной терапии и мониторинга эффективности лечения.

Мутации в гене *VHL*

Мутации и aberrантное метилирование гена *VHL* специфичны для СКПКР и являются ранним генетическим событием в канцерогенезе. Однако вопрос о прогностической значимости этого маркера остается открытым, так как его использование для прогнозирования СКПКР дало противоречивые результаты [7, 8]. Было проведено 2 крупных исследования, в одном из которых выявили, что мутации гена *VHL* ассоциируются с улучшением выживаемости больных, особенно на ранних стадиях СКПКР, тогда как в другом, наоборот, больные с такой мутацией имели худшие прогноз и общую выживаемость. Так, в первом исследовании у 187 пациентов со СКПКР,

подвергшихся радикальной нефрэктомии, мутации в гене *VHL* были обнаружены в 58 % случаев (46 % составляли делеции, 30 % – миссенс-мутации, 16 % – вставки и 6 % – нонсенс-мутации) и только в 5,3 % случаев – гиперметилирование *VHL*. Однофакторный регрессионный анализ показал, что наличие мутаций в гене *VHL* коррелирует с лучшей онкоспецифической ($p = 0,23$) и безрецидивной выживаемостью ($p = 0,24$) больных со стадиями I–III и никак не коррелирует с выживаемостью больных с IV стадией СКПКР ($p = 0,76$) [9]. Во 2-м исследовании был также проведен однофакторный регрессионный анализ выживаемости 113 больных со СКПКР, 34 % из которых имели соматические мутации в гене *VHL*. Было показано, что клинический исход у пациентов с мутациями и без мутаций в гене *VHL* практически не имел отличий, однако худший прогноз наблюдался в подгруппе пациентов с мутациями *VHL*, связанными со сдвигом рамки считывания, приводящими к синтезу нефункциональных укороченных *VHL*-белков ($p = 0,02$) [10, 11].

Примечательно, что в другом исследовании у пациентов с метастатическим СКПКР, имеющих мутацию *VHL*, также связанную с утратой функции *VHL*-белков, частота ответа на таргетную анти-VEGF-терапию была выше по сравнению с пациентами, имеющими дикий тип гена *VHL* (52 % против 31 %, $p = 0,04$). Однако никаких различий в безрецидивной и общей выживаемости между этими 2 группами пациентов не выявлено [12].

При сравнении активационного статуса гена *VHL* с клиническим ответом у 43 пациентов, получавших комбинированную терапию интерферон + бевацизумаб, было обнаружено, что пациенты с мутантным или гиперметилированным *VHL* имели более продолжительное среднее время до прогрессирования – 13,3 мес против 7,4 мес у пациентов с диким типом *VHL* ($p = 0,06$) [13].

Терапия пазопанибом у 78 пациентов со СКПКР также показала отсутствие связи между статусом гена *VHL* и объективным ответом или безрецидивной выживаемостью [14] получавших сорафениб [15].

Результаты всех перечисленных исследований свидетельствуют о том, что *VHL* является не единственной детерминантой СКПКР, которая определяет ответ на терапию. Если учитывать, что более чем в половине случаев у пациентов со СКПКР происходит инактивация гена *VHL*, остается неясной возможность достоверного использования данного биомаркера в качестве значимого инструмента для прогнозирования клинического ответа.

Карбоангидраза IX (CA-IX)

Карбоангидразы (Carbonic anhydrase, CA) – трансмембранные ферменты, которые играют важную роль

в регуляции рН, катализируя обратимые реакции угольной кислоты в гидрокарбонат и протон. СА-IX не представлена в здоровой почечной ткани, но при этом присутствует почти во всех гистологических подтипах ПКР, накапливаясь под действием гипоксии в результате инактивации гена *VHL*. Чаще всего (86–95 %) СА-IX встречается в светлоклеточных опухолях почек, тогда как в онкоцитомах, хромофобном и папиллярном типах ее экспрессия значительно ниже [16]. Экспрессия СА-IX может быть обнаружена в опухоли с помощью иммуногистохимии, в крови и ткани с помощью ELISA-анализа и RT-PCR. Потеря экспрессии СА-IX является неблагоприятным фактором прогноза при СКПКР, связана с развитием метастазов и рецидива заболевания, низкой выживаемостью без прогрессирования [17, 18]. Показано, что у пациентов с метастатическим СКПКР, получавших сунитиниб, высокий уровень экспрессии СА-IX коррелирует с хорошим ответом на лечение и более длительной общей выживаемостью [19]. В другом исследовании показано, что у пациентов, получавших темсиролиму и бевацизумаб, высокий уровень СА-IX в сыворотке значимо ассоциируется с более короткой общей выживаемостью [20].

При изучении прогностического значения экспрессии СА-IX в опухоли у 94 пациентов с метастатическим СКПКР, получавших сорафениб или сунитиниб, было обнаружено, что у пациентов независимо от выраженности экспрессии СА-IX в опухоли наблюдалось сходное сокращение размеров новообразования ($p = 0,38$). Кроме того, экспрессия СА-IX не была связана с частотой ответа ($p = 1,0$), продолжительностью лечения ($p = 0,23$) и общей выживаемостью ($p = 0,43$) [21]. В клиническом исследовании TARGET оценка прогностической значимости СА-IX не выявила корреляции между степенью экспрессии этого биомаркера и выживаемостью без прогрессирования (5,5 против 5,4 мес, при высоком уровне СА-IX против низкого, $p = 0,97$) или между размерами опухоли (–14,9 против –12,6 %, $p = 0,63$) у пациентов, получавших сорафениб по сравнению с пациентами, получавшими плацебо [15].

В то же время многофакторный анализ позволил установить, что положительное окрашивание СА-IX является независимым прогностическим фактором для более длительной общей выживаемости больных, получавших сунитиниб [20]. В дальнейшем этот результат подтвердился при многофакторном анализе, показавшем, что повышение экспрессии СА-IX после терапии сунитинибом связано с более длительной выживаемостью (отношение рисков (ОР) = 0,48, $p = 0,02$), тогда как низкая экспрессия СА-IX – с плохим прогнозом и возможным развитием резистентности [22].

HIF

HIF-1 – транскрипционный фактор, обеспечивающий повышение экспрессии VEGF и рецепторов VEGF в ответ на гипоксию. Кроме того, HIF-1 изменяет экспрессию генов, контролирующих транспорт глюкозы и гликолиз, что обеспечивает адаптацию клеток к условиям гипоксии. Ряд данных свидетельствует о том, что HIF-1 α и HIF-2 α играют разные роли в опухолевом генезе почек. Показано, что HIF-2 α , но не HIF-1 α , имеет решающее значение для роста *VHL*^{-/-} ПКР *in vivo* [23]. HIF-1 α стимулирует гены гликолитического пути метаболизма и блокирует анаболический биосинтез [24, 25]. В то же время HIF-2 α активирует TGF- α [26]. Следует отметить, что HIF-2 α индуцирует пролиферацию опухолевых клеток путем индукции транскрипционной активности с-Мус [27]. Данные из вышеперечисленных исследований позволяют заключить, что именно HIF-2 α является основным онкогенным фактором при СКПКР.

В нескольких исследованиях показано, что высокая экспрессия HIF-1 α коррелирует с низкой общей выживаемостью больных метастатическим СКПКР [28, 29]. В частности, показано, что выживаемость пациентов с высокой экспрессией HIF-1 α (>35 %) в опухоли была короче выживаемости пациентов с низкой экспрессией HIF-1 α (≤ 35 %). Медиана выживаемости составила 13,5 мес против 24,4 мес соответственно [28].

Кроме того, установлено, что повышенная экспрессия как HIF-1 α , так и HIF-2 α в образцах СКПКР коррелирует с более высокой вероятностью объективного ответа на прием сунитиниба [30]. Пациенты с опухолями, выражающими высокий уровень HIF-1 α ($p = 0,003$) или HIF-2 α ($p = 0,001$), были более склонны к достижению объективного клинического ответа на сунитиниб (76 %) по сравнению с опухолями с низким уровнем HIF (13 %). Однако эти данные были получены на ограниченном числе пациентов, включенных в исследование, и требуют подтверждения в независимых исследованиях.

VEGF и PDGF

VEGF (Vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов) – семейство белков (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и PGF), которые регулируют ангиогенез и лимфангиогенез у млекопитающих путем специфического связывания с рецепторами с тирозинкиназной активностью (VEGFR-1, -2 и -3) на поверхности клеток. Наиболее изученный лиганд VEGF-A связывается с рецепторами VEGFR-1 (Flt-1) и VEGFR-2 (KDR/Flk-1), что приводит к димеризации рецептора и передаче сигнала [20].

Было проведено несколько независимых исследований, посвященных диагностической значимости динамики содержания VEGF в крови больных ПКР.

Показано, что уровень VEGF в плазме крови коррелирует со степенью и стадией ПКР, а также с наличием метастазов. Уровень VEGF значительно выше у пациентов со СКПКР по сравнению с контрольной группой. Кроме того, обнаружено, что высокий уровень VEGF у пациентов коррелирует с более коротким безрецидивным периодом и с уменьшением общей выживаемости. Показано, что исходный уровень VEGF определяет длительность безрецидивной и общей выживаемости у пациентов после хирургического лечения метастатического ПКР. В нескольких рандомизированных клинических испытаниях таргетных препаратов было также показано, что пациенты с метастатическим ПКР с исходно высоким содержанием VEGF в крови имели более неблагоприятный прогноз. Так, высокие значения VEGF ассоциировались с плохой общей выживаемостью и выживаемостью без прогрессирования у больных, получавших сунитиниб или интерферон альфа, тогда как исходно низкие значения VEGFR и VEGF значимо ассоциировались с более длительной выживаемостью без прогрессирования у больных, получавших сунитиниб [31]. Обнаружено, что сунитиниб может вызывать дозозависимое обратимое повышение содержания VEGF-A в крови здоровых доноров и мышей без опухоли. В клинической ситуации это может привести к маскировке реальных значений VEGF, вызванных заболеванием, что делает сомнительной возможность использования этого маркера для предсказания эффективности таргетной терапии [20, 32]. Использование VEGF в качестве независимого прогностического маркера осложняется еще и тем фактом, что обычно VEGF содержится в высоких концентрациях в тромбоцитах. Поэтому во время лизиса тромбоцитов концентрация VEGF в сыворотке увеличивается и определение нетромбоцитарного VEGF, специфичного для процессов ангиогенеза опухоли, осложняется.

Рецептор тромбоцитарного фактора роста (Platelet-derived growth factor) PDGF (PDGFR) обладает тирозинкиназной активностью и бывает 2 типов – α и β , которые кодируются разными генами. α -тип связывается с PDGF-AA, PDGF-BB и PDGF-AB, а β -тип PDGFR связывается с PDGF-BB и PDGF-AB. Рецепторы являются важными белками, регулирующими пролиферацию, дифференцировку, рост клеток в онкогенезе. Анализ периваскулярного статуса ПКР выявил обратную зависимость между экспрессией PDGFR и низкой плотностью сосудов в опухоли и выживаемостью больных [33].

При многофакторном анализе экспрессии тканевых PDGFR α и VEGFR1 не установлены корреляции с выживаемостью без прогрессирования у больных, леченных сунитинибом и сорафенибом [18]. В то же время в другом исследовании показано,

что высокая экспрессия PDGFRB ассоциировалась с лучшим объективным ответом на лечение сунитинибом [34].

Матричные металлопротеиназы (Matrix metalloproteinases, MMP)

MMP представляют собой семейство протеаз, в котором MMP2 и MMP9 (называемые также желатиназами 72 kd и 92 kd) приписывается центральная роль в протеолитической деградациии базальной мембраны и внеклеточного матрикса при инвазии малигнизированных клеток. MMP способствуют формированию микроокружения для роста опухоли на ранних стадиях туморогенеза и метастазированию на поздних стадиях.

Большинство MMP вырабатывается в качестве латентных проэнзимов, которые активируются во внеклеточном состоянии через протеолитическое расщепление. Активность MMP уравнивается специфическими тканевыми ингибиторами металлопротеиназ (TIMP), причем связывание TIMP-1 с проMMP9, а TIMP-2 и TIMP-4 с проMMP2 предотвращает их последующую активацию. MMP9 способна деградировать коллаген 4 типа – главный структурный компонент базальной – и увеличивать активность проангиогенных факторов, таких как VEGF и TGF- β . Показано, что высокая экспрессия MMP9 и высокий уровень ее желатинолитической активности были связаны с плохой выживаемостью и высокой частотой метастазирования у больных ПКР. MMP9 может рассматриваться как прогностический фактор выживаемости без прогрессирования у больных с ПКР [35]. Кроме того, показано, что экспрессия MMP9 статистически значимо коррелирует с градацией СКПКР по морфологии клеточного ядра [27].

Биспецифические фосфатазы MAP-киназ

Аберрантная активность MAP-киназного каскада выявлена в опухолях различного происхождения. В последнее время большое внимание уделяется негативным регуляторам MAP-киназ – фосфатазам MAP-киназ (МКР). Эти фосфатазы, которые относятся к семейству биспецифических протеинфосфатаз, инактивируют MAP-киназы, дефосфорилируя последние по тирозиновым и треониновым остаткам. Блокада этого пути является целью уже используемых и разрабатываемых новых таргетных препаратов для терапии рака. На сегодняшний день из всех МКР наиболее изучена МКР-1/DUSP1, которая экспрессируется во время эмбрионального развития в плаценте и печени; постнатально высокий уровень мРНК определяется в почках. При анализе профиля экспрессии более чем 200 генов в нормальных и клетках СКПКР методом эррей-гибридизации обнаружено значительное снижение в опухоли

уровня транскрипционной активности фосфатазы *DUSP9*/МКР4. Значительное снижение активности гена *DUSP9* у пациентов со СКПКР на I стадии и измененный уровень экспрессии гена в доброкачественных опухолях почки позволяют рассматривать *DUSP9* в качестве одного из диагностических маркеров для раннего выявления злокачественных опухолей почки [36].

Опухолевая М2-пируваткиназа (М2-ПК)

Димерная форма опухолевой М2-ПК представляет собой один из наиболее перспективных биомаркеров для раннего выявления рака почек. Изоформа М2-ПК – ключевой фермент, катализирующий лимитирующую конечную реакцию гликолиза. ПК здоровой клетки состоит из 4 субъединиц и существует в нескольких изоформах (L, R, M1, M2), отличающихся своими свойствами и тканеспецифичностью. Тип L обнаруживается в печеночных и почечных проксимальных канальцах, тип R – в эритроцитах, тип M1 – в мышцах и головном мозге, тип M2 – в легких. Однако только тип М2-ПК обнаруживается в опухолевой клетке. При этом было показано, что на ранних стадиях ПКР чувствительность к данному маркеру довольно низкая и варьирует в пределах 27–47 % в разных исследованиях. Тем не менее обнаружена значительная корреляция между уровнем М2-ПК и стадией ПКР. Большой интерес представляет анализ динамики содержания М2-ПК у пациентов после хирургического вмешательства. Показано, что после успешной операции неметастатического ПКР повышенный уровень М2-ПК нормализуется в течение 11 нед и не меняется при рецидивах или метастазировании ПКР [37].

Опухолеассоциированный ингибитор трипсина (ТАТИ)

Опухолеассоциированный ингибитор трипсина (tumor-associated trypsin inhibitor, ТАТИ) представляет собой низкомолекулярный белок (6 кДа), ингибирующий трипсин. ТАТИ экспрессируется вместе с ассоциированным с опухолью трипсином, который участвует в протеазных каскадах, способствующих инвазивности опухолей. Впервые выделен из мочи пациентки с раком яичников. В сыворотке может возникать при многих видах рака (рак яичников, мочевого пузыря и почек) и является маркером неблагоприятного прогноза. Здоровые ткани почек продуцируют ТАТИ в небольших количествах, однако резкое повышение концентрации ТАТИ в крови связано с активацией синтеза ТАТИ опухолевыми клетками и наблюдается у 48–69 % пациентов с карциномой почек [20]. Обнаружена также корреляция между содержанием ТАТИ и клинической стадией ПКР и степенью дифференцировки опухолевых клеток. Сообщается также, что ТАТИ является независимым

прогностическим фактором при ПКР: у пациентов с высоким содержанием ТАТИ значительно снижается выживаемость по сравнению с пациентами с нормальным уровнем этого маркера. Установлено, что ТАТИ – более чувствительный маркер по сравнению с раково-эмбриональным маркером (СЕА) и карбоангидразами (СА 15–3, СА 125 и СА 19–9) и подходит для мониторинга прогрессирования заболевания после хирургических вмешательств. Однако ТАТИ в высоких концентрациях обнаруживается, как правило, у пациентов с распространенным заболеванием и не подходит для ранней диагностики ПКР. Недавно было подтверждено, что ТАТИ является независимым прогностическим фактором при почечно-клеточной карциноме [38].

МикроРНК

МикроРНК представляют собой класс малых, некодирующих РНК, которые участвуют в регуляции различных биологических процессов, таких как подвижность, дифференцировка, пролиферация клеток и апоптоз. При некоторых видах злокачественных опухолей происходит aberrantная экспрессия микроРНК, что предполагает их новую роль в качестве онкогенов или опухолевых супрессоров и дает возможность использовать их в клинике в качестве диагностических и прогностических маркеров рака. Анализ экспрессии микроРНК в образцах, полученных из опухоли и нормальной ткани пациентов с СКПКР, выявил нарушения в экспрессии miR-166. Экспрессия miR-122, miR-155 и miR-210 в опухоли была сильно повышена, тогда как экспрессия miR-200c, miR-335 и miR-218 была больше всего занижена по сравнению с нормальной тканью [39]. Получены данные о важной роли микроРНК в адаптивном ответе на низкий уровень кислорода в опухолях. Особый интерес представляет miR-210, которая играет доминирующую роль среди других микроРНК в развитии ответа на гипоксический стресс. Это подтверждается ее стабильной экспрессией в условиях гипоксии во всех экспериментальных системах *in vivo* и *in vitro* как в злокачественных клетках, так и в нормальных клетках в условиях физиологической гипоксии. miR-210 является мишенью для HIF1 α , и ее экспрессия коррелирует с уровнем HIF1 α и неблагоприятным клиническим прогнозом [40]. Высокая экспрессия при СКПКР подтверждена в нескольких исследованиях [40, 41], кроме того, показано также значительное повышение уровня циркулирующей miR-210 у больных СКПКР по сравнению со здоровыми донорами [42]. Несмотря на возрастающий интерес к микроРНК, их роль в регуляции генов до конца не изучена. Лучшее понимание роли микроРНК в этих клеточных процессах может привести к разработке новых терапевтических методов для таргетной терапии рака.

Заключение

Несмотря на активные поиски новых универсальных диагностических или прогностических маркеров ПКР в последние годы, данная проблема до сих пор не решена. Известно, что лечение пациентов, у которых ПКР был диагностирован на ранней стадии заболевания, протекающей без видимых симптомов, дает хорошие результаты. Однако в 50 % случаев ПКР на сегодняшний день обнаруживается случайно, во время исследования других сопутствующих заболеваний, и в 25–30 % случаев у этих пациентов уже имеются отдаленные метастазы. Широко применяемые в клинике неинвазивные методы исследова-

ния (ультразвуковое исследование, компьютерная, магнитно-резонансная томография) позволяют определять небольшие опухоли в почках. Однако эти методы имеют ряд недостатков, существенным из которых является неспособность отличать доброкачественные опухоли от злокачественных, что зачастую приводит к ложноположительным результатам и, как следствие, к гипердиагностике. Очевидно, что молекулярные биомаркеры, представленные в крови или моче, предпочтительнее маркеров, полученных из других тканей с помощью инвазивных методов, таких как биопсия, которая имеет свои осложнения и может применяться только при наличии четких показаний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin* 2015;65(1):5–29. DOI: 10.3322/caac.21254.
- Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2015. 250 с. [Malignant neoplasms in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Edited by A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU “NMIRTS” Minzdrava Rossii, 2015. 250 p. (In Russ.)].
- Опухоли почки. Морфологическая диагностика и генетика: Руководство. Под ред. Ю.Ю. Андреевой и Г.А. Франка. М., 2011, 66 с. [Tumors of the kidney. Morphological diagnosis and genetics: Guide. Under the editorship of Yu.Yu. Andreeva and G.A. Frank. M., 2011. 66 p. (In Russ.)].
- Kaelin W.G. Jr. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10(18 Pt2):6290S – 5S. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-sup-040025.
- Goossens N., Nakagawa S., Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res* 2015;4(3):256–9. DOI: 10.3978/j.issn.2218-676X.2015.06.04.
- Снеговой А.В., Манзюк Л.В. Значение биомаркеров для определения тактики лечения и прогноза злокачественных опухолей. *Практическая онкология* 2011;12(4):166–70. [Snegovoi A.V., Manzjuk L.V. The importance of biomarkers for determining treatment strategy and prognosis of malignant tumors. *Practicheskaya Oncologiya = Practical Oncology* 2011;12(4):166–70. (In Russ.)].
- Cooper S.J., Tun H.W., Roper S.M. et al. Current status of biomarker discovery in human clear cell Renal cell carcinoma. *J Mol Biomark Diagn* 2012; S-2:1–10. DOI: 10.4172/2155-9929.S2-005.
- Li M., Rathmell W.K. Biomarkers for renal cell carcinoma. In the book: *Kidney Cancer. Principles and Practice*. Eds. Primo N. Lara Jr., Eric Jonasch. New York, 2012. Pp. 47–65.
- Yao M., Yoshida M., Kishida T. et al. VHL tumor suppressor gene alterations associated with good prognosis in sporadic clear-cell renal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2002;94(20):1569–75. PMID: 12381710. DOI:10.1093/jnci/94.20.1569.
- Schraml P., Struckmann K., Hatz F. et al. VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 2002;196(2):186–93. PMID: 11793370. DOI: 10.1002/path.1034.
- Bindra R.S., Vasselli J.R., Stearman R. et al. VHL-mediated Hypoxia Regulation of cyclin D1 in renal carcinoma cells. *Cancer Res* 2002;62(11):3014–9. PMID: 12036906.
- Choueiri T.K., Vaziri S.A., Jaeger E. et al. Von Hippel-Lindau gene status and response to vascular endothelial growth factor targeted therapy for metastatic clear cell renal cell carcinoma. *J Urol* 2008;180(3):860–5. DOI: 10.1016/j.juro.2008.05.015.
- Rini B.I., Jaeger E., Weinberg V. et al. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU Int* 2006;98(4):756–62. PMID: 16827904. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06376.x.
- Choueiri T.K., Cheng S., Qu A.Q. et al. Carbonic anhydrase IX as a potential biomarker of efficacy in metastatic clear-cell renal cell carcinoma patients receiving sorafenib or placebo: Analysis from the treatment approaches in renal cancer global evaluation trial(TARGET). *Urol Oncol* 2013;31(8):1788–93. PMID: 23141780. DOI: 10.1016/j.urolonc.2012.07.004.
- Peña C., Lathia C., Shan M. et al. Biomarkers predicting outcome in patients with advanced renal cell carcinoma: results from sorafenib phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. *Clin Cancer Res* 2010;16(19):4853–63. PMID: 20651059. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-3343.
- Tostain J., Li G., Gentil-Perret A., Gigante M. Carbonic anhydrase 9 in clear cell renal cell carcinoma: a marker for diagnosis, prognosis and treatment. *Eur J Cancer* 2010;46(18):3141–8. DOI: 10.1016/j.ejca.2010.07.020.
- Zhao Z., Liao G., Li Y. et al. Prognostic value of carbonic anhydrase IX immunohistochemical expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis of the literature. *PLoS One* 2014;9(11):e114096. PMID: 25426861. DOI: 10.1371/journal.pone.0114096.
- Горбань Н.А., Попов А.М., Карякин О.Б. Прогностическое значение экспрессии карбоангидразы 9 в сочетании с другими маркерами при светлоклеточном почечно-клеточном раке. *Онкоурология* 2016;12(3):40–4. [Gorban' N. A., Popov A.M., Karyakin O.B. Prognostic value of the expression of carbonic

- anhydrase 9 in combination with other markers in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2016; 12(3):40–4 (In Russ.]. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-40-44.
19. Dornbusch J., Zacharis A., Meinhardt M. et al. Analyses of potential predictive markers and survival data for a response to sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS One* 2013;8(9):e76386. PMID: 24086736. DOI: 10.1371/journal.pone.0076386.
 20. Gigante M., Li G., Ferlay C. et al. Prognostic value of serum CA9 in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma under targeted therapy. *Anticancer Res* 2012;32(12):5447–51. PMID: 23225450.
 21. Choueiri T.K., Regan M.M., Rosenberg J.E. et al. Carbonic anhydrase IX and pathological features as predictors of outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma receiving vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *BJU Int* 2010;106(6):772–8. PMID: 20230385. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09218.x.
 22. Stewart G.D., O'Mahony F.C., Laird A. et al. Carbonic anhydrase 9 expression increases with vascular endothelial growth factor – targeted therapy and is predictive of outcome in metastatic clear cell renal cancer. *Eur Urol* 2014;66(5):956–63. PMID: 24821582. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.04.007.
 23. Kondo K., Kim W.Y., Lechpammer M. et al. Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol* 2003;1(3):E83. PMID: 14691554. DOI: 10.1371/journal.pbio.0000083.
 24. Klatte T., Seligson D.B., Riggs S.B. et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha in clear cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(24):7388–93. PMID: 18094421. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0411.
 25. Lum J.J., Bui T., Gruber M. et al. The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes Dev* 2007;21(9):1037–49. PMID: 17437992. DOI: 10.1101/gad.1529107.
 26. Covelto K.L., Kehler J., Yu H. et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* 2006;20(5):557–70. PMID: 16510872. DOI: 10.1101/gad.1399906.
 27. Gordan J.D., Thompson C.B., Simon M.C. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* 2007;12(2):108–13. PMID: 17692803. DOI: 10.1016/j.ccr.2007.07.006.
 28. Kawata N., Nagane Y., Hirakata H. et al. Significant relationship of matrix metalloproteinase 9 with nuclear grade and prognostic impact of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 for incidental clear cell renal cell carcinoma. *Urology* 2007;69(6):1049–53. PMID: 17572184. DOI: 10.1016/j.urology.2007.02.044.
 29. Minardi D., Lucarini G., Santoni M. et al. Survival in patients with clear cell renal cell carcinoma is predicted by HIF-1 α expression. *Anticancer Res* 2015;35(1):433–8. PMID: 25550584.
 30. Patel P.H., Chadalavada R.S., Ishill N.M. et al. Hypoxia-inducible factor (HIF) 1a and 2a levels in cell lines and human tumor predicts response to sunitinib in renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol* 2008;26(15s):5008. PMID: 25550584. DOI:10.1200/jco.2008.26.15_suppl.5008.
 31. Harmon C.S., DePrimo S.E., Hutson T.E. et al. Circulating protein biomarkers of sunitinib and interferon- α efficacy in treatment-naive patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2014;73(1):151–61. PMID: 24220935. DOI: 10.1007/s00280-013-2333-4.
 32. Maroto P., Rini B. Molecular biomarkers in advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(8):2060–71. PMID: 24526734. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-1351.
 33. Frödin M., Mezheyeuski A., Corvigno S. et al. Perivascular PDGFR- β is an independent marker for prognosis in renal cell carcinoma. *Br J Cancer* 2017;116(2):195–201. PMID: 27931046. DOI:10.1038/bjc.2016.407.
 34. Garcia-Donas J., Leandro-García L.J., González Del Alba A. et al. Prospective study assessing hypoxia-related proteins as markers for the outcome of treatment with sunitinib in advanced clear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2013;24(9):2409–14. PMID: 23788753. DOI: 10.1093/annonc/mdt219.
 35. Cho N.H., Shim H.S., Rha S.Y. et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2003;44(5):560–6. PMID: 14572755. DOI:10.1016/s0302-2838(03)00362-2.
 36. Гранов А.М., Якубович Е.И., Евтушенко В.И. Биспецифическая протеинкиназа dusp9 как новый диагностический маркер рака почки и перспективы ее пользования для генотерапии. *Медицинский академический журнал* 2012;12(3):7–14. [Granov A.M., Yakubovich E.I., Evtushenko V.I. Bispecific protein kinase phosphatase dusp9 as a new biomarker for clear cell renal cell carcinoma and prospects for its utilising for gene therapy. *Medicinskij akademicheskij zhurnal = Med Academic J* 2012;12(3):7–14. (In Russ.].
 37. Golovastova M., Korolev D., Tsoy L. et al. Biomarkers of renal tumors: the current state and clinical perspectives. *Curr Urol Rep* 2017;18(1):3. PMID: 28110463. DOI: 10.1007/s11934-017-0655-1.
 38. Stenman U.H. Tumor-associated trypsin inhibitor. *Clin Chem* 2002;48(8):1206–9. PMID: 12142374.
 39. Xu Y., Li Q., Li X-Y. et al. Short-term anti-vascular endothelial growth factor treatment elicits vasculogenic mimicry formation of tumors to accelerate metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31(16):1–7. PMID: 22357313. DOI: 10.1186/1756-9966-31-16.
 40. Huang X., Zuo J. Emerging roles of miR-210 and other non-coding RNAs in the hypoxic response. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2014;46:220–32. PMID: 24395300. DOI: 10.1093/abbs/gmt141.
 41. Redova M., Poprach A., Besse A. et al. MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma. *Tumour Biol* 2013;34(1):481–91. PMID: 23150176. DOI: 10.1007/s13277-012-0573-2.
 42. Zhao A., Li G., Peoc'h M., Gigante M. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2013;94(1):115–20. PMID: 23064048. DOI: 10.1016/j.yexmp.2012.10.005.

ORCID авторов/ ORCID of authors

Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭРИТРОКАРИОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ ДИФФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

Н.Н. Тупицын¹, Чэн Цзяо^{1,2}, П.А. Зейналова^{1,2}

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

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

Контакты: Николай Николаевич Тупицын nntca@yahoo.com

Введение. Ранее работами лаборатории иммунологии гемопоэза были установлены типичные изменения гемопоэза у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ). Среди них особое внимание было обращено на нарастание пропорции оксифильных нормбластов, поскольку этот признак имел прогностическое значение.

Цель исследования – установление возможности идентификации более зрелой пропорции эритрокариоцитов проточно-цитометрическим методом.

Материалы и методы. Исследование проведено у 60 больных ДВКЛ. Увеличение пропорции оксифильных эритробластов отмечено в 50 случаях (83,3 %). Проточно-цитометрические исследования костного мозга проведены у 30 больных ДВКЛ. Использовали моноклональные антитела к гликофору А, CD45, CD36, CD117, CD71, CD105, CD34, HLA-DR, а также ядерные красители SYTO 16, SYTO 41.

Результаты. Использование гликофорина А в сочетании с одним из ядерных красителей и CD45 является эффективным для идентификации пула эритрокариоцитов. Основную фракцию составляют зрелые CD71+ гликофорин А+ клетки, которые не имеют характеристик клеток-предшественников. Во фракции CD45-негативных клеточных элементов присутствуют клетки CD71-гликофорин А-, которые представлены предшественниками – CD34+ CD117+ HLA-DR+/- . На эритрокариоцитах со слабой экспрессией гликофорина А и выраженной экспрессией CD71 (коммитированных по эритроидной дифференцировке) в незначительном количестве присутствуют только антигены CD117 и HLA-DR, а CD34 полностью отсутствует. Наиболее информативным для характеристики более зрелой популяции эритрокариоцитов оказался подход, основанный на идентификации пула эритрокариоцитов по экспрессии CD36 с низкими характеристиками SSC (в этом случае гликофорин А, CD45 и ядерные красители можно не использовать, так как CD36 не взаимодействует с эритроцитами). После достижения пика экспрессии уровни CD36, CD71, CD105 снижаются. Именно эта фракция представляет собой наиболее зрелые эритрокариоциты. Корреляция процентного содержания этих клеток с выявляемыми морфологически оксифильными нормбластами близка к достоверной.

Заключение. Установлено, что наиболее зрелую фракцию эритрокариоцитов целесообразно проточно-цитометрически устанавливать на основании следующих характеристик: SSC^{low} CD71^{low} CD105^{low} CD36^{+/low}.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома, эритропоэз, проточная цитометрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-52-57

IMMUNOPHENOTYPIC STUDY OF BONE MARROW ERYTHROKARYOCYTE DIFFERENTIATION IN PATIENTS WITH DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

N.N. Tupitsyn¹, Cheng Jiao^{1, 2}, P.A. Zeynalova^{1, 2}

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia;

²Sechenov University; 2 build., 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

Introduction. Previously we've shown that there are typical changes in haematopoiesis in diffuse large B-cell lymphoma patients (DLBCL). Attention was paid to the elevation of oxyphilic erythroblasts, as this sign was of prognostic significance. The aim of this work was to see if there is possible to identify bone marrow erythrocyte maturation stages using flow cytometry method.

Materials and methods. Study was done in 60 DLBCL patients. Elevation of oxyphilic erythroblast levels was noted in 50 patients (83,3 %). Flow cytometric study of bone marrow were done in 30 patients. We used monoclonal antibodies to Glycophorin A, CD45, CD36, CD117, CD71, CD105, CD34, HLA-DR, as well as nuclear staining for SYTO 16, SYTO 41.

Results. Use of Glycophorin A together with of SYTO 16 or SYTO 41 is effective for identification of erythrocytes, main proportion of which is represented by CD71+ and Glycophorin A+ cells, which does not express any precursor markers. In CD45-negative cellular

elements there are as well CD71- glycoporphin A- cells, which represents mainly precursors – CD34+ CD117+ HLA-DR+/- . Erythrocytes with low levels of glycoporphin A expression and prominent expression of CD71 (committed to erythroid differentiation) show slight expresiion of CD117 and HLA-DR, but CD34 is completely absent. The informative method for characterization of most mature erythrocytes was the approach based on identification of erythrocytes according to CD36 expression on cels with low SSC (in that case usage of nuclear stain, CD45 and glycoporphin A may be omitted as CD36 does not stain erythrocytes). After peak of CD36, CD71, CD105 expression levels of these antigens are declining. Namely that fraction represents most mature erythrocytes. Correlation of the percentages of that cells with oxyphilic normoblasts (identified morphologically) was near to significant value.

Conclusion. We proved that the most mature erythrocyte fraction may be identified by flow cytometry based on the following parameters – $SSC^{low} CD71^{low} CD105^{low} CD36^{+/low}$.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma, eruthropoiesis, flow cytometry

Введение

Эритроидная дифференцировка происходит в костном мозге и включает 4 основных типа морфологически идентифицируемых клеток – пронормобласты, нормобласты базофильные, нормобласты полихроматофильные и нормобласты оксифильные. Преобладающим типом среди этих форм являются полихроматофилы, и типичная кривая эритрокариобластической дифференцировки выглядит следующим образом (рис. 1), а при патологических состояниях характер кривой может изменяться, как показано на схеме [1].

В ряде предшествующих работ нами было отмечено, что характер эритроблостограммы при раке, диффузной В-крупноклеточной и фолликулярной лимфомах имеет однотипные изменения. Они заключаются в возрастании процента клеток терминальной эритрокариоцитарной дифференцировки – оксифильных нормобластов, относительное содержание которых может превышать уровни полихроматофильных нормобластов, и кривая созревания этих клеток становится похожей на таковую при гемолитической анемии [2–6].

Учитывая тот факт, что морфологически определяются лишь основные дискретные стадии эритро-

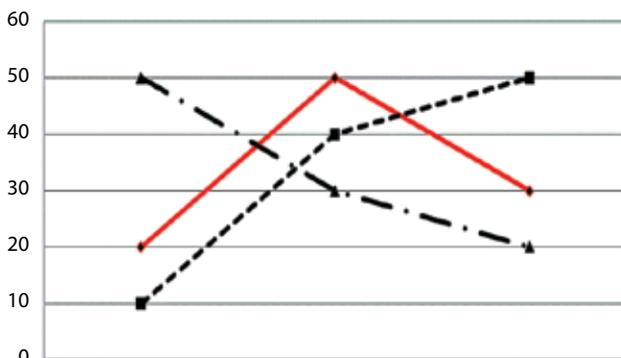


Рис. 1. Взаимоотношения между различными морфологически распознаваемыми клеточными типами в костном мозге в норме и при патологических состояниях. Кривая красного цвета – нормальная дифференцировка. Пунктирная линия – гемолитическая анемия, штрих-пунктир – железodefицитная анемия

поэза, а в действительности этот процесс носит непрерывный характер, мы предприняли попытку иммунофенотипической характеристики эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ). Выбор нозологической формы был не случаен, так как именно в этом случае нарастание уровней оксифильных нормобластов ассоциировалось с неблагоприятным прогнозом [2].

Следует отметить, что к настоящему времени получен целый ряд моноклональных антител к эритрокариоцитам и сформированы панели для установления их степени зрелости ЕвроФлоу [7].

Анализ миелограмм, проведенный нами у 60 больных ДВКЛ, показал, что нарастание пропорции оксифильных нормобластов отмечается в 83,3 % случаев. Предложены иммунофенотипические подходы для идентификации эритрокариоцитов различной степени зрелости.

Материалы и методы

Исследование проведено у 60 больных ДВКЛ. Диагноз заболевания был во всех случаях установлен в соответствии с классификацией опухолей кроветворной и лимфоидной тканей 2008 г. [8]. Установление стадии заболевания проводили согласно общепринятым критериям [9].

Изучение гемопоэза проводили на основании анализа миелограмм, использовали нормы, принятые в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Проточно-цитометрические исследования проводили на проточном цитометре FACS CANTO II (Becton Dickinson, США). Применяли панель моноклональных антител, рекомендованную консорциумом ЕвроФлоу для диагностики вариантов острых эритробластных лейкозов с включением ряда дополнительных маркеров: гликофорин А, CD36, CD105, CD71, HLA-DR, CD33, CD117, CD123, CD45.

Анализ проточно-цитометрических данных проводили с использованием программы FCS express v. 3.

Результаты

При анализе 60 миелограмм больных ДВКЛ изменения эритроидной дифференцировки с увеличением пропорции оксифильных нормобластов отмечены в 50 (83,3 %) случаях.

С целью дальнейшей объективизации морфологической идентификации эритрокариоцитов мы предприняли попытку охарактеризовать стадии дифференцировки эритрокариоцитов в костном мозге больных ДВКЛ проточно-цитометрически.

С этой целью были проанализированы различные методы идентификации эритрокариоцитов.

Большинство эритрокариоцитов в костном мозге человека являются CD45-негативными, и лишь немногочисленные наиболее ранние формы слабо экспрессируют CD45.

Специфическим маркером клеток эритроидного ряда является гликофорин А, присутствующий на всех ядросодержащих эритроидных клетках костного мозга. Мы в первую очередь стремились охарактеризовать именно ядросодержащие эритроидные формы с тем, чтобы иметь возможность сопоставить полученные данные с результатами морфологического исследования костного мозга. С этой целью оценили возможность использования ядерных красителей SYTO 16 и SYTO 41.

Весьма специфичный для клеток эритроидного ряда — трансферриновый рецептор (CD71), который появляется раньше гликофорина А на эритроидных предшественниках и утрачивается на ретикулоцитах и эритроцитах.

Ранние предшественники эритроидных клеток могут характеризоваться экспрессией CD34, CD117, HLA-DR.

В последнее время распространенным подходом к характеристике эритрокариоцитов является использование CD36 (в отличие от гликофорина отсутствует на эритроцитах) и CD105.

Общелейкоцитарный антиген CD45 — обязательный маркер, включаемый во все пробы при характеристике эритропоэза. Это обусловлено тем, что на эритроидных предшественниках экспрессия антигена практически отсутствует, что является отличительной чертой от неэритроидных клеток с низкими характеристиками бокового светорассеяния (лимфоцитов и др.).

Для анализа популяции эритроидных предшественников использовали подход, проиллюстрированный на рис. 2: выделяли гейт SYTO16-позитивных клеток (рис. 2а), далее в пределах этих клеток выделяли гликофорин А-позитивные клетки (рис. 2б), далее выделяли CD45-негативные клеточные элементы (рис. 2в) и объединяли эти 3 гейта (рис. 2г).

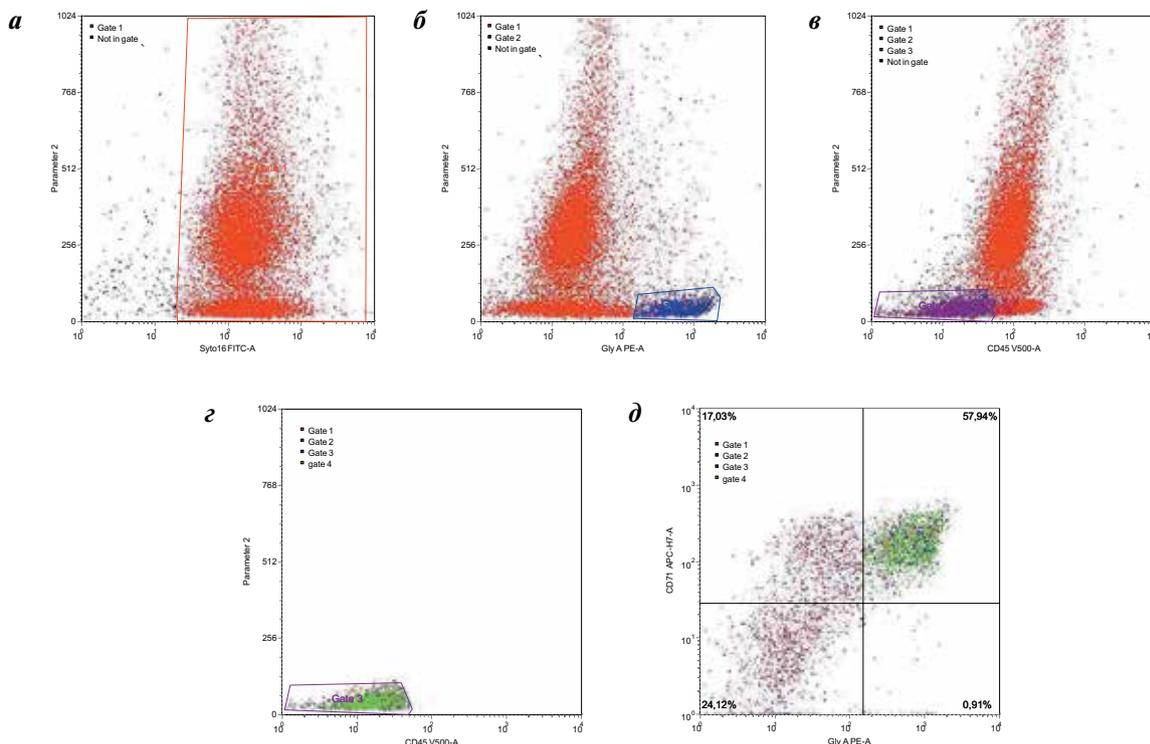


Рис. 2. Идентификация эритрокариоцитов проточно-цитометрическим методом: а — выделение гейта ядросодержащих клеток на основании окрашивания нуклеотропным красителем SYTO 16; б — выделение гейта гликофорин-А-позитивных клеток; в — выделение гейта CD45-негативных клеток; г — клетки в итоговом гейте, соответствующие 3 объединенным гейтам — SYTO 16 + гликофорин А + CD45—; д — взаимосвязь между клетками, экспрессирующими трансферриновый рецептор CD71 и экспрессирующими гликофорин А, в CD45-негативном гейте

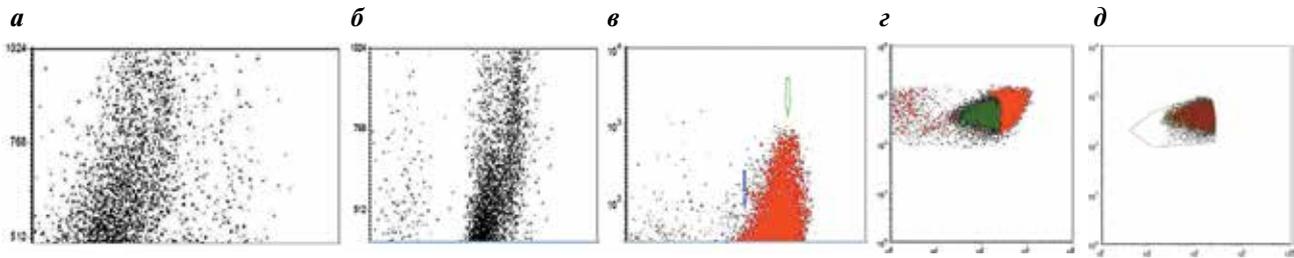


Рис. 3. Идентификация наиболее зрелых эритрокариоцитов в костном мозге больных ДВКЛ: а – выделение гейта CD36-позитивных клеток с низкими характеристиками SSC; б – CD36-позитивные клетки с низкими характеристиками SSC (все являются CD45-негативными); в – 2 популяции CD105- и CD71-позитивных клеток; г – CD105^{low} и CD71^{low} клетки, более слабо экспрессирующие CD36; д – итоговый гейт CD36^{low} SSC^{low} CD71^{low} CD105^{low} клеток, соответствующих наиболее дифференцированным эритрокариоцитам

В гейте CD45-негативных клеток у больных ДВКЛ взаимосвязь между антигенами CD71 и гликофорином А полностью соответствует таковой, описываемой в литературе для нормальной дифференцировки эритрокариоцитов (рис. 2д). Вместе с тем очевидно, что гейт можно распространить на клетки, слабо экспрессирующие гликофорин А.

Охарактеризовали иммунофенотипически клетки, попадающие в каждый из квадрантов (см. рис. 2д). В квадранте, соответствующем иммунофенотипу CD71-GlyA-, отмечается экспрессия маркеров ранних предшественников гемопоэза – CD34, CD117, HLA-DR. В квадранте CD71+ GlyA слабо+, т. е. на коммитированных по эритроидной дифференцировке клетках (CD71+ GlyA+/-), в незначительном количестве присутствуют только антигены CD117 и HLA-DR, а CD34 полностью отсутствует. И наконец, в квадранте CD71+ GlyA+ (доминирующая популяция клеток) маркеры клеток-предшественников отсутствуют, что свойственно морфологически распознаваемым эритроидным клеткам.

Представленный подход позволяет суммарно охарактеризовать эритроидный росток костного мозга, но не позволяет дифференцировать клетки в пределах основной популяции CD71+ гликофорин А+.

Интересные возможности открывает использование маркера CD36 для идентификации эритрокариоцитов. Преимущества этого маркера перед гликофорином А состоят в том, что CD36 не экспрессирован на эритроцитах и, таким образом, исключается необходимость использования ядерных красителей. На рис. 3а показана экспрессия CD36 на клетках с низким боковым светорассеянием (SSC). Все эти клетки являются CD45-негативными (рис. 3б). Сопоставление количества эритрокариоцитов, выявляемых на основании экспрессии в пределах популяции клеток SSC^{low} CD36+ клеток и CD36+CD45-клеток, выявило высокодостоверную корреляцию между ними – $R = 0,993$; $p = 0,000$; $n = 16$, т. е. наблюдается практически полное совпадение результатов. Это послужило доказательством того, что CD45 можно не использовать и ограничить-

ся маркером CD36 для идентификации эритрокариоцитов костного мозга.

Дальнейший анализ возможностей дифференциальной диагностики клеток проведен в пределах основной популяции эритрокариоцитов – CD71+CD36+. Использование маркеров CD105 и CD71 позволяет установить 2 популяции этих клеток – с более яркой экспрессией CD71 и CD105 и с более слабой экспрессией этих антигенов (рис. 3в). Более слабой экспрессии антигенов соответствует более зрелая популяция эритрокариоцитов, так как после достижения пика экспрессии CD71 и CD105 дальнейшая дифференцировка клеток сопровождается угасанием экспрессии этих антигенов.

Как видно на рис. 3г, выделение гейта клеток с более слабой экспрессией CD71 и CD105 и окрашивание этих клеток в пределах всего пула CD36-позитивных эритрокариоцитов свидетельствует о более слабой экспрессии CD36 на CD105^{low}, CD71^{low} клеточных элементах. Это тоже важный признак наиболее зрелой фракции эритрокариоцитов. Итоговый гейт при объединении всех 3 гейтов – CD36+, CD105^{low} и CD71^{low} – в пределах CD36+ и CD36^{low} представлен на рис. 3д. Согласно современным взглядам на дифференцировку эритрокариоцитов (рис. 4) именно клетки в этом гейте соответствуют наиболее зрелой фракции эритрокариоцитов, т. е., по-видимому, наиболее близки оксифильным нормобластам.

При проведении корреляционного анализа процентного содержания этих клеток с более зрелыми морфологически выделяемыми формами эритрокариоцитов у 15 больных ДВКЛ не отмечено абсолютно никакой связи с полихроматофильными нормобластами ($R = 0,06$; $p = 0,83$; $n = 15$) и суммарным содержанием клеток эритроидного ряда ($R = 0,367$; $p = 0,178$; $n = 15$). Имелась определенная взаимосвязь с оксифильными нормобластами ($R = 0,43$, $n = 15$), однако она не была достоверной ($p = 0,11$).

Следует отметить, что полного совпадения данных проточной цитометрии с данными морфологического исследования практически никогда не наблюдается и с другими клеточными типами (лимфоциты,

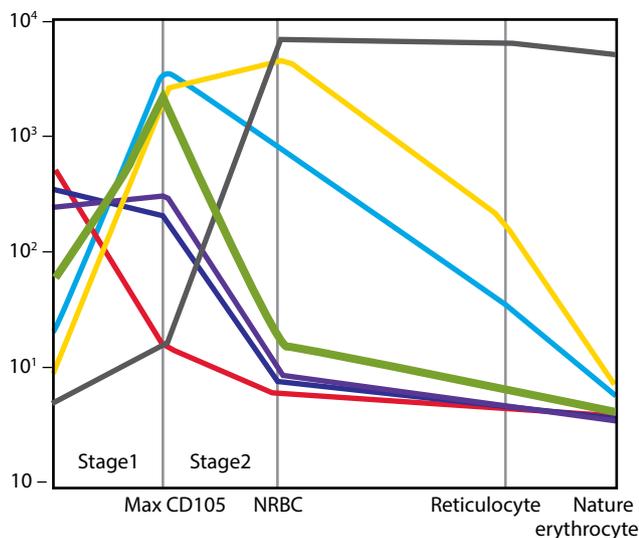


Рис. 4. Этапы дифференцировки эритрокариоцитов на основании изменения их антигенного состава (по McGrath K.E. et al. [10])

бласты, плазматические клетки и т. д.) — это разные методы. Тем не менее выделение наиболее зрелой фракции эритрокариоцитов на основании мембранного иммунофенотипа представляется серьезным дополнением к морфологии в оценке степени зрелости ядросодержащих эритроидных клеток костного мозга в норме и при патологии.

Таким образом, в работе мы использовали наряду с традиционными также самые современные подходы для идентификации эритрокариоцитов и установления степени их дифференцировки. Эти современные подходы впервые были предложены Европейским консорциумом Еврофлоу и опубликованы в журнале *Leukemia* в 2012 г. В основу положен принцип многоцветной проточной цитофлуориметрии, используемый для диагностики эритробластных лейкозов.

Мы оценили возможность использования гликофорина А наряду с ядерными красителями для выделения пула эритроидных клеток и его дальнейшей детализации (ядерные красители необходимы, так как гликофорин А экспрессирован помимо эритрокариоцитов также и на эритроцитах). Использован целый ряд наиболее информативных характеристик эритроидной дифференцировки: маркеры незрелых клеток — слабая экспрессия CD45, наличие на мем-

бране антигенов CD34, CD117, HLA-DR; наиболее типичные для эритрокариоцитов антигены гликофорин А, трансферриновый рецептор CD71, антигены CD105 и CD36.

Отработана методика идентификации эритрокариоцитов на основании гликофорина А, слабой экспрессии CD45, наряду с ядерными красителями SYTO16, SYTO 43. Установлены изменения экспрессии антигенов ранних этапов дифференцировки эритрокариоцитов в координатах гликофорин А/CD71.

Наиболее плодотворным оказался подход, основанный на использовании маркера CD36 для идентификации всего пула эритроидных предшественников среди клеток с низкими характеристиками светорассеяния SSC. Как оказалось, практически все эти клетки имели низкие уровни экспрессии CD45, так что использование данного маркера (CD45) можно было исключить. Снижение уровней экспрессии CD105 и CD71 в гейте клеток CD36⁺ SSC^{low} характеризует наиболее зрелую популяцию эритрокариоцитов. Интересно отметить, что уровни экспрессии CD36 на этих клетках также были более низкими. Таким образом, идентификация наиболее зрелой клеточной популяции эритрокариоцитов — CD36^{low} SSC^{low} CD71^{low} CD105^{low} — целесообразна для установления степени дифференцировки эритрокариоцитов. Именно эта фракция в большей степени коррелировала с морфологически распознаваемыми оксифильными нормобластами.

Проведенные исследования важны для более детального понимания процессов дифференцировки эритрокариоцитов у больных ДВКЛ, так как изменения созревания, заключающиеся в накоплении оксифильных нормобластов, находят отражение в клиническом течении и прогнозе пациентов.

Заключение

В статье изучены различные методы идентификации пула эритрокариоцитов костного мозга и установлено, что для изучения субпопуляционного состава доминирующей фракции эритрокариоцитов (гликофорин А⁺ CD71⁺) целесообразно использовать маркеры CD36, CD71, CD105 наряду с характеристиками бокового светорассеяния SSC.

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

1. Владимирская Е.Б. Основы кроветворения. В кн.: Гериатрическая гематология. Под ред. Л.Д. Гриншпун, А.В. Пивник. М.: Медиум, 2011. С. 21–44. [Vladimirskaya E.B. Fundamentals of hematoipoiesis. In the book: Geriatric hematology. Ed. by L.D. Grinshpun, A.V. Pivnik. M.: Medium, 2011. Pp. 21–44. (In Russ.)].
2. Тупицын Н.Н., Зейналова П.А., Френкель М.А., Османов Е.А. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2015;1:72–7. [Tupitsyn N.N., Zeinalova P.A., Frenkel M.A., Osmanov E.A. The role of the bone marrow in the prognosis of diffuse B-large cell lymphoma. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii* = Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry 2015;1:72–7. (In Russ.)].
3. Фалалеева Н.А., Моженкова А.В., Османов Е.А. и др. Особенности эритропоэза больных фолликулярной лимфомой. Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» 2016;3:34–7. [Falaleeva N.A., Mozhenkova A.V., Osmanov E.A. et al. Peculiarities of erythropoiesis in patients with follicular lymphoma. *Vestnik FGBU "RONC im. N.N. Blokhin"* = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 2016;3:34–7. (In Russ.)].
4. Зейналова П.А., Шолохова Е.Н., Френкель М.А. и др. Взаимосвязь иммунофенотипа диффузной В-крупноклеточной лимфомы с особенностями кроветворения у больных. Технологии живых систем 2015;1:63–8. [Zeinalova P.A., Sholokhova E.N., Frenkel M.A. et al. Interrelation of immunophenotype of diffuse B-large cell lymphoma with features of hematopoiesis in patients. *Tekhnologii zhivyh sistem* = Technologies of living systems 2015;1:63–8. (In Russ.)].
5. Тимонина Е.Г., Френкель М.А., Колбачкая О.П., Подвязников С.О. Характеристика гемопоэза у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2009;20 (3):75–81. [Timonina E.G., Frenkel M.A., Kolbatskaya O.P., Podviaznikov S.O. Characterization of hemopoiesis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhin RAMN* = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center 2009;20(3):75–81. (In Russ.)].
6. Френкель М.А. Исследование костного мозга в онкологии. Иммунология гемопоэза 2014;12(1–2):18–41. [Frenkel M.A. Study of bone marrow in oncology. *Immunologiya gemopoezha* = Immunology of hemopoiesis 2014;12(1–2):18–41. (In Russ.)].
7. van Dongen J.J. M., Lhermitte L., Bottcher S. et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia* 2012;26:1908–75. PMID: 22552007. DOI: 10.1038/leu.2012.120.
8. Stein H., Warnke R.A., Chan W.C. et al. Diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Eds. S.H. Swerdlow, E. Campo, N.L. Harris et al.). Lyon, France: IARC Press, 2008. Pp. 233–237.
9. Cheson B.D., Fisher R.I., Barrington S.F. et al. Recommendation for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: The Lugano Classification. *J Clin Oncol* 2014;32:3059–67. PMID: 25113753. DOI: 10.1200/JCO.2013.54.8800.
10. McGrath K.E., Catherman S.C., Palis J. et al. Delineating stages of erythropoiesis using imaging flow cytometry. *Methods* 2017;112:68–74. PMID: 27582124. DOI: 10.1016/j.ymeth.2016.08.012.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.Н. Тупицын/N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Цзяо Чэн/Cheng Jiao: <https://orcid.org/0000-0002-9916-1992>

П.А. Зейналова/P.A. Zeinalova: <https://orcid.org/0000-0003-1564-424X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ПРОГНОСТИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА МИЕЛОГРАММЫ У БОЛЬНЫХ ДИФФУЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ

Чэн Цзяо^{1,2}, П.А. Зейналова^{1,2}

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

²ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Чэн Цзяо verajoe@mail.ru

Введение. Увеличение процентного содержания бластных клеток в миелограмме больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой (ДВКЛ) является прогностически неблагоприятным фактором. В работе оценена частота данного явления у 60 больных ДВКЛ и предпринята попытка анализа возможности выявления минимального поражения костного мозга различными проточно-цитометрическими методами.

Материалы и методы. Исследование проведено у 60 больных ДВКЛ. Диагноз во всех случаях установлен на основании критериев классификации ВОЗ. Исследование костного мозга проводилось на основании мазков пунктатов (миелограмма). Иммунофенотипические исследования включали широкую панель моноклональных антител к В-линейным антигенам CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD45, а также каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов.

Результаты. Увеличение процентного содержания бластных клеток в костном мозге больных ДВКЛ установлено в 73,3 % случаев. Эта группа пациентов имела более низкие показатели выживаемости. Использованы следующие методы идентификации моноклональных В-лимфоцитов костного мозга: анализ мембранных каппа- и лямбда-цепей иммуноглобулинов в пределах CD19+ клеток, в пределах зрелых CD45++ CD20+ лимфоцитов, в пределах CD5-негативных зрелых CD20+CD45++ лимфоцитов. Анализ уровней экспрессии различных дифференцировочных антигенов зрелых В-клеток – CD20, CD21, CD22, CD24. Установлено, что в пределах зрелых В-лимфоцитов костного мозга присутствует пропорция CD21-негативных клеток.

Заключение. Наиболее информативными методами установления минимального поражения костного мозга при ДВКЛ являются оценка клональности по каппа- и лямбда-цепям мембранных иммуноглобулинов зрелых В-лимфоцитов (CD45++ CD20+CD5–), а также установление aberrантности зрелых В-лимфоцитов по экспрессии CD21.

Ключевые слова: диффузная В-крупноклеточная лимфома, поражение костного мозга, бластные клетки

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-58-63

PROGNOSTICALLY SIGNIFICANT BONE MARROW CELLULAR CONTENT CHANGES IN DIFFUSE LARGE B-CELL LYMPHOMA

Cheng Jiao^{1,2}, P.A. Zeynalova^{1,2}

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia;

²Sechenov University; 2 build., 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

Introduction. Increasing of blast cell percentage in bone marrow of diffuse large B-cell lymphoma patients is a sign of unfavourable prognosis. We estimated the frequency of this phenomenon and made attempts to identify minimal bone marrow involvement in DLBCL by flow cytometry.

Materials and methods. Study has been done in 60 DLBCL patients. Diagnosis in all cases was done according to WHO (2008) criteria. Bone marrow study was done on smears (myelogram). Immunophenotypic study was done with a large panel of B-lineage monoclonal antibodies as well as kappa and lambda light chains to membrane immunoglobulins.

Results. Increase in blast cell content in bone marrow was noted in 73.3 % of DLBCL patients. That group of patients had lower survival. We used the following methods for identification of monoclonal B-lymphocytes: monoclonality according to membrane light immunoglobuline chains within mature B-lymphocytes and aberrancy of immunophenotype. Levels of different B-cell antigen expression – CD20, CD21, CD22, CD24. It was identified B-lymphocytes with aberrant expression of CD21.

Conclusion. The most informative methods of identification of minimal bone marrow involvement in DLBCL are estimation of clonality according to light chain expression of mature B-lymphocytes (CD45++CD20+CD5–), as well as assesment of aberrancy of CD21 expression of mature B-lymphocytes.

Key words: diffuse large B-cell lymphoma, bone marrow involvement, blast cells

Введение

Прогностические факторы при диффузной В-крупноклеточной лимфоме (ДВКЛ) могут быть разделены на относящиеся к пациенту (возраст, статус по шкале Карновского) и факторы, относящиеся собственно к опухоли (стадия, опухолевая нагрузка, пролиферирующая фракция, наличие экстранодального поражения). Сывороточные уровни лактатдегидрогеназы, уровни $\beta 2$ -микроглобулина, пролиферирующая фракция являются индикаторами агрессивности заболевания. Важную роль в прогнозе ДВКЛ играет терапевтическая тактика, применяемая у больных. Международный прогностический индекс (IPI) и скорректированный для возраста прогностический индекс (aaIPI) разработаны как модели предсказания исходов на основе клинических факторов при оценке прогноза более чем у 4000 больных [1].

Поражение костного мозга является неблагоприятным фактором прогноза ДВКЛ. Общепринятая точка зрения состоит в том, что конкордантное вовлечение костного мозга при ДВКЛ существенно ухудшает прогноз (5-летняя общая выживаемость в этих случаях составляет 10 %), что не зависит от групп риска в соответствии с IPI [2].

В наших предшествующих работах было показано, что изменения состава миелограммы у больных ДВКЛ в ряде случаев имеют прогностическое значение [3, 4]. В числе причин этого прогностически неблагоприятного явления может быть минимальное поражение костного мозга при ДВКЛ, не улавливаемое морфологическими методами.

В настоящей работе мы проанализировали частоту повышения процентного содержания бластных

клеток в костном мозге больных ДВКЛ, а также проанализировали различные подходы к установлению минимального поражения костного мозга, основанные на оценке клональности зрелых В-лимфоцитов и аберрантности их иммунофенотипа в сравнении с обычными В-клетками.

Материалы и методы

Исследование проведено у 60 больных ДВКЛ. Диагноз во всех случаях установлен на основании критериев классификации ВОЗ (2008) [5].

У всех больных проведен подсчет миелограмм двумя специалистами-гематоцитологами.

Иммунологические исследования проведены методом проточной цитометрии на приборе FACS CAN-TO II (Becton Dickinson, США). Использовали панель антител к антигенам В-лимфоцитов – CD19, CD20, CD21, CD24, а также к общелейкоцитарному антигену CD45, каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов.

Результаты

Прогностически значимыми оказались следующие показатели миелограммы: повышение процента бластных клеток (значимость близка к достоверной), снижение процента нейтрофильных гранулоцитов, повышение процента оксифильных нормобластов.

Снижение процентного содержания нейтрофильных гранулоцитов имело достоверную связь с поздними стадиями ДВКЛ. Прогностическая роль увеличения оксифильных нормобластов рассмотрена нами в отдельных публикациях.

В настоящей статье мы остановимся на увеличении процента бластных клеток в костном мозге больных ДВКЛ, возможных причинах этого явления и проточно-цитометрических подходах к диагностике минимального поражения костного мозга при ДВКЛ.

Увеличение процентного содержания бластных клеток в миелограмме отмечено у 73,3 % больных ДВКЛ. Больные с содержанием бластных клеток 1 % и выше имели худшие показатели выживаемости ($p = 0,172$) (рис. 1), что подтверждает наши более ранние наблюдения.

Одной из причин повышения уровня бластов может быть наличие в костном мозге пациентов единичных опухолевых клеток ДВКЛ, которые на морфологическом уровне трудно отличимы от бластных клеток.

Вопрос диагностики минимального поражения костного мозга при ДВКЛ проточно-цитометрическим методом актуален, так как хорошо известно, что вовлечение в процесс костного мозга существенно ухудшает прогноз заболевания.

Для детального изучения В-клеточного звена костного мозга методом проточной цитометрии нами использованы 3 пробы (табл. 1).

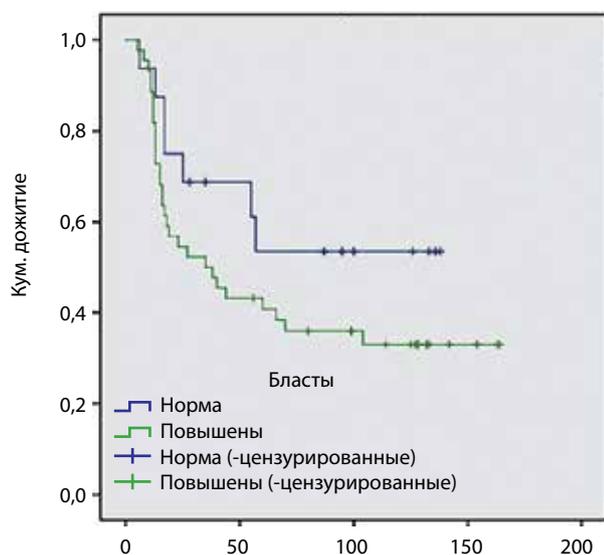


Рис. 1. Кривые общей выживаемости в группах больных ДВКЛ с нормальным и повышенным ($\geq 1\%$) содержанием бластных клеток в миелограмме

Таблица 1. Панель моноклональных антител для изучения субпопуляций В-клеток костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой

№ пробы	V450	V500	FITC	PE	PE-Cy5	PE-Cy7	APC	APC-H7
1	CD21	CD45	CD9	CD30	CD19	-	CD22	CD38
2	-	-	CD45	CD20	CD19	CD10	CD5	CD24
3	-	-	kappa	lambda	CD19	-	-	-

Необходимо было оценить возможность определения клональности В-лимфоцитов костного мозга у больных ДВКЛ. Следует отметить, что в стандартной постановке иммунологических реакций (см. табл. 1) мы использовали конъюгат антител к каппа-цепям иммуноглобулинов человека, меченный флуоресцеин-изотиоцианатом (FITC), а к лямбда-цепям – фикоэритрином (PE). Простое использование этих конъюгатов в сочетании с антителами к В-клеткам (CD19), как правило, малоинформативно. Это обусловлено тем, что наряду со зрелыми В-лимфоцитами в костном мозге присутствует выраженная пропорция В-линейных предшественников, негативных в отношении мембранных иммуноглобулинов. В этих случаях оценка клональности в пределах популяции CD19+ лимфоцитов представляется сложной ввиду разбавления В-клеток В-линейными предшественниками.

По этой причине целесообразно включение в панель определения клональности В-лимфоцитов маркеров, отражающих зрелость лимфоидных клеток. Мы использовали антитела к CD45 (позволяют исключить из анализа клетки-предшественники на основании более слабой экспрессии на них антигена) и CD20 (мембранный CD20 экспрессирован на всех зрелых В-клетках и лишь на небольшой пропорции предшественников). Сочетание этих 2 маркеров на мембране клетки характерно для зрелых В-лимфоцитов. Используемые антитела и флуорохромы представлены в табл. 2.

Таблица 2. Панель моноклональных антител, использованная для оценки моноклональности зрелых В-клеток костного мозга больных ДВКЛ

№ пробы	V450	V500	FITC	PE
1	CD20	CD45	Каппа	Лямбда

Данное сочетание антигенов (CD45, CD20, каппа-цепи, лямбда-цепи) использовано при исследовании В-лимфоцитов костного мозга 6 больных ДВКЛ.

Приводим примеры различных вариантов экспрессии каппа- и лямбда-цепей на В-лимфоцитах костного мозга больных ДВКЛ.

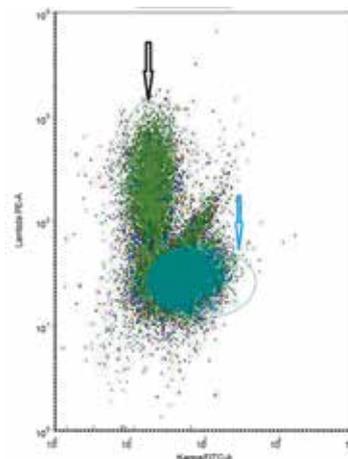


Рис. 2. Экспрессия каппа- и лямбда-полипептидных цепей иммуноглобулинов на зрелых В-лимфоцитах (CD45+CD20+) костного мозга больного ДВКЛ. Лямбда-цепи присутствуют на 22,4 % В-лимфоцитов (овал показан черной стрелкой), каппа-цепи – на 55,3 % клеток (показано голубой стрелкой). Реакция поликлональна

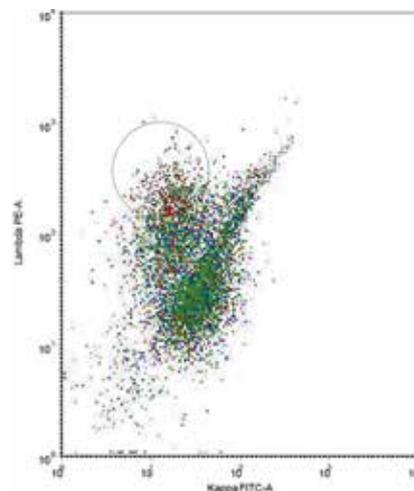


Рис. 3. Тенденция к моноклональности легких цепей иммуноглобулинов по лямбда-типу. Часть клеток имеют выраженную экспрессию (++) лямбда-цепей (обведены овалом). Видно, что в пределах этих клеток присутствует отчетливая пропорция крупных клеток, как показано на рис. 4

Пример поликлональной реакции представлен на рис. 2.

Следующий пример (рис. 3) иллюстрирует В-лимфоциты с наличием явной тенденции к моноклональности по лямбда-цепям мембранных

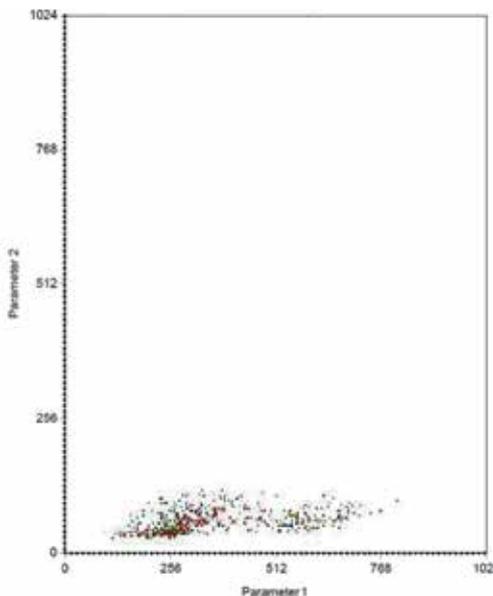


Рис. 4. Характеристики светорассеяния В-клеток костного мозга больной ДВКЛ. Видно, что в пределах клеток, гиперэкспрессирующих лямбда-цепи (обведены овалом на рис. 3) присутствует пропорция крупных клеток с большими значениями параметра 1 (соответствует FSC – прямому рассеянию света лазерного луча)

иммуноглобулинов. На рисунке овалом обведены клетки, гиперэкспрессирующие мембранные лямбда-цепи иммуноглобулинов. На рис. 4 показано, что в пределах клеток, гиперэкспрессирующих лямбда-цепи, присутствует пропорция крупных клеток.

Другой подход для оценки клональности В-клеток был применен с целью выявления минимального количества В-лимфоцитов с периферическим иммунофенотипом (CD45+ CD20+ CD5-), моноклональность по каппа- или лямбда-легким полипептидным цепям иммуноглобулинов. В этом случае для оценки клональности мы применили антитела, меченные APC-H7 и APC (табл. 3).

Таблица 3. Панель моноклональных антител для оценки моноклональности зрелых CD5-негативных В-лимфоцитов костного мозга

№ пробы	V500	FITC	PE	APC	APC-H7
1	CD45	CD5	CD20	Каппа	Лямбда

Подобный подход был реализован у 7 больных ДВКЛ и оказался весьма успешным. Последовательность гейтирования была такова: CD45++ лимфоидные клетки (низкое SSC), CD20+ В-лимфоциты, CD5+ В-лимфоциты. Далее берем гейт CD5-негативных лимфоцитов, в котором присутствуют зрелые В-клетки – CD20+CD45++ CD5-. В этом гейте оцениваем клональность В-клеток по каппа- или лямбда-полипептидным цепям иммуноглобулинов. Из 7 случаев лишь в 1 не удалось оценить клональ-

ность (неспецифическое связывание антител к каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов); в 1 случае содержание В-клеток в костном мозге (CD20+) было очень малым – 0,57 %. В 3 случаях установлена клональность, в 2 случаях анализируемые В-клетки были поликлональны.

На рис. 5 приведен пример поликлональности В-клеток костного мозга у больных ДВКЛ.

Представленные данные убедительно свидетельствуют о возможности оценки клональности В-клеток костного мозга у больных ДВКЛ.

Общая панель для исследования В-лимфоцитов (см. табл. 1) позволяет подробно оценить маркеры В-клеток в целом (CD19), их более зрелые формы (CD20); антигены, присутствующие практически на всех периферических В-клетках (CD21, CD22, CD24), клональность по экспрессии каппа- и лямбда-цепей, дополнительные и активационные маркеры (CD10, CD5, CD38, CD9), а также уровень зрелости клеток на основании экспрессии общелейкоцитарного антигена CD45.

Маркер CD19. Среднее содержание зрелых В-лимфоцитов в костном мозге больных ДВКЛ среди CD45+ лимфоцитов составило $8,4 \pm 1,4$ % (диапазон от 0,8 до 22,8). Уровень CD22+ лимфоцитов в целом по группе больных ДВКЛ – $9,1 \pm 1,6$ % (0,17–23,0 %), уровни CD20 – $8,3 \pm 1,4$ % (0,04–22,0 %), содержание CD24+ в целом по группе – $7,2 \pm 1,6$ % (0,06–22,1 %).

При оценке экспрессии антигена CD24 гейтирования по CD45 было недостаточно (перекрест с Т-клетками), поэтому использовали в CD45+-гейте оси CD19 и CD24. Практически все CD19+ клетки были CD24-позитивны. Количество CD21+ лимфоцитов в целом по группе – $6,6 \pm 1,7$ % (0,08–22,9 %).

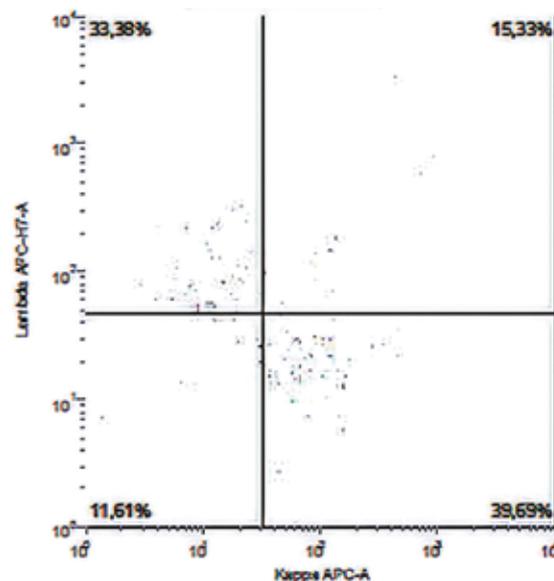


Рис. 5. Пример поликлональной популяции CD45++CD20+CD5- В-лимфоцитов костного мозга у больного ДВКЛ

На большинстве зрелых В-клеток костного мозга (CD45+) присутствовали практически все пан-В-клеточные антигены. Клональность популяции В-лимфоцитов костного мозга по каппа- и лямбда-цепям, как правило, не наблюдалась.

При сравнении средних значений процентного содержания различных популяций лимфоцитов достоверные различия получены для популяций клеток CD19 и CD21, средние значения 8,37 и 6,55 %. Кроме того, достоверно различались популяции CD19 и CD24: 8,4 и 7,1 % (табл. 4).

Таблица 4. Парное сравнение средних значений процентного содержания В-клеток костного мозга, выявляемого на основании экспрессии различных дифференцировочных антигенов, у больных ДВКЛ в пределах зрелых CD45++ лимфоцитов

Сравниваемые пары	t	Степень свободы	p
CD19CD45–CD20CD45	1,835	17	,084
CD19CD45–CD22CD45	–,341	16	,738
CD19CD45–CD21CD45	2,350	13	,035
CD19CD45–CD24CD45	2,415	14	,030
CD20CD45–CD22CD45	–1,295	15	,215
CD20CD45–CD21CD45	1,968	13	,071
CD20CD45–CD24CD45	1,721	14	,107
CD22CD45–CD21CD45	1,991	13	,068
CD22CD45–CD24CD45	1,611	13	,131
CD21CD45–CD24CD45	–,608	13	,554

Для более глубокого понимания данного вопроса мы обратились к данным зарубежной и отечественной литературы относительно особенностей иммунофенотипа клеток ДВКЛ. Одной из таких

особенностей является отсутствие экспрессии антигена CD21 на клетках ДВКЛ. По данным отечественных онкогематологов, антиген экспрессируется лишь в 10 % случаев ДВКЛ [4].

Действительно, в ряде случаев ДВКЛ популяция зрелых В-лимфоцитов костного мозга была гетерогенна по экспрессии данного антигена, что можно подтвердить конкретным примером (рис. 6а). Анализ экспрессии CD21 указывал на наличие четкой отрицательной фракции (рис. 6б). Содержание CD21-негативных В-клеток составило 9,7 % от В-лимфоцитов. При оценке размера CD21-негативных В-лимфоцитов отчетливо определяется фракция более крупных клеток (в приведенном примере – 9,53 %, т. е. 0,01 % от общего числа миелокариоцитов).

Таким образом, в пределах клеток костного мозга цитометрически можно выделять фракцию крупных клеток с фенотипом ДВКЛ даже при их очень низком содержании (в представленном случае 0,01 %).

Последующие исследования клональности и сопоставление с первичным иммунофенотипом необходимы для подтверждения взаимосвязи этих клеток с первичной ДВКЛ. Интересно отметить, что в целом популяция зрелых В-клеток (CD19+) у этого больного была поликлональной (рис. 6в). Популяцию более крупных клеток (CD21–) оценить с позиций клональности не удалось, так как не было подходящих флуорохромонов.

Таким образом, оценка минимального поражения костного мозга при ДВКЛ должна базироваться на выявлении клональности В-лимфоцитов костного мозга по каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов, степени зрелости клеток и особенностях их иммунофенотипа.

Использование маркеров зрелых В-клеток (CD20+CD45++) позволяет выявить поликлональность

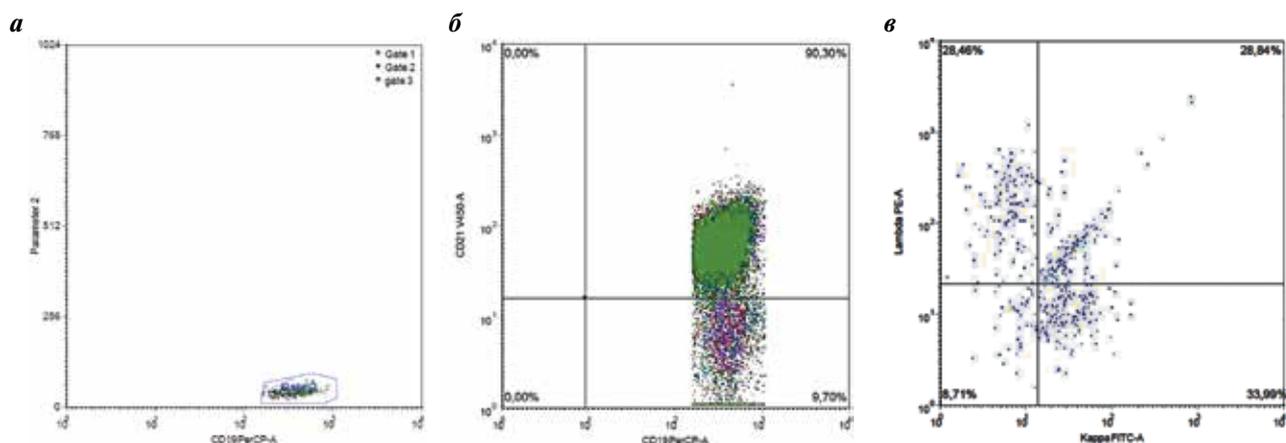


Рис. 6. Гейт зрелых В-лимфоцитов (CD45++CD19+) в костном мозге больного ДВКЛ (а); в пределах зрелых В-клеток присутствует фракция CD21-негативных лимфоцитов – 9,7 % (б); общая популяция В-клеток (CD19+) костного мозга больного поликлональна по каппа- и лямбда-цепям иммуноглобулинов (в)

В-клеток и тенденцию к моноклональности. Исключение из состава этих клеток CD5- позволяет с большей точностью оценить клональность зрелых В-клеток. Из 7 оцененных случаев в 2 возможно было установить моноклональность В-лимфоцитов.

Подробный анализ иммунофенотипа В-лимфоцитов костного мозга больных ДВКЛ по экспрессии мембранных CD19, CD20, CD21, CD22, CD24 позволил установить особую группу пациентов с наличием CD21-негативных В-клеток. Это типично для первичной ДВКЛ. Для подобного анализа необходима многоцветная проточная цитометрия – CD45++CD19+CD21–. Эти зрелые В-клетки наиболее напоминают по иммунофенотипу ДВКЛ, в пределах них присутствует фракция крупных клеток.

Дальнейший анализ минимального поражения костного мозга при ДВКЛ целесообразно вести имен-

но в этом направлении – поиска CD21-негативных В-лимфоцитов крупного размера, моноклональных.

Заключение

У большинства больных ДВКЛ повышено содержание бластных клеток в костном мозге. Эта группа больных характеризуется менее благоприятным прогнозом в сравнении с больными, у которых содержание бластных клеток нормальное. В связи с этим предпринята попытка установления минимального поражения костного мозга при ДВКЛ. Наиболее информативными оказались 2 подхода: исследование клональности В-клеток по каппа- и лямбда-цепям мембранных иммуноглобулинов в пределах популяции CD45++CD20+CD5– зрелых В-лимфоцитов, оценка aberrантности зрелых В-клеток (отсутствие экспрессии CD21).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Shipp M.A., Harrington D.P., Anderson J.R. et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med* 1993;329 (14):987–94. DOI: 10.1056/NEJM199309303291402. PMID: 8141877.
2. Campbell J., Seymour J.F., Matthews J. et al. The prognostic impact of bone marrow involvement in patients with diffuse large cell lymphoma varies according to the degree of infiltration and presence of discordant marrow involvement. *Eur J Haematol* 2006;76:473–80. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2006.00644.x. PMID: 16529599.
3. Тупицын Н.Н., Зейналова П.А., Френкель М.А., Османов Е.А. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2015;1:72–7. [Tupitsyn N.N., Zeynalova P.A., Frenkel M.A., Osmanov E.A. The role of the bone marrow in the prognosis of diffuse B-large cell lymphoma. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii* = Questions of biological, medical and pharmaceutical chemistry 2015;1:72–7. (In Russ.)].
4. Зейналова П.А. Диагностическая и прогностическая роль активационных антигенов опухолевых клеток при диффузной В-крупноклеточной лимфоме. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 2015. 47 с. [Zeynalova P.A. Diagnostic and prognostic role of activation antigens of tumor cells in diffuse large B-cell lymphoma. *Author's abstract dis. ... of doctor of medical sciences*. М., 2015. 47 p. (In Russ.)].
5. Stein H., Warnke R.A., Chan W.C. et al. Diffuse large B-cell lymphoma not otherwise specified. In: WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. –Eds). WHO Press, 2008. 233–7.

ORCID авторов /ORCID of authors

Цзяо Чэн/Cheng Jiao: <https://orcid.org/0000-0002-9916-1992>

П.А. Зейналова/P.A. Zeynalova: <https://orcid.org/0000-0003-1564-424X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ПОПУЛЯЦИЙ В1-ЛИМФОЦИТОВ В ИММУННОМ ОТВЕТЕ У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЖЕЛУДКА

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, Н.В. Грищенко¹, Д.А. Рябчиков¹,
Л.Ю. Гривцова³, И.С. Базин¹, Н.Н. Тупицын¹

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

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

³МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 249031 Калужская область, Обнинск, ул. Маршала Жукова, 10

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. В1-лимфоциты – субпопуляция В-клеток, на долю которой в селезенке приходится 5 % от общего числа В-клеток. В1-лимфоциты секретируют преимущественно IgM, который играет важную роль в индукции апоптоза опухолевых клеток. Спленэктомия с целью адекватной лимфодиссекции при раке желудка вызывает выраженные и длительные иммунологические нарушения. Это в первую очередь затрагивает субпопуляцию В1а-лимфоцитов, которая обеспечивает тимуснезависимый иммунный ответ.

Цель исследования – изучить особенности В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка.

Материалы и методы. Проанализирован субпопуляционный состав В-лимфоцитов периферической крови больных раком желудка, подвергшихся хирургическому лечению методом проточной цитометрии (Facs Can, программа Lysys II и FacsCanto II, программа Facs Diva). Клетки окрашивались одномоментно тремя моноклональными антителами, мечеными различными флуорохромами.

Результаты. Полученные данные демонстрируют нарушение состава субпопуляций В-клеток. В группе больных со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией на дооперационном этапе и спустя 3 мес после операции выявлена достоверная корреляция между относительным количеством В-лимфоцитов ($p = 0,018$), CD5+В-лимфоцитов ($p = 0,012$) и количеством CD19+CD38+-клеток ($p = 0,035$). Кроме того, после хирургического лечения значительно возрос процент CD5+В-лимфоцитов – с 12,9 до 21,8 %, тогда как суммарное количество CD19+ лимфоцитов и CD19+CD21+ клеток снижалось.

Заключение. У больных опытной группы может наблюдаться снижение антителопродукции, ослабление как общего, так и противоопухолевого иммунитета.

Ключевые слова: В-лимфоциты, тимуснезависимые антигены, гуморальный иммунитет, рак желудка, спленэктомия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70

THE ROLE OF B-1 LYMPHOCYTES IN ANTITUMOR IMMUNITY IN PATIENTS WITH GASTRIC CANCER

S. V. Chulkova^{1,2}, E. N. Sholokhova¹, N. V. Grishchenko¹, D. A. Ryabchikov¹, L. Y. Gritsova³, I. S. Bazin¹, N. N. Tupitsyn¹

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

²Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia;

³A. Tsyb Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation; 10 Marshal Zhukov St., Obninsk, Kaluga region, 249031, Russia

Introduction. B1-lymphocytes are a subpopulation of B-cells, the proportion of which in the spleen accounts for 5 % of the total number of B-cells. B1-lymphocytes predominantly secrete IgM, which plays an important role in the induction of tumor cell apoptosis. Splenectomy for the purpose of adequate lymph node dissection in gastric cancer causes marked and prolonged immunological disorders. It primarily affects the B1a-lymphocyte subpopulation, which provides a thymus-independent immune response.

Objective. To study the features of the B-cell component of immunity in patients with gastric cancer.

Materials and methods. The subpopulation composition of B-lymphocytes of peripheral blood of gastric cancer patients undergoing surgical treatment using flow cytometry (Facs Can, Lysys II and FacsCanto II programs, Facs Diva program) was analyzed. Cells were stained simultaneously with three monoclonal antibodies labeled with different fluorochromes.

Results. The data obtained demonstrate a violation of the composition of B-cell subpopulations. In the group of patients with standard D2 lymph node dissection and splenectomy at the preoperative stage and three months after surgery, a significant correlation was found between the relative number of B lymphocytes ($p = 0.018$), CD5 + B lymphocytes ($p = 0.012$) and the number of CD19 + CD38 + cells ($p = 0.035$). In addition, after surgical treatment, the percentage of CD5 + B-lymphocytes increased significantly from 12.9 to 21.8 %, while the total number of CD19 + lymphocytes and CD19 + CD21 + cells decreased.

Conclusion. In patients of the experimental group, a decrease in antibody production, weakening of both general and antitumor immunity can be observed.

Key words: B-lymphocytes, thymus-independent antigens, humoral immunity, gastric cancer, splenectomy

Введение

Селезенка является одним из важнейших периферических лимфоидных органов, обеспечивающих гуморальный иммунитет. В селезенке происходят сложные процессы селекции и активации В-клеток. Незрелые В-клетки поступают из костного мозга во вторичные лимфоидные органы (селезенку, лимфатические узлы, пейеровы бляшки кишечника), где происходят их дальнейшее созревание, презентация антигена, пролиферация и окончательная дифференцировка [1]. В результате созревания на их поверхности появляются молекулы IgD, CD21, CD22 (табл. 1). Антигены CD19, CD81 (иное название TAPA-1) и CD21 ассоциированы в комплекс, называемый В-клеточным корецептором. Связывание антигена с корецептором усиливает активационный сигнал, передаваемый через BCR [2, 3]. Процесс активации В-клеток может осуществляться в ответ на тимусзависимые антигены или без участия Т-лимфоцита [4]. Большинство зрелых В-клеток располагается в пределах лимфоидных фолликулов селезенки и лимфатических узлов, где они сталкиваются и реагируют на Т-зависимые антигены, связанные с CD23+ фолликулярными дендритными клетками, пролиферируют, либо дифференцируются в плазматические клетки. Направленность дифференцировки регулируется в апикальной зоне зародышевых центров [5]. Незрелые В-клетки реагируют на Т-клеточные независимые антигены 1-го типа, которые вызывают быстрый ответ антителопродукции.

При контакте В-лимфоцитов с тимусзависимыми антигенами происходит связывание специфического иммуноглобулинового рецептора В-клеток. Затем в фолликулах селезенки и лимфатических узлов запускается дифференцировка наивных В-лимфоцитов в ходе первичных иммунных ответов. При отсутствии антигенной стимуляции В-лимфоциты или мигрируют в лимфатические сосуды и продолжают циркулировать, или погибают [6].

При осуществлении вторичных иммунных ответов на тимусзависимые антигены отмечаются выраженная В-клеточная пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов в плазматические клетки, что происходит в пределах наружной зоны периартериолярных лимфоидных муфт [7, 8].

Селезенка является основным местом синтеза IgM [9–11]. Антитела класса М появляются на ранних стадиях фило- и онтогенеза, продуцируются активированными В-лимфоцитами в ходе первичных

иммунных ответов, осуществляемых в периферических лимфоидных органах [12]. Обладают высокими агглютинирующими свойствами и опсонизирующим эффектом. Данный иммуноглобулин представляет собой полимер из 5 мономеров, связанных друг с другом ковалентными связями, известными как дисульфидные связи, и составляют около 10 % всех иммуноглобулинов. Время полужизни IgM не более 5 дней. Примерно половина сывороточного IgM секретируется В1 летками. Антитела класса М играют ключевую роль в индукции апоптоза опухолевых клеток [13–15].

Таблица 1. Молекулы клеточной поверхности, экспрессируемые В-клетками

Название	Оригинальное имя	Экспрессия на клетках
CD19	B4	Пан-В-клеточный антиген, FDCs
CD20	B1	Зрелые В-клетки
CD21	B2, HB-5	Зрелые В-клетки, FDCs
CD22	BL-CAM, Lyb-8	Зрелые В-клетки
CD23	FcεRII	Активированные В-клетки, FDCs, s
CD24	BA-1, HB6	Пан-В-клеточный антиген, гранулоциты, эпителиальные клетки
CD40	Bp50	В-клетки, эпителиальные клетки, FDCs
CD72	Lyb-2	Пан-В-клеточный антиген
CD79a, b	Iga, β	Поверхностный Ig+ В-клеток
CD81	B2	Зрелые В-клетки

Объем хирургического вмешательства при раке желудка при выполнении гастрэктомии или проксимальной резекции включает проведение D2-лимфодиссекции, что подразумевает спленэктомию, которая выполняется для полного удаления лимфатических узлов ворот селезенки [16]. Многочисленные данные литературы сообщают о росте частоты послеоперационных осложнений и летальности в результате спленэктомий [17–21]. Подобные исходы являются результатом дисфункции различных компартментов иммунной системы, в числе которых нарушения пропорции популяций В-лимфоцитов и презентации макрофагами чужеродных антигенов Т- и В-лимфоцитам, снижения уровня секреции

иммуноглобулинов [22–24]. Но в первую очередь изменения затрагивают В-клеточный иммунный ответ, в том числе на тимуснезависимые антигены 2-го типа, который обеспечивается особой субпопуляцией В1а-лимфоцитов [25].

Популяция В1-лимфоцитов относится к древней ветви антителопродуцирующих клеток в филогенезе. Впервые популяция В1-лимфоцитов описана в 1983 г. Ли Херценбергом как CD5⁺-популяция, которая отличается от обычных В (В-2)-клеток фенотипом, анатомической локализацией, способностью к самовосстановлению и производством естественных антител. В-1-популяция лимфоцитов включает 2 субпопуляции: В1а и В1б [26, 27].

Цель исследования – оценить особенности В-клеточного звена у больных раком желудка.

Материалы и методы

Все больные раком желудка, принимавшие участие в исследовании, были разделены на 2 группы: 1-я группа больных получила хирургическое лечение в объеме гастрэктомии, D2-лимфодиссекции с сохранением селезенки; во 2-й группе больные прооперированы в объеме гастрэктомии согласно стандартам D2-лимфодиссекции, которая сопровождалась спленэктомией. Исследование субпопуляций В-лимфоцитов проводилось на дооперационном этапе и спустя 3 мес после хирургического вмешательства.

Всего в исследовании приняли участие 50 больных. Средний возраст больных составил 59 лет. В нашем исследовании преобладали женщины. У 16 больных установлена I стадия, у 12 больных – II стадия, у 18 больных – III стадия, у 4 больных – IV стадия. Иммунофенотипирование популяций В-лимфоцитов периферической крови до операции выполнено у 50 больных, спустя 3 мес после хирургического пособия – у 29 больных.

Субпопуляции В-лимфоцитов периферической крови исследовались в реакции прямой иммунофлуоресценции с использованием тройной флуоресцентной метки. В работе использованы моноклональные антитела, меченные следующими флуорохромами: FITC – флуоресцеин, PE – фикоэритрин, PerCR – пиридининхлорофил, двойной (тандемный) краситель, сочетающий фикоэритрин с цианином 5 (PE-cy5). Проведен анализ экспрессии мембранных антигенов: CD20, CD21, CD23, CD38, HLA-DR, CD71, CD10, CD95, CD25, CD5, CD56, легких цепей иммуноглобулинов IgG-λ и IgG-κ (табл. 2).

Сбор данных проводился на проточных цитометрах (Facs Can, программа Lysis II и FacsCanto II, программа Facs Diva), анализ данных – с использованием приложения WinMDI 2.8 и FCS 3.0. Экспрессия мембранных антигенов оценивалась в гейте CD19⁺В-клеток. При этом на первом этапе анализа

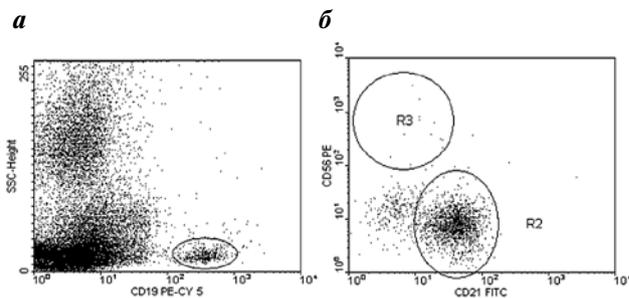


Рис. 1. По оси абсцисс – экспрессия пан-В-клеточного антигена CD19⁺; по оси ординат – параметр бокового светорассеяния лазерного луча, отражающий рабочее цитометрическое понятие – гранулярность клетки; а – оценка общего количества CD19⁺В-клеток в пределах лимфоцитов; б – оценка экспрессии 2 антигенов, ассоциированных с В-клетками в гейте CD19⁺CD56 и CD21

Таблица 2. Моноклональные антитела и антигены

Антиген	Клон антител	Изотип антител	Производитель	Флуорохром
CD19	4G7, H1B19	IgG1-κ	BD Biosciences	PerCP
CD20	2H7	IgG1-κ	BD Biosciences	PE
CD23	LT23	IgG1-κ	Сорбент, Россия	FITC
CD5	L17F12	IgG2a-κ	BD Biosciences	PE
CD21	BL13	IgG1-κ	BD Biosciences	FITC
CD10	HL10a	IgG2a-κ	BD Biosciences	PE
CD71	L01.1	IgG2a-κ	BD Biosciences	FITC
CD95	DX2	IgG1-κ	BD Biosciences	PE
CD25	2A3	IgG1-κ	BD Biosciences	FITC
CD56	NCAM 16.2	IgG2a-κ	BD Biosciences	PE
CD3	SK7	IgG1-κ	BD Biosciences	FITC
IgG- λ/ IgG-κ	–	–	BD Biosciences	PE\FITC

цитометрически оценивалось количество CD19⁺В-клеток в пределах лимфоцитов (рис. 1а). Далее, в пределах только В-клеток (гейт CD19⁺) (рис. 1б) проводился анализ экспрессии 2 антигенов, ассоциированных с В-клетками. В приведенных образцах это оценка антигенов CD56 одновременно с CD21 и CD20 одновременно с CD23 (см. рис. 1б). В 42 образцах периферической крови до операции и 23 после операции на гематологическом анализаторе Micros 60 была подсчитана гемограмма, что позволило оценить абсолютное количество В-клеток.

Результаты и обсуждение

На дооперационном этапе у 33 % больных раком желудка выявлено снижение относительного количества

В-клеток (менее 5 %) и у 38 % – снижение абсолютного количества. Через 3 мес после операции в 52 % случаев оказалось сниженным относительное количество В-клеток, у 31 % – абсолютное содержание В-лимфоцитов.

Среднее относительное количество В-клеток, так же как и их среднее абсолютное содержание в 1 мкл периферической крови, спустя 3 мес после оперативного вмешательства оказалось незначительно повышенным по сравнению с данными показателями при оценке до операции. Средний процент В-лимфоцитов крови после операции был несколько ниже, чем до оперативного вмешательства. Вместе с тем данные различия оказались статистически недостоверными (Т-тест при сопоставлении двух независимых переменных). Это может объясняться значительным разбросом анализируемых показателей у больных как до оперативного вмешательства, так и после.

При анализе популяций В-клеток у больных раком желудка отмечено наличие выраженной пропорции В1-лимфоцитов. В1 рассматриваются как ключевые игроки раннего гуморального ответа против патогенов и считаются первичными продуцентами антител в ответ на Т-клеточные независимые антигены типа 2 [28]. Специфический тимуснезависимый ответ реализуется двумя субпопуляциями В1-клеток: В1а и В1б.

Субпопуляции В1-лимфоцитов схожи между собой, но для субпопуляции В1б характерно отсутствие экспрессии CD5 [29]. Субпопуляция В1а-лимфоцитов имеет фенотип CD19+CD21lowCD23-CD5+IgM++. Число CD19+CD5+ В-клеток периферической крови у больных раком желудка в среднем составило 17,7 %.

В1а-лимфоциты – минорная популяция В-клеток, появляющаяся раньше других субпопуляций В-лимфоцитов, развивающаяся из клеток-предшественников в печени плода. На раннем этапе онтогенеза предшественники В1а-лимфоцитов мигрируют из эмбриональных кровяных тканей (фетальной печени, оментума) в брюшную и плевральную полости. Важно то, что данная субпопуляция в пределах селезенки получает информацию об антигенах, не принимая участие в рециркуляции. В1б-лимфоциты тоже происходят из фетальных предшественников,

мигрирующих в эмбриональном периоде в серозные полости, где и остаются на протяжении всей жизни организма, а пул их у взрослых может частично пополняться за счет костного мозга [30, 31]. В целом пул В1-популяции поддерживается за счет активности клеток-предшественников, пролиферирующих довольно медленно.

В1-клетки характеризуются «активированным фенотипом»: на их поверхности экспрессируются ко-стимулирующие молекулы CD80 и CD86. Посредством такого фенотипа В1-лимфоциты осуществляют функции антигенпрезентирующих клеток. В1-лимфоциты осуществляют тимуснезависимый ответ и преимущественно продуцируют антитела класса М [32]. Антитела IgM являются наиболее ранними в иммуногенезе. Многие из антител полиспецифичны, имеют низкую аффинность и таким образом взаимодействуют с несколькими антигенами, включая аутоантигены. В1-клетки постоянно циркулируют между селезенкой и брюшной полостью, не поступая в фолликулы, поскольку не экспрессируют рецептор хемокина. Поэтому процессы «усовершенствования» гуморального иммунного ответа в виде переключения изотипов и повышения сродства к антигенам, не затрагивают или минимально затрагивают В1-клетки [33].

В норме В1а-субпопуляция лимфоцитов составляет не более 10 % от общего количества В-лимфоцитов периферической крови. Представляет интерес то, что в ходе исследования у 23 % больных раком желудка в периферической крови обнаружено значительное количество В1а-лимфоцитов, превышающих норму в 2 раза. Более того, следует обратить внимание на то, что у 3 больных наблюдалось более 40 % CD19+CD5+-лимфоцитов.

Изучение субпопуляции В1а-лимфоцитов у больных раком желудка, у которых наблюдалось их более 15 %, выявило выраженную экспрессию CD25+ и CD21+-антигенов (различия достоверны), CD38+-клеток при сравнении с группой, где количество В1а-лимфоцитов менее 15 % (табл. 3).

В группе больных, у которых субпопуляция В1а-клеток составила более 25 %, наблюдалось наличие выраженного числа клеток, экспрессирующих CD38+-

Таблица 3. Значительные популяции В-клеток в группах больных раком желудка с CD5+-лимфоцитами (1-я группа $\geq 15\%$) и их нормальным содержанием (2-я группа $< 15\%$)

Популяция	1-я группа	2-я группа	Число, 1-я группа / 2-я группа	t-критерий	Значимость
CD21	85,3 \pm 1,6	79,1 \pm 1,9	13 / 27	2,436	0,02
CD25	3,9 \pm 2,0	0,7 \pm 0,1	11 / 26	2,435	0,02
CD38	27,7 \pm 6,5	16,1 \pm 2,9	16 / 38	1,858	0,07

и CD23+-антигены (достоверная корреляция для В-клеток с экспрессией CD38- и CD23-антигенов, $R = 0,885$; $p = 0,008$). Кроме того, наблюдалась высокая вероятность присутствия субпопуляции CD19+CD5+CD25+ ($R = 0,879$; $p = 0,05$). Однако в подавляющем большинстве случаев количество CD19+CD38+ В-клеток оказалось менее 15 %.

Таким образом, у 17,7 % больных раком желудка в периферической крови отмечается присутствие выраженной пропорции особой субпопуляции, обеспечивающей специфический ответ на тимуснезависимые антигены 2-го типа, который сопровождается преимущественно синтезом IgM – В1а-лимфоцитов. Для популяции В1а-лимфоцитов отмечен «активированный фенотип», что проявляется в экспрессии на их поверхности активационных антигенов CD38 и CD25.

В селезенке происходят сложные процессы дифференцировки, селекции В-лимфоцитов, пополнения пула рециркулирующих В-лимфоцитов. Чтобы оценить особенности В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка после гастрэктомии со спленэктомией, проведено исследование субпопуляций В-лимфоцитов в динамике: до и после операции. Иммунофенотипический профиль В-клеток изучен у 14 больных раком желудка со спленосохранной D2-лимфодиссекцией и гастрэктомией и у 16 больных раком желудка после гастрэктомии и D2-лимфодиссекции со спленэктомией (рис. 2).

В 1-й группе больных при попарном сопоставлении (Т-критерий для парных переменных) средних величин до операции и после установлена достоверная корреляция между относительным (доля на лимфоциты и на лейкоциты) и абсолютным (клетки в 1 мкл крови) количеством CD19+ В-клеток ($p = 0,015$; $p = 0,04$ и $p = 0,05$ соответственно). Аналогичная корреляция выявлена для популяции CD19+CD21+-клеток ($p = 0,034$).



Рис. 2. Содержание В-лимфоцитов и их субпопуляций у больных со спленосохранной D2-лимфодиссекцией

Сравнительный анализ, проведенный во 2-й группе больных на дооперационном этапе и спустя 3 мес. после операции, выявил достоверную корреляцию между относительным количеством В-лимфоцитов ($p = 0,018$), CD5+В-лимфоцитов ($p = 0,012$) и количеством CD19+CD38+-клеток ($p = 0,035$). Показатели В-клеток в группе больных раком желудка после гастрэктомии со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией представлены на рис. 3.

Любопытные данные были получены в ходе изучения субпопуляции В1а-лимфоцитов в динамике у больных 2-й группы. После оперативного вмешательства отмечено значительное количество клеток, экспрессирующих CD5+антиген ($t = -6,015$, $sig. < 0,0001$, $p = 0,013$), а относительное количество CD19+ лимфоцитов снизилось. Вместе с тем выявлено снижение числа CD19+CD21+ В-лимфоцитов с 83,6 до 73,9 % ($p = 0,08$). Следует отметить, что наибольшее число зрелых CD19+CD21+ В-клеток



Рис. 3. Показатели В-клеток в группе больных раком желудка после гастрэктомии со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией

в организме аккумулировано в маргинальной зоне селезенки. При сравнении 1-й и 2-й групп больных раком желудка после проведенного оперативного вмешательства спустя 3 мес. обращает на себя внимание выраженное количество CD19+CD5+В-клеток у пациентов 2-й группы, достигающее 21,7 % ($p = 0,049$), которые являются предшественниками функционально более совершенных, клонально более разнообразных истинных В-клеток.

Заключение

Полученные результаты по изучению особенностей В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка демонстрируют нарушение состава субпопуляций В-лимфоцитов, которое затрагивает в первую очередь В1а-популяцию. На дооперационном этапе большинство В-клеток периферической крови больных раком желудка слабо экспрессировали антиген CD21, который ассоциирован с другими молекулами в комплексе, называемом В-клеточным

корцептором, связывание антигена с которым усиливает активационный сигнал, передаваемый через BCR. Вместе с тем у больных раком желудка отмечены присутствие выраженного количества CD23+ В-клеток и случаи клональных В-клеток. После хирургического вмешательства в группе больных со стандартной D2-лимфодиссекцией и спленэктомией значительно возрос процент CD5+ В-лимфоцитов с 12,9 до 21,8 %, тогда как суммарное количество CD19+-лимфоцитов и CD19+CD21+-клеток снизилось. Учитывая полученные данные и принимая во внимание, что В1-лимфоциты осуществляют преимущественно тимуснезависимый ответ и в основном продуцируют антитела класса М, у больных раком желудка после спленэктомии может наблюдаться иммунодепрессия, сопровождающаяся снижением образования антител, в том числе IgM, играющего важную роль в индукции апоптоза опухолевых клеток, поскольку подавляющий процент сывороточного IgM секретируется В1-клетками.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tupitsyn N.N. The structure and function of the human immune system. 2nd ed. M.: Medicine, 2007. Pp. 46–65.
2. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. Cellular and molecular Immunology. W.B. Saunders company, 1996. Pp. 28–32.
3. Koiko R., Sunshine D., Benjamin E. Immunology. M.: Academy, 2008. 362 p.
4. Vos Q., Lees A., Wu Z.-Q. et al. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. Immunological Reviews 2000;176:154–70. PMID: 11043775. DOI: 10.1034/j.1600-065X.2000.00607.x.
5. Chulkova S.V. Stilidi I.S., Glukhov V.G. et al. The spleen as a peripheral immunity organ. Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMN 2014;25(1):21.
6. Rabons A., Roit A., Delvz P. Basics of Medical Immunology. M.: Mir, 2006. 320 p.
7. Liu Y.J. Sites of B lymphocyte selection, activation, and tolerance in spleen (review). J Exp Med 1997;186:625–9. PMID: 9312553. DOI: 10.1084/jem.186.5.625.
8. Mebius R., Kraal G. Structure and function of the spleen. Nature Rev Immunol 2005;5:606–16. DOI: 10.1038/nri1669.
9. Roit A., Brostoff J., Mail D. Immunology. Per. from English. M.: Mir, 2000. 581 p.
10. Krutzmann S., Rosado M.M., Weber H. et al. Human immunoglobulin M memory B cells controlling Streptococcus pneumoniae infections are generated in the spleen. J Exp Med 2003;197(7):939–45. PMID: 12682112. DOI: 10.1084/jem.20022020.
11. Di Sabatino A., Rosado M., Ciccocioppo R. et al. Depletion of immunoglobulin M memory B cells is associated with splenic hypofunction in inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol 2005;100 (8):1788–95. PMID: 16086716. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2005.41939.x.
12. Mikhaylenko A.A., Bazanov G.A., Pokrovsky V.I., Konenkov V.I. Prophylactic immunology. M.: Tver; Triad, 2004. 448 p.
13. Brandlein S., Lorenz J., Ruoff N. Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients. Hum Antibodies 2002;11(4):107–19. PMID: 12775891. DOI: 10.3233/HAB-2002-11401.
14. Varambally S., Bar-Dayan Y., Bayry J. Natural human polyreactive IgM induce apoptosis of lymphoid cell lines and human peripheral blood mononuclear cells. Intern Immunology 2004;16(3):517–24. PMID: 14978025. DOI: 10.1093/intimm/dxh053.
15. Piao X., Ozawa T., Hamana H. TRAIL-receptor 1 IgM antibodies strongly induce apoptosis in human cancer cells in vitro and in vivo. Oncoimmunology 2016;5(5):e1131380. PMID: 27467950. DOI: 10.1080/2162402x.2015.1131380.
16. Glukhov E.V., Chulkova C.V., Grivtsova L.Yu. et al. The role of splenectomy in cancer of the body and proximal stomach. Bulletin of the Russian Scientific Center for X-ray Radiology of the Ministry of Health of Russia 2018; 1. 17 p.
17. Brady M.S., Rogatko A., Dent L.L., Shiu M.H. Effect of splenectomy on morbidity and survival following curative gastrectomy for carcinoma. Arch Surg 1991;126(3):359–64. PMID: 1998479. DOI: 10.1001/archsurg.1991.01410270105017.
18. Csendes A., Burdiles P., Rojas J. et al. A prospective randomized study comparing D2 total gastrectomy versus D2 total gastrectomy plus splenectomy in 187 patients with gastric carcinoma. Surgery 2002;131(4):401–7. PMID: 11935130. DOI: 10.1016/S0003-3944(02)00835-0.
19. Fatouros M., Roukos D.H., Lorenz M. et al. Impact of spleen preservation in patients with gastric cancer. Anticancer Res 2005;25(4):3023–30. PMID: 16080561.
20. Griffith J.P., Sue-Ling H.M., Martin I. et al. Preservation of the spleen improves survival after radical surgery for gastric cancer. Gut 1995;36(5):684–90. PMID: 7797117. DOI: 10.1136/gut.36.5.684.

21. Okuno K., Tanaka A., Shigeoka H. et al. Suppression of T-cell function in gastric cancer patients after total gastrectomy with splenectomy: implications of splenic autotransplantation. *Gastric Cancer* 1999;2(1):20–5. PMID: 11957066. DOI: 10.1007/s101200050016.
22. Vorobev A.A., Kiselevsky M.V., Titov K.S. et al. The concept of adoptive immunotherapy in patients with gastric cancer after radical surgical treatment. *Bulletin of RAMS* 2003;6:16–9.
23. Pavlova I.E., Bubnova L.N. Dynamics of indicators of cellular and humoral immunity in patients undergoing splenectomy in the late postoperative period by trauma. *Medline Express* 2007;3–4:26–31.
24. Tuguz A.R., Gromova E.G., Anisimova N.Yu. et al. Production of INF-alpha neutrophils, mononuclear cells and splenocytes of cancer patients with postoperative complications. *Herald intensive care* 2003;3:48–50.
25. Grivtsova L.Yu., Glukhov E.V., Chulkova S.V. et al. Role of splenectomy in peculiarities of peripheral blood B cell sub populations in patients with gastric cancer. *J Immunology* 2014;5:279–86.
26. Hardy R.R., Hayakawa K. B-cell development pathways. *Ann Rev Immunol* 2001;19:595–621. PMID: 11244048. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.595.
27. Hayakawa K., Hardy R.R., Parks D.R., Herzenberg L.A. The “Ly-1 B” cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 1983;157:202–18. PMID: 6600267. DOI: 10.1084/jem.157.1.202.
28. Martin F., Kearney J.F. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B-cells as part of a “natural immune memory”. *Immunol Rev* 2000;175:70–9. PMID: 10933592. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2000.imr017515.x.
29. Berland R., Wortis H.H. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 2002;20:253–300. PMID: 11861604. DOI: 10.1155/2013/827254.
30. Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* 2006;7:293–301. PMID: 16429139. DOI: 10.1038/ni1301.
31. Dorshkind K., Montecino-Rodriguez E. Fetal B-cell lymphopoiesis and the emergence of B-1-cell potential. *Nat Rev Immunol* 2007;7:213–9. PMID: 17318232. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001173.
32. LeBien T. W., Tedder T.F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570–80. PMID: 18725575. DOI: 10.1182/blood-2008-02-078071.
33. Burmester G.-R., Pecutto A. *Visual immunology*. M.: Binom. 3rd ed. 2014. 320 p.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.В. Чулкова/S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Н.В. Грищенко/N.V. Grishchenko: <https://orcid.org/0000-0002-7515-8182>

Н.Н. Тупицын/N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ АРАНОЗЫ, ЦИСПЛАТИНА И ПАКЛИТАКСЕЛА В МОНОРЕЖИМЕ И В СОЧЕТАНИИ НА АКТИВНОСТЬ PD–L1 И PD–L2 В КЛЕТКАХ МЕЛАНОМЫ

А.А. Рудакова, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарёв, О.С. Булова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Анна Андреевна Рудакова RudakovaAn93@yandex.ru

Введение. В настоящее время для лечения рака применяются следующие подходы: хирургическое удаление опухоли, химиотерапия, таргетная терапия и иммунотерапия. Комбинирование препаратов различных классов позволяет добиться большего терапевтического эффекта по сравнению с их применением в монорежиме. Более того, могут наблюдаться и другие эффекты, в том числе изменение уровня экспрессии белков PD–L1 и PD–L2, важных мишеней чекпойнт-терапии.

Цель исследования – оценить влияние аранозы, цисплатина и паклитаксела в монорежиме или в комбинации на изменение уровня экспрессии мРНК и белков PD–L1 и PD–L2 в клеточных линиях меланомы и сопоставить результат со степенью дифференцировки клеток и наличием или отсутствием мутаций.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях меланомы человека, полученных из опухолевого материала больных. Уровень экспрессии генов PD–L1 и PD–L2 оценивали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. В реакции иммунофлуоресценции оценивали экспрессию белков PD–L1 и PD–L2. Данные анализировали методами корреляционного анализа и медианного теста.

Результаты. Уровень экспрессии гена PD–L2 прямо коррелировал со степенью дифференцировки клеток (коэффициент Пирсона 0,937, $p < 0,15$). Активность гена PD–L1 и белков PD–L1 и PD–L2 не связана со степенью дифференцировки, а также не зависит от наличия мутаций гена TP53. PD–L2 экспрессируется на меньшем уровне в клеточных линиях, имеющих мутации гена BRAF ($p = 0,0117$). Интересно, что мутации в гене TP53 наблюдаются при наличии мутаций BRAF (коэффициент Пирсона 1, $p < 0,15$). Воздействие аранозы привело к увеличению уровня экспрессии гена PD–L1 ($p = 0,23$). Инкубация с цисплатином в комбинации с паклитакселом также приводила к увеличению уровня экспрессии белка PD–L1 ($p = 0,037$). Цисплатин и паклитаксел в монорежиме не оказывали влияния на экспрессию белка PD–L1. Уровень экспрессии гена и белка PD–L2 снижался под действием любого препарата, но статистически незначимо ($p = 0,6$).

Выводы. Исследованные препараты практически не оказывают влияния на уровень экспрессии PD–L1 и PD–L2 как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Из этого следует, что сочетание анти-PD терапии и противоопухолевых препаратов, таких как паклитаксел и араноза, потенциально не снизит эффективность чекпойнт-терапии и может иметь большие перспективы применения в будущем при создании протоколов комбинированной терапии.

Ключевые слова: меланома, PD–L1, PD–L2, араноза, цисплатин, паклитаксел

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-71-80

THE EFFECTS OF ARANOSE, CISPLATIN OR PACLITAXEL IN MONOTHERAPY AND IN COMBINATION ON THE EXPRESSION OF PD–L1 AND PD–L2 IN MELANOMA CELLS

A.A. Rudakova, V.A. Misyurin, A.V. Ponomarev, O.S. Buova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova

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

Introduction. Currently, the following approaches are used for cancer treatment: surgical tumor removal, chemotherapy, targeted therapy and immunotherapy. The combination of different drugs may have additional advantages due to cumulative effect. Moreover, some additional effects like changes in PD–L1 and PD–L2 expression levels may be observed.

Aim. The aim of this study was to determinate the influence of aranose, cisplatin or paclitaxel and their combination on the expression of mRNA level and proteins PD–L1 and PD–L2 in melanoma cell lines and to compare the results with the differentiation status and with the appearance of mutations in melanoma cells.

Materials and methods. Melanoma cell lines used in this study were derived from surgical species of patients with disseminated melanoma. The mRNA expression level of PD–L1 and PD–L2 genes was measured by RQ-PCR. The expression of PD–L1 and PD–L2 proteins was measured by flow cytometry. The Pearson's correlation and median test were used for statistical analysis.

Results. The expression level of PD–L2 gene was correlated with melanomas cell's differentiation status (Pearson's coefficient 0.937, $p < 0.15$). The expression levels of PD–L1 gene and PD–L1 and PD–L2 proteins were not correlated with differentiation status of melanoma cells as well as TP53 mutations. In case of BRAF mutations the expression of PD–L2 was low detectable ($p = 0.0117$).

It is worth noting that the TP53 mutations were associated with BRAF mutations (Pearson's coefficient 1, $p < 0.15$). The exposure of cells to aranose led to increased PD-L1 gene expression ($p = 0.23$). Incubation with cisplatin in combination with paclitaxel also resulted in an increase in PD-L1 protein expression ($p = 0.037$). Cisplatin or paclitaxel had no effect on the expression of PD-L1 protein. The expression level of PD-L2 gene and protein decreased under the action of any of these two drugs: these data are statistically ($p = 0.6$).

Conclusion. The tested drugs had no effect on the expression of PD-L1 and PD-L2 both at the protein level and at the mRNA level. It follows that the combination of anti-PD therapy and anticancer drugs, such as paclitaxel and aranose, will not potentially reduce the effectiveness of checkpoint therapy, and may have great prospects for future use in the creation of combined therapy protocols.

Key words: melanoma, PD-L1, PD-L2, aranose, cisplatin, paclitaxel

Введение

Меланома – агрессивная неоплазия, вызванная злокачественной трансформацией меланоцитов, пигментгенерирующих клеток кожи, которая является причиной 75 % всех смертей, связанных с раком кожи. Меланома фенотипически и молекулярно-неоднородное заболевание, выделяют кожные, увеальные, акральные и слизистые меланомы. Они имеют разные варианты клинических проявлений, лечения и прогноза, так как обладают различными мутационными профилями и различными факторами риска. Меланома кожи характеризуется наибольшим числом мутаций по сравнению с другими солидными опухолями [1, 2]. Идентифицированы онкогенные мутации BRAF (около 50 %), NRAS (около 15–20 %), c-Kit (около 2 %) и нуклеотид Guanine (GNAQ / GNA11) (около 50 % случаев увеальной меланомы) [3]. Идентификация этих молекулярных аномалий при меланоме имеет значение для развития таргетной терапии [4].

Мутация в гене BRAF – наиболее распространенное событие, встречающееся примерно в половине случаев меланомы. Самыми распространенными онкогенными мутациями BRAF в меланоме являются BRAFV600E и BRAFV600K, представляющие 80–90 и 10–20 % всех мутаций BRAF соответственно [5, 6]. Киназы BRAFV600E и BRAFV600K – конститутивно активные, поддерживают передачу сигнала по MAPK-каскаду и стимулируют рост клеток. Фенотипически BRAFV600E и BRAFV600K придают агрессивное поведение клеткам меланомы [7, 8], а их наличие у больного коррелирует с неблагоприятным прогнозом [6].

Идентификация мутаций BRAF в опухолях меланомы привела к разработке направленных на MAPK-каскад малых молекул – ингибиторов киназ, в частности ингибиторов BRAF и MEK. Блокируя сигнальный путь MAPK, эти агенты значительно улучшили выживаемость пациентов с мутацией BRAFV600, что привело к внедрению в клиническую практику вемурафениба в 2011 г., дабрафениба и траметиниба в 2013 г. в США [9–11]. По разным данным, соматические мутации гена BRAF выявляются в 40–88 % случаев при местно-распространенных и метастатических формах меланомы [12]. И хотя больные, не

имеющие мутации BRAF, не могут получать анти-BRAF-терапию, для них возможны другие способы лечения.

Еще один перспективный метод лечения злокачественных новообразований – иммунотерапия [13–15]. PD-1 (белок запрограммированной гибели клеток/programmed cell death-1) экспрессируется на поверхности активированных Т-лимфоцитов [16, 17]. Ассоциация PD-1 с лигандами приводит к инактивации Т-клеток. Известны 2 лиганда PD-1: PD-L1 и PD-L2 [18]. В физиологических условиях PD-L1 экспрессируется на иммунных клетках, включая дендритные клетки (DCs), а также на негемопоэтических клетках [19], а PD-L2 экспрессируется лишь на активированных макрофагах и дендритных клетках [20]. Взаимодействие рецептора с лигандом PD-L1 на опухолевых клетках и клетках опухолевого микроокружения приводит к иммуносупрессии и подавлению противоопухолевого иммунного ответа [21–24]. Поэтому блокирование либо иммунного контрольного белка PD-1, либо его лигандов PD-L1 и/или PD-L2 – это новые стратегии противоракового лечения, которые уже доказали свою эффективность [25]. Однако к блокаторам PD-1 в некоторых случаях развивается резистентность [26]. Долгосрочные ответы на анти-PD-1-терапию наблюдались у 30–35 % пациентов с метастатической меланомой [27].

Несмотря на эти достижения, использование представленных подходов, а также химиопрепаратов в качестве монотерапии имеет значительные ограничения. Возрастает интерес к использованию комбинаций препаратов, так как ожидается взаимное усиление их лекарственного эффекта [28].

Иммунотерапия эффективна при разных типах опухолей, и поэтому сочетание химиотерапии с ингибиторами PD-1 может, во-первых, уменьшить токсическую нагрузку на организм, во-вторых, усилить противоопухолевый ответ путем воздействия на опухоль иммунных клеток и, в-третьих, непосредственно воздействовать на стромальные клетки опухоли. Выбор химиотерапевтического средства и время для применения комбинаций будет иметь большое значение, поскольку многие цитотоксические химиопрепараты нацелены на быстрое деление клеток [29].

Лечение ингибиторами *BRAF* улучшает противоопухолевый иммунный ответ на меланому, возможно, путем увеличения перекрестного представления антигенов из мертвых опухолевых клеток [30, 31]. Развитие резистентности к ингибиторам *BRAF* сопровождается увеличением уровня экспрессии PD–L1 на клетках меланомы [32]. Исследования с использованием мышиной модели с мутацией BRAFV600E показали, что блокада PD-1 или PD–L1 в сочетании с ингибированием *BRAF* увеличивает активность опухолеинфильтрирующих лимфоцитов и опосредует более продолжительную выживаемость [33]. На основе данных наблюдений в настоящее время ведутся клинические испытания, в которых оцениваются комбинации блокаторов PD-1 с ингибиторами *BRAF*, такими как вемурафениб (NCT01656642) или дабрафениб (Tafinlar; GlaxoSmithKline) [34]. Но даже такие комбинации оказались неидеальными. По этой причине классические цитотоксические препараты остаются актуальными, так как их тоже можно сочетать и с анти-PD1-терапией, и друг с другом.

Цисплатин, цисплатина или цис-диамминдихлорплатина (II) является хорошо известным химиотерапевтическим лекарственным средством. Он используется для лечения многочисленных онкологических заболеваний человека, включая рак мочевого пузыря, головы и шеи, легких, яичников и яичек. Эффективен при различных видах рака, включая карциномы, опухоли зародышевых клеток, лимфомы и саркомы. Однако из-за развития резистентности к цисплатину и многочисленных нежелательных побочных эффектов, таких как почечная недостаточность, аллергические реакции, снижение иммунитета к инфекциям, желудочно-кишечные расстройства, кровоизлияние и потеря слуха, особенно у более молодых пациентов, другие платиновые лекарственные средства, такие как карбоплатин, оксалиплатин и проч., стали чаще применяться в противоопухолевой терапии [35].

Начальная чувствительность к препаратам платины – высокая, но у большинства больных в конечном счете происходит рецидив заболевания, резистентного к цисплатину. Следовательно, лекарственная устойчивость развивается у многих пациентов. Для преодоления резистентности цисплатин обычно используется в сочетании с некоторыми другими препаратами [36].

К достоинствам цисплатина, помимо его эффективности, относится то, что механизм его противоопухолевой активности отличается от токсичности других противоопухолевых препаратов [37]. В связи с этим комбинированная химиотерапия с цисплатином стала основой для лечения многих видов рака.

Паклитаксел занимает особое место среди эффективных противоопухолевых химиопрепаратов.

Он характеризуется высокой терапевтической активностью при лечении рака молочной железы, яичников, головы и шеи, а также успешно применяется в случае злокачественных новообразований, не поддающихся традиционной химиотерапии [38].

Паклитаксел относится к цитотоксическим агентам таксана и к числу наиболее часто назначаемых химиотерапевтических средств в онкологии. Паклитаксел является естественным экстрактом, полученным из коры тихоокеанского тисового дерева (*Taxus brevifolia*), который стал коммерчески доступным в 1992 г. Препарат препятствует сборке микротрубочек, способствует полимеризации тубулина в высокостабильные структуры, тем самым нарушает митоз и в конечном итоге приводит к гибели опухолевых клеток [39–42].

Частота положительных ответов во II фазе клинических испытаний таксанов варьирует от 3,3 до 17 %. Сочетания таксанов с платиновыми и другими химиопрепаратами продемонстрировали частоту ответа от 12 до 41 %, что свидетельствует о том, что они более эффективны в комбинированной химиотерапии. Таксаны, как в качестве отдельных агентов, так и в комбинации, могут быть вариантом лечения для некоторых пациентов с метастатической меланомой [43].

Еще одним химиопрепаратом, применяемым для лечения метастатической меланомы, является араноза, разработанная в НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [44–49]. Общая эффективность монотерапии аранозой при лечении диссеминированной меланомы кожи составила 20,6 % [50].

В настоящее время сочетания химиопрепаратов с анти-PD–L1 и PD–L2 интенсивно изучаются при опухолях разных локализаций и молекулярных подтипов. В связи с этим актуальным вопросом остается влияние различных сочетаний химиопрепаратов на уровень экспрессии PD–L1 и PD–L2, мишеней для чекпойнт-терапии.

Материалы и методы

Клеточные линии

Исследования проводили на клеточных линиях меланомы человека mel Mtp, mel Z, mel Kor, mel Ibr, mel P, mel Is, mel Me, mel H, mel Hn, mel Bgf, mel Si, mel Rac, mel Gus, mel Gi, mel Ksen, mel Ch, mel Il, mel R, полученных из опухолевого материала больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [51]. Клеточные линии различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций генов *BRAF* и *TP53* [52–54]. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % сыворотки эмбриона теленка, 2мМ L-глутамина (Sigma, США),

пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при +37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Культуры клеток пересеивали через 3–4 дня.

МТТ-тест

В МТТ-тесте изучали цитотоксическое действие на клеточные линии противоопухолевых препаратов: араинозы, цисплатина и паклитаксела. Препараты добавляли как в монорежиме, так и в комбинации.

Клетки вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты по 7×10^3 клеток в 180 мкл ростовой среды на лунку. Через 24 ч в лунки с клетками добавляли по 20 мкл препаратов. Араинозу добавляли в концентрациях 125, 250 и 500 мкг/мл. Для цисплатина и паклитаксела было выбрано по 9 концентраций с 2-кратным шагом разведения: 0,39–100 мкг/мл и 1,171–300 мкг/мл.

Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч при +37 °С и 5 % CO₂. После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (1 мг/мл, Sigma, Chemical Co, США) и оставляли еще на 4 ч при +37 °С при 5 % CO₂. По окончании инкубации планшеты центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в лунки по 150 мкл диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) для растворения кристаллов формазана, после чего планшеты встряхивали на шейкере для равномерного распределения окрашивания. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуоферментных реакций «Multiscan EX» (ThermoLabsystems, Германия) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Процент живых клеток вычисляли по формуле:

$$N_0 = N_1 / N_2 \cdot 100 \%,$$

где N_0 – процент живых клеток; N_1 – средняя оптическая плотность в лунках, содержащих клетки и препарат; N_2 – средняя оптическая плотность в контрольных лунках, содержащих только клетки.

Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 моль NaCl, 1 моль Трис-НСl рН 8,0, 1 моль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл 0,9 % физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [55]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4 моль тиоционата гуанидина, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % N-лаурил-саркозината натрия и 0,1 моль меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до +4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропаноле проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при +37 °С, растворяли в 20 мкл деионизованной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг мРНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Transcriptase и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизованной водой.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 ммоль трис-НСl, 100 ммоль KCl, 4 ммоль MgCl₂, 1 ммоль каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 ммоль β-меркаптоэтанола) и Taq-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нмоль прямого и 250 нмоль обратного праймера и 140 нмоль флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *PD-L1* и *PD-L2*, доступных на интернет-ресурсе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

В каждом образце был исследован уровень экспрессии генов *PD-L1* и *PD-L2*. Уровень экспрессии

рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DTlite («ДНК-технология», Россия).

Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при +94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при +94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при +60 °С.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Hex. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [56]. В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Реакция иммунофлуоресценции

После 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами клетки снимали с культуральных флаконов раствором Версена и 2 раза отмывали в PBS. Разносили в пробирки по 50 мкл и добавляли по 20 мкл антител к PD-L1 (CD274FITC, 558065, BD Pharmingen™) и к PD-L2 (CD273APC, 557926, BD Pharmingen™). Инкубировали в течение 30 минут, после чего дважды отмывали в PBS. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII, с использованием программного обеспечения FACSDiva (Bekton Dikenson).

Анализ данных

Для статистического анализа данных использовались непараметрические критерии. Для определения связи между цитотоксичностью препаратов и наличием мутаций в генах *BRAF* и *TP53* или степенью дифференцировки клеток, между наличием мутаций в генах *BRAF* и *TP53* и уровнем экспрессии PD-L1 и PD-L2, а также для сравнения цитотоксической активности различных комбинаций препаратов и связи этих препаратов с уровнем экспрессии PD-L1 и PD-L2 на уровне белка и мРНК использовался критерий Манна-Уитни. Для изучения корреляции между уровнем экспрессии генов PD-L1 и PD-L2 и степенью дифференцировки клеток вычислялся коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты

Для определения эффективных концентраций исследуемых препаратов изучили их цитотоксическую активность на линиях клеток меланомы человека с помощью МТТ-теста, по результатам которого рассчитывали IC50 – концентрацию, при которой

детектировали ингибирование метаболической активности 50 % клеток (см. таблицу).

Определение чувствительности клеток меланомы человека к цитотоксическому действию препаратов показало, что при сопоставлении величины IC50 с наличием мутаций генов *BRAF* или *TP53* связь не выявлена ($p > 0,5$ во всех случаях). Высокодифференцированные линии несколько более чувствительны к препаратам, так как для достижения IC50 требовалась меньшая концентрация препаратов ($p = 0,154$). IC50 комбинации цисплатина с паклитакселом и паклитаксела в монорежиме не различаются ($p = 0,431$).

Определен уровень экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека (рис. 1). Активность белков PD-L1 и PD-L2 не связана со степенью дифференцировки, а также не зависит от наличия мутаций гена *TP53*. Наличие мутации *BRAF* в клеточных линиях меланомы человека связано с меньшим уровнем экспрессии PD-L2 ($p = 0,0117$). Инкубация цисплатина в комбинации с паклитакселом также увеличивает уровень экспрессии белка PD-L1 ($p = 0,037$). Цисплатин и паклитаксел в монорежиме не оказывают влияния на экспрессию белка PD-L1. Уровень экспрессии белка PD-L2 несколько снижается под действием любого препарата, но статистически незначимо ($p = 0,609$).

Также был определен уровень экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 (рис. 2). Уровень экспрессии PD-L2 прямо коррелировал со степенью дифференцировки клеток (коэффициент Пирсона 0,937, $p < 0,15$), а активность гена не связана со степенью дифференцировки. Наличие гена *TP53* не оказывает никакого влияния на экспрессию генов PD-L1 и PD-L2. Интересно, что мутации в гене *TP53* наблюдаются в случае мутаций гена *BRAF* (коэффициент Пирсона 1, $p < 0,15$). Араноза незначимо повышает уровень экспрессии мРНК PD-L1 в линиях меланомы ($p = 0,23$).

Заключение

Согласно полученным нами результатам мутации генов *BRAF* или *TP53* не оказывают влияния на чувствительность к препаратам, представленным в исследовании. Степень дифференцировки клеток также оказывает незначимое влияние. Из этого следует, что паклитаксел, цисплатин и аранозу можно применять независимо от наличия мутаций *BRAF* или *TP53*.

Комбинация цисплатина с паклитакселом по проявленной цитотоксичности может не обладать особыми преимуществами по сравнению с паклитакселом в монорежиме. Не удалось обнаружить каких-то признаков, при которых применение цисплатина с паклитакселом одновременно могло бы быть полезным в клинической практике, так как паклитаксел

Наличие мутаций в клеточных линиях меланомы и IC50 аранозы, цисплатина и паклитаксела, а также сочетания цисплатина и паклитаксела

Клеточные линии	Мутации BRAF	Мутации TP53	Араноза, IC50, мкг	Цисплатин, IC50, мкг	Паклитаксел, IC50, мкг	Сочетание цисплатина и паклитаксела, IC50, мкг
Mel BGF	Нет	–	2000	–	–	–
Mel Ch	Нет	Нет	1300	–	–	–
Mel Gus	Нет	Нет	2000	8,4	14,2	3,62
Mel H	Нет	–	1800	–	–	–
Mel Hn	V600E	P151S и S240F	1500	12,5	2,9	3,54
Mel Ibr	V600E	E171A	2000	6,6	10	3,82
Mel II	V600K	Нет	1900	8	9,7	1,42
Mel Is	V600E	Нет	1300	28	11	3,12
Mel Kor	Нет	Нет	500	–	–	–
Mel Ksen	V600E	–	2000	–	–	–
Mel Me	Нет	–	2000	11,4	8,6	2,00
Mel Mtp	Нет	–	2000	–	–	–
Mel P	V600E	–	1000	–	–	–
Mel R	V600E	–	1500	–	–	–
Mel Rac	Нет	Нет	1250	3,3	2,1	1,08
Mel Si	L597Q	–	1350	–	–	–
Mel Z	V600E	–	800	–	–	–
Mel Gi	V600E	Нет	1550	–	–	–

Примечание. «Нет» – отсутствует экспрессия; «–» нет данных.

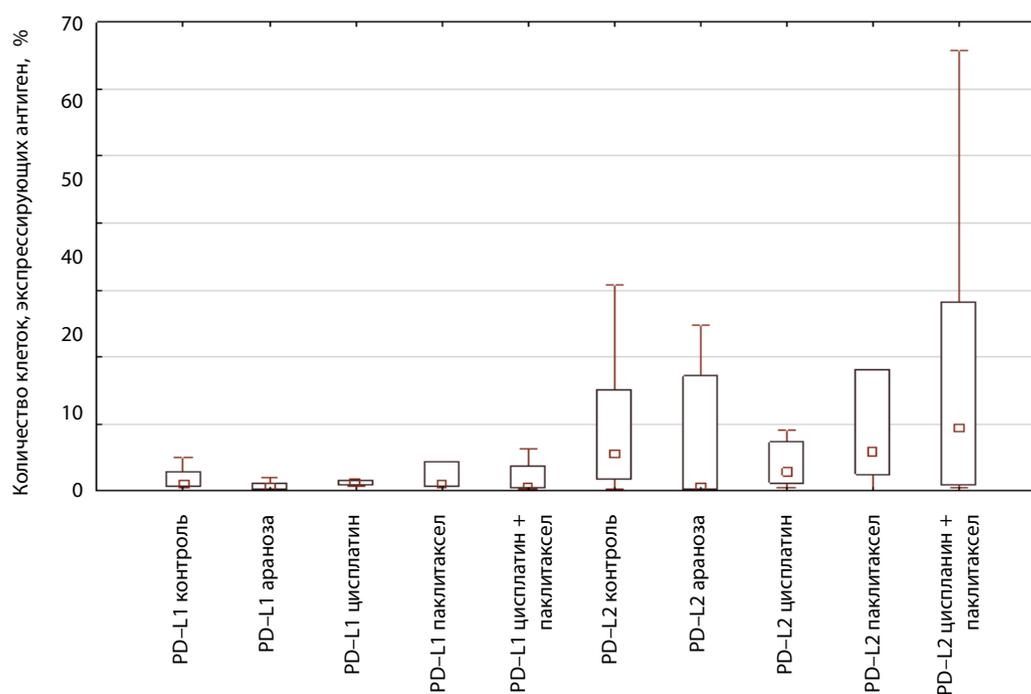


Рис. 1. Уровень экспрессии белков PD-L1 и PD-L2, подвергнутых воздействию различными химиопрепаратами

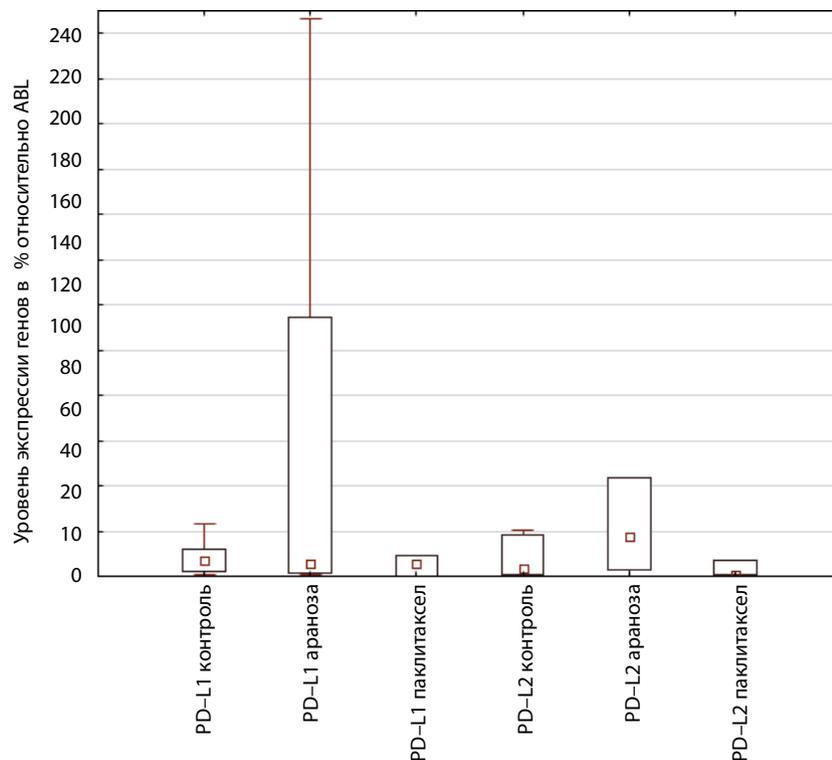


Рис. 2. Уровень экспрессии генов PD-L1 и PD-L2, подвергнутых воздействию различными химиопрепаратами

в монорежиме менее токсичен для организма больного в целом.

С опухолью взаимодействуют не только химиопрепараты, но и иммунная система. Мы показали, что наличие мутаций в гене *BRAF* несколько снижает экспрессию PD-L2. Это открывает новые возможности лечения, так как больные, имеющие мутации *BRAF*, могут получать таргетную терапию не только против киназы *BRAF*, но и анти-PD-терапию.

Исследованные препараты практически не оказывают влияния на уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2

как на уровне белка, так и на уровне мРНК. Из этого следует, что сочетание анти-PD-терапии и противоопухолевых препаратов, таких как паклитаксел и араноза, потенциально не снизит эффективность чекпойнт-терапии, и может иметь большие перспективы.

Таким образом, при терапии больных сочетанием цисплатина и паклитаксела можно порекомендовать использование ингибиторов взаимодействия PD-1 и PD-Ls. Возможно, лучше не включать в терапию паклитаксел из-за опасности ухода опухоли от иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Berger M.F., Hodis E., Heffernan T.P. et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent *PREX2* mutations. *Nature* 2012;485(7399):502–6. PMID: 22622578. DOI: 10.1038/nature11071.
- Pleasant E.D., Cheetham R.K., Stephens P.J. et al. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* 2010;463(7278):191–6. PMID: 20016485. DOI: 10.1038/nature08658.
- van den Hurk K., Niessen H.E., Veeck J. et al. Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826(1):89–102. PMID: 22503822. DOI: 10.1016/j.bbcan.2012.03.011.
- Sosman J.A., Kim K.B., Schuschter L. et al. Survival in *BRAF* V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* 2012;366(8):707–14. PMID: 22356324. DOI: 10.1056/NEJMoa1112302.
- Jakob J.A., Bassett R.L. Jr., Ng C.S. et al. *NRAS* mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer* 2012;118(16):4014–23. PMID: 22180178. DOI: 10.1002/cncr.26724.
- Long G.V., Menzies A.M., Nagrial A.M. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic *BRAF* in metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2011;29(10):1239–46. PMID: 21343559. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.4327.
- Klein R.M., Aplin A.E. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Cancer Res* 2009;69(6):2224–33. PMID: 19244113. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3201.

8. Arozarena I., Sanchez-Laorden B., Packer L. et al. Oncogenic BRAF induces melanoma cell invasion by downregulating the cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A. *Cancer Cell* 2011;19(1):45–57. PMID: 21215707. DOI: 10.1016/j.ccr.2010.10.029.
9. Zelboraf® (Vemurafenib) US prescribing information 2014. Genentech USA, Inc. South San Francisco, CA [Электронный ресурс]. URL: http://www.gene.com/download/pdf/zelboraf_prescribing.pdf.
10. Tafinlar® (Dabrafenib) US prescribing information 2014. GlaxoSmithKline. Research Triangle Park, NC [Электронный ресурс]. URL: http://us.gsk.com/products/assets/us_tafinlar.pdf.
11. Mekinist® (Trametinib) US prescribing information 2014. GlaxoSmithKline. Research Triangle Park, NC [Электронный ресурс]. URL: http://us.gsk.com/products/assets/us_mekinist.pdf.
12. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54. PMID: 12068308. DOI:10.1038/nature00766.
13. Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей. *Онкопедиатрия* 2017;4(1):49–55. DOI: 10.15690/onco.v4i1.1684. [Klyuchagina Y.I., Sokolova Z.A., Baryshnikova M.A. Role of PD-1 Receptor and Its Ligands PD-L1 and PD-L2 in Cancer Immunotherapy. *Onkopediatriya = Onkopediatrias* 2017;4(1):49–55. (In Russ.)].
14. Чкадуа Г.З. Подходы к иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):118. [Chkadua G.Z. Approaches to Cancer Immunotherapy. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):118 (In Russ.)].
15. Барышникова М.А., Кособоква Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):6–14. (In Russ.)].
16. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 1992;11:3887–95. PMID: 1396582. DOI:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.
17. Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Рудакова А.А. и др. Изменение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии различных лекарственных форм аранозы и «пустых» липосом. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):74–81. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-74-81. [Ponomarev A.V., Misyurin V.A., Rudakova A.A. et al. The influence of aranoza drug formulations and “empty” liposomes on the expression of PD-L1 and PD-L2 in human melanoma cell lines. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(2):74–81. (In Russ.)].
18. Pedoeem A., Azoulay-Alfaguter I., Strazza M. et al. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol* 2014;153(1):145–52. PMID:24780173. DOI:10.1016/j.clim.2014.04.010.
19. Francisco L.M., Sage P.T., Sharpe A.H. The PD-1 pathway in tolerance and auto-immunity. *Immunol Rev* 2010;236:219–42. PMID: 20636820. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x.
20. Ishida M., Iwai Y., Tanaka Y. et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 2002;84(1):57–62. PMID: 2161284. DOI: 10.1016/s0165-2478(02)00142-6.
21. Shin D.S., Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what’s here, what’s next? *Curr Opin Immunol* 2015;33:23–35. PMID: 25621841. DOI: 10.1016/j.coi.2015.01.006.
22. Рудакова А.А., Пономарев А.В., Бурова О.С. и др. Изменение уровня экспрессии лигандов белка PD1 в клетках линий меланомы человека после воздействия субстанции и липосомальной лекарственной форм аранозы *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(1):68. [Rudakova A.A., Ponomarev A.V., Burova O.S. et al. Change of PD1 ligands expression level after Aranose substance and liposomal drug formulation in melanoma cell lines. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(1):68. (In Russ.)].
23. Рудакова А.А., Мисюрин В.А., Пономарев А.В. и др. Возможность моделирования активности маркеров PD-L1 и PD-L2 на поверхности клеточек меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(специальный выпуск): 64. [Rudakova A.A., Misyurin V.A., Ponomarev A.V. et al. Modulation of PD-L1 and PD-L2 activity on melanoma cells. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue): 64. (In Russ.)].
24. Intlekofer A.M., Thompson C.B. At the bench: preclinical rationale for CTLA-4 and PD-1 blockade as cancer immunotherapy. *J Leukoc Biol* 2013;94(1):25–39. PMID:23625198. DOI: 10.1189/jlb.1212621.
25. Iwai Y., Terawaki S., Honjo T. PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* 2005;17(2):133–44. PMID: 15611321. DOI: 10.1093/intimm/dxh194.
26. Жуликов Я.А., Фетисов Т.И., Самойленко И.В., Демидов Л.В. Механизмы резистентности метастатической меланомы кожи к анти-PD-1 терапии. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(1):34–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-34-46. [Zhulikov Ya.A., Fetisov T.I., Samoylenko I.V., Demidov L.V. Mechanisms of resistance to anti-PD-1 therapy in metastatic cutaneous melanoma *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(1):34–46. (In Russ.)].
27. Topalian S.L., Sznol M., McDermott D. F. et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014;32:1020–30. PMID: 24590637. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.0105.
28. Wargo J.A., Reuben A., Cooper Z.A. et al. Immune effects of chemotherapy, radiation, and targeted therapy and opportunities for combination with immunotherapy. *Semin Oncol* 2015;42(4):601–16. PMID: 26320064. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.05.007.
29. Postow M.A., Chasalow S.D., Yuan J. et al. Pharmacodynamic effect of ipilimumab on absolute lymphocyte count (ALC) and association with overall survival in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol* 2013;31(15):abstr 9052.
30. Donia M., Fagone P., Nicoletti F. et al. BRAF inhibition improves tumor recognition by the immune system: potential implications for combinatorial therapies against melanoma involving adoptive T-cell transfer. *Oncoimmunology* 2012;1:1476–83. PMID: 23264894. DOI: 10.4161/onci.21940.

31. Frederick D.T., Piris A., Cogdill A.P. et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor micro-environment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2013;19:1225–31. PMID: 23307859. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1630.
32. Jiang X., Zhou J., Giobbie-Hurder A. et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD–L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19:598–609. PMID: 23095323. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2731.
33. Cooper Z.A., Juneja V.R., Sage P.T. et al. Response to BRAF inhibition in melanoma is enhanced when combined with immune checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* 2014;2:643–54. PMID: 24903021. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0215.
34. 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. PMID: 23550685. DOI: 10.1056/NEJMc1302338.
35. Dasari S., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Europ J Pharm* 2014;740:364–78. PMID: 25058905. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025P.
36. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev* 2002;2:48–58. PMID: 11902585. DOI: 10.1038/nrc706.
37. O'Dwyer P.J., Stevenson J.P., Johnson S.W. Clinical Pharmacokinetics and administration of established platinum drugs. *Drugs* 2000;59:19–27. PMID: 10864227. DOI: 10.2165/00003495-200059004-00003.
38. Мартынова М.А., Бушмакина И.М., Шуканова Н.А., Молчан М.М. Влияние нанолипосомальной формы паклитаксела на злокачественные опухоли женских репродуктивных органов. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(специальный выпуск):44. [Martyanova M.A., Bushmakina I.M., Shukanova N.A., Molchan M.M. Effect of nanoliposomal Paclitaxel on tumors of female reproductive system. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue):44. (In Russ.)].
39. Rowinsky E.K., Donehower R.C. Paclitaxel(taxol). *N Engl J Med* 1995;332:1004–14. PMID: 7885406. DOI: 10.1056/NEJM199504133231507.
40. Cortes J.E., Pazdur R. Docetaxel. *J Clin Oncol* 1995;13(10):2643–55. PMID: 7595719. DOI: 10.1200/JCO.1995.13.10.2643.
41. Gelmon K. The taxoids: paclitaxel and docetaxel. *Lancet* 1994;344:1267–72. PMID: 7967989. DOI:10.1016/s0140-6736(94)90754-4.
42. Von Hoff D.D., Ervin T., Arena F.P. et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med* 2013;369:1691–703. PMID: 24131140. DOI: 10.1056/NEJMoa1304369.
43. Gogas H., Bafaloukos D., Bedikian A.Y. The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2004;14:415–20. PMID: 15457099. DOI: 10.1097/00008390-200410000-00013.
44. Шпрах З.С., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В. Валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(специальный выпуск):84. [Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartseva I.V. Validation of the method of quantitative determination of Aranose in a dosage form. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(Special Issue): 84. (In Russ.)].
45. Шпрах З.С., Игнатъева Е.В., Ярцева И.В. Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):57–62. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62. [Shprakh Z.S., Ignateva E.V., Yartseva I.V. Development and validation of aranosa assay in the dosage form. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(2):57–62. (In Russ.)].
46. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Бурова О.С. и др. Активация инициаторных каспаз-8 и -9 под влиянием лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):7. [Afanasyeva D.A., Baryshnikova M.A., Burova O.S. et al. Activation of initiator caspase-8 and -9 by aranose drug formulations. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):7. (In Russ.)].
47. Полозкова С.А., Горбунова В.А., Орел Н.Ф. Эффективность и токсичность комбинации аранозы и доxorubicина при метастатических нейроэндокринных неоплазиях. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(1):88. [Polozkova S.A., Gorbunova V.A., Orel N.F. Effect and toxicity of Aranose and Doxorubicin combination on metastatic neuroendocrine tumors. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(1):88. (In Russ.)].
48. Полозкова С.А., Горбунова В.А., Делекторская В.В. и др. Факторы прогноза эффективности терапии нейроэндокринных новообразований режимами на основе Аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(1):38–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-38-46. [Polozkova S.A., Gorbunova V.A., Delektorskaya V.V. et al. Prognostic factors of the efficacy of aranosa-based therapy in neuroendocrine neoplasms. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(1):38–46. (In Russ.)].
49. Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Рудакова А.А. и др. Изменение экспрессии мРНК MDM2 и NFκB1 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии 2 лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(3):52–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-52-58. [Ponomarev A.V., Misyurin V.A., Rudakova A.A. et al. The influence of drug formulations on the expression of MDM2 and NFκB1 mRNA in the melanoma cell lines *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(3):52–8. (In Russ.)].
50. Харкевич Г.Ю., Егоров Г.Н., Манзюк Л.В. и др. Отечественные нитрозопроизводные в лечении меланомы кожи. *Российский биотерапевтический журнал* 2003;2(1):49–53. [Kharkevich G. Yu., Egorov G.N., Manzyuk L.V. et al. Russian nitrosoureas in skin melanoma therapy. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2003;2(1):49–53. (In Russ.)].
51. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;76:37–40. [Mikhailova I.N., Lukashina M.I., Baryshnikov A.Yu., et al. Melanoma cell lines as the basis for antitumor vaccine preparation. *Bulletin of RAMS = Annals of the Russian academy of medical sciences* 2005;7:37–40. (In Russ.)].
52. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;37(1):29–39. [Mikhailova I.N., Kovalevsky D.A., Burova O.S. Expression of Cancer Testis Antigens in Human Melanoma. *Sibirskiy*

- oncologicheskii journal = Siberian journal of Oncology 2010;37(1):29–39. (In Russ.).
53. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена B-RAF на способность клеток меланомы к аутофагии. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2013;3:68–72. [Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A. et al. Effect of Activating V600 mutations of the B-RAF gene on the ability of melanoma cells to autophagy. Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Sarkomas of Bones, Soft Tissues and Skin Tumors 2013;(3):68–72. (In Russ.)].
54. Пономарев А.В., Солодовник А.А., Мкртчян А.С. и др. Связь делеций и точечных мутаций гена p53 с резистентностью клеточных линий метастатической меланомы кожи к аранозе. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):64–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-64-69. [Ponomarev A.V., Solodovnik A.A., Mkrtychyan A.S. et al. Relationship between deletion and point mutations of p53 and drug resistance to aranoza in human melanoma cell lines. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):64–9. (In Russ.)].
55. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;1(2):581–5. PMID: 2440339. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
56. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. Methods Mol Biol 2013;999:1–23. PMID: 23666687. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_1.

ORCID авторов/ ORCID of authors

А.А. Рудакова/ A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

В.А. Мисюрин/ V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>

А.В. Пономарев/ A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>

О.С. Бурова/ O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>

А.В. Мисюрин/ A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

М.А. Барышникова/ M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ОСОБЕННОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ РАЗРАБОТКИ ЛИОФИЛИЗАТА ГК-2 ДЛЯ ПАРЕНТЕРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Е.В. Блынская, С.В. Тишков, К.В. Алексеев, С.В. Минаев

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

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

Введение. Раздел «Фармацевтическая разработка» является неотъемлемой частью регистрационного досье при разработке лекарственной формы, однако особое значение данный процесс приобретает для лиофилизированных лекарственных форм (ЛФ) ввиду чувствительности лиофилизации к малейшим изменениям в температурном режиме, давлении и других факторах.

Цель исследования – продемонстрировать возможности методов, показанных в ICHQ8 «Фармацевтическая разработка», ICH Q9 «Управление рисками для качества» и «Руководство по разработке и производству лекарственного препарата (фармацевтическая разработка)» (ЕврАзЭС).

Материалы и методы. Данные методы использованы при разработке лиофилизированной ЛФ для парентерального применения на основе оригинальной фармацевтической субстанции гексаметиленамид бис- (N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) ГК-2, обладающей нейропротекторной активностью. Исследования проводились при использовании субстанции ГК-2, а в качестве вспомогательных веществ применяли: лиопротектор – сахарозу, криопротекторы – среднецепочные полиэтиленгликоли (ПЭГ) 1500, 4000, 6000.

Результаты. Оценены риски, возникающие во время производства ЛФ лиофилизата для парентерального применения, на основе диаграммы причин и следствий (диаграмма Ишикавы). Исходя из диаграммы, определены основные факторы, влияющие на качество конечного продукта, а также проанализированы критические параметры процессов, критические контрольные точки и взаимосвязанные с ними критические параметры качества модельных составов лиофилизата ГК-2 для парентерального применения.

Заключение. По полученным данным предложены модельный состав, показавший оптимальные технологические и биофармацевтические свойства, и технологическая схема его производства.

Ключевые слова: лиофилизат для парентерального применения, ICHQ8 «Фармацевтическая разработка», диаграмма «Ишикавы»

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-81-90

FEATURES PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT LYOPHILISATE GK-2 FOR PARENTERAL USE

E. V. Blynskaya, S. V. Tishkov, K. V. Alekseyev, S. V. Minaev

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

Introduction. The section «Pharmaceutical development» is an integral part of the registration dossier when developing a dosage form, however, this process is of particular importance for lyophilized dosage forms (LF), due to the sensitivity of lyophilization to the slightest changes in temperature, pressure and other factors.

The purpose of this work is to demonstrate the capabilities of the methods shown in ICHQ8 Pharmaceutical Development, ICH Q9 Quality Risk Management and Guidelines for the Development and Production of a Drug Product (Pharmaceutical Development) (EurAsEC).

Materials and methods. These methods are used in the development of a LF for parenteral use based on the original pharmaceutical substance hexamethylene amide bis- (N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine) GK-2, which has neuroprotective activity. The studies were carried out using the substance GK-2, and as excipients: lyoprotectant – sucrose, cryoprotectants – medium chain polyethylene glycols 1500, 4000, 6000.

Results. The risks arising during the production of LF of a lyophilisate for parenteral use are estimated on the basis of a cause and effect diagram (Ishikawa diagram). Based on the chart, identified the main factors affecting the quality of the final product. Also, the critical parameters of the processes, critical control points and interrelated critical parameters of quality, model compositions of the lyophilisate GK-2 for parenteral use were analyzed.

Conclusion. According to the data obtained, a model composition has been proposed, which has shown the optimal technological and biopharmaceutical properties and the technological scheme of its production.

Key words: lyophilizate for parenteral use, ICH Q 8 «Pharmaceutical development», Diagram Ishikawa

Введение

Предпосылки к появлению современного понятия о фармацевтической разработке появились в европейском сообществе еще более 50 лет назад. Именно тогда все отчетливее стали звучать требования о предоставлении результатов изучения свойств сырья и полупродуктов и увязывания этих свойств с технологией и с качеством готовой продукции в пакете регистрационных документов. Об этом же говорится в докладе Комитета экспертов ВОЗ, где указано, что из соображений обеспечения качества лекарственных продуктов данные по фармацевтической разработке должны составлять неотъемлемую часть регистрационного досье. Примерно тогда же, в 60-х годах прошлого века, в США был сформулирован основной тезис, который также является ключевым положением первой части ICH Q8 (ICH – International Conference Harmonization; ICH Q8 – гармонизированное трехстороннее руководство «Фармацевтическая разработка»): «Качество не может быть вложено в продукт путем его тестирования после завершения производственного цикла, – оно должно быть «встроено» (built in) в него, начиная с концепции проекта и на протяжении всех этапов разработки и производства».

К настоящему моменту процесс фармацевтической разработки имеет документально-методическую базу и является неотъемлемой частью проектного и предпроектного менеджмента и способствует оценкам рисков при создании и внедрении готовых лекарственных препаратов (ЛП). Появился основополагающий документ, включающий вышеупомянутый тезис: руководство ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» (ICH Q8 Pharmaceutical Development), которое разработано в рамках Международной конференции по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для человека, и в настоящий момент разрабатывается «Руководство по разработке и производству лекарственного препарата (фармацевтическая разработка)», регламентирующее порядок фармацевтической разработки на территории Евразийского экономического союза [1].

В нашей стране руководство носит законодательный характер и раздел «Фармацевтическая разработка» в обязательном порядке входит в регистрационное досье на ЛП, потому как оно также способствует пониманию качества продукта и процесса производства, позволяет экспертам и инспекторам определять, какие элементы процесса производства должны контролироваться и каким образом. И в настоящее время перспективным является использование фармацевтической разработки как методической основы улучшения качества фармацевтических продуктов применительно к различным лекарственным формам (ЛФ). В частности, к ЛФ имеющим значительное количество критических параметров и контрольных

точек, влияющих на качество продукта относятся лиофилизаты для приготовления инъекций.

Ллиофилизаты – ЛФ, используемая в технологии высокочувствительных фармацевтических субстанций (ФС), часто пептидной природы, для которых неприемлемы другие способы обработки, так как лиофилизация обеспечивает стабильность готовой ЛФ при хранении и транспортировке лекарственных средств. Однако лиофилизация представляет собой процесс, имеющий много нюансов и частые проблемы на этапе разработки и производства ЛФ, поэтому методология фармацевтической разработки особенно актуальна в этой области. Как было сказано выше, в технологии лиофилизации чувствительных ФС, в частности пептидных, имеется много контрольных точек, которые обуславливают фармацевтические риски. Поэтому еще на этапе разработки состава и технологии необходимо применять «Руководство по разработке и производству лекарственного препарата (фармацевтическая разработка)», ICHQ8 «Фармацевтическая разработка» и ICHQ9 «Управление рисками для качества».

Цель исследования – разработка технологии лиофилизата для парентерального применения на основе пептида ГК-2 с учетом требований, изложенных в «Руководстве по разработке и производству лекарственного препарата (фармацевтическая разработка)», а также ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» и ICH Q9 «Управление рисками для качества».

Материалы и методы

Исследование основывается на разработке технологии ЛФ, анализе воздействия критических точек производства и оценке их влияния на итоговое качество лиофилизата в соответствии с методами, отраженными в руководстве ICH Q8 «Фармацевтическая разработка».

Объект исследования: ФС ГК-2 (гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Россия) (рис. 1). вспомогательные вещества: лиопротектор – сахароза (CompriSugar) (CristalUnion, Франция), криопротекторы – полиэтиленгликоль 1500, 4000, 6000 (ПЭГ, макрогол) (Polyglykol® 1500, USP, Polyglykol® 4000, 6000, Panreac, Испания).

Используемое оборудование

Ллиофильная сушилка EdwardsEF-6 (Edwards, Италия), Влагомер Sartorius MA – 35 (Sartorius, Германия), измеритель уровня кислотности (pH) раствора Sartorius Basic Meter PB-11 (Sartorius, Германия), криоскопический осмометр Osmomat® 030 (Gonotec, Германия), дифференциальный сканирующий калориметр STA 449 F1 Jupiter® (Netzsch, Германия), поляризационный микроскоп (Olympus CX31-P).

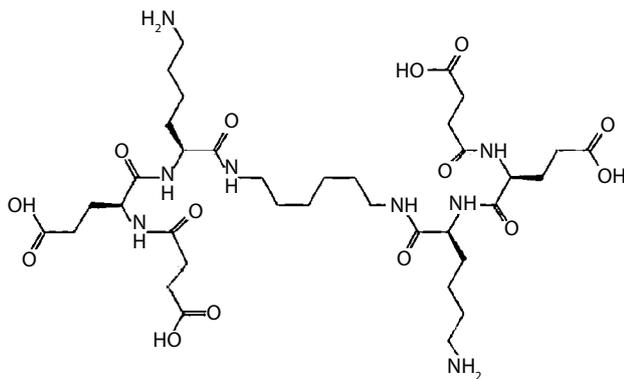


Рис. 1. Структурная формула ГК-2

Используемые методики анализа

1. Методика определения времени восстановления лиофилизата (ГФ XIII, т. 1, ОФС. 1.4.1.0010.15 Порошки).
2. Методика определения потери в массе при высушивании (по ГФ XIII, т. 1, ОФС 1.2.1.0010.15).
3. Методика определения pH (ГФ XIII, т. 1, ОФС 1.2.1.0004.15).
4. Методика определения осмолярности (ГФ XIII, т. 1, ОФС 1.2.1.0003.15);.
5. Методика определения кристалличности (Оптическая микроскопия в поляризованном свете; ГФ XIII, том 1, ОФС 1.1.0018.15).

Температурный режим замораживания

«Медленное» замораживание: препарат загружали на полку лиофильной сушилки при температуре $+24 \pm 2$ °С, охлаждали полку до -25 ± 2 °С за 1 ч при скорости $0,84$ °С/мин. Далее полки охлаждали от -25 ± 2 до -35 ± 2 °С еще в течение часа при скорости $0,167$ °С/мин, затем температура полок падала от -35 ± 2 до -45 °С в течение 1 ч, и выдерживали температурное плато 2 ч. Общее время заморозки 5 ч и средняя скорость охлаждения $0,383$ С/мин.

«Быстрое» замораживание: препарат загружали на полку лиофильной сушилки при температуре $+24 \pm 2$ °С, охлаждали полку за 1 ч до -20 ± 2 °С, и в течение следующего часа до -45 °С. Выдерживали при данной температуре 2 ч. Общее время заморозки 4 ч при средней скорости заморозки $0,575$ °С/мин.

Условия проведения лиофилизации

Флаконы с ЛФ ГК-2, растворенной в воде для инъекций, устанавливают на полку камеры сублимационной установки Edwards. Затем герметично закрывают камеру сушилки и ведут охлаждение при разных режимах замораживания до достижения указанной температуры. Процесс заморозки продолжается до -45 °С примерно в течение 4–5 ч в зависимости от режима. За 30 мин до начала сушки начинают охлаж-

дение конденсатора. После охлаждения конденсатора до -60 °С включают вакуумный насос. Выключают охлаждение полок, включают нагрев полок до температуры от -18 до -37 °С, в зависимости от состава модельной смеси (поскольку первичная сушка проводилась при температурах на 2 градуса ниже эвтектической температуры), нагрев полок происходит со скоростью $0,75$ °С/мин. Вакуум в пределах $0,08$ мбар достигается в течение 15 мин. Процесс первичной сушки длится приблизительно 20 ч. Затем поднимают температуру до $+8$ °С за 3 ч и сушат флаконы при указанной температуре. Процесс вторичной сушки длится 21 ч.

По истечении указанного времени выключают нагрев полок, вакуум и конденсатор, выравнивают давление в камере и вынимают флаконы с продуктом. Об окончании процесса сушки можно судить по изменению давления в камере.

Вакуум создают по завершении этапа замораживания, и начинается процесс первичной сушки – давление в камере падает до $0,01$ мбар. В течение первичной сушки (20 ч) давление в камере равно $6,8–8,0 \cdot 10^{-2}$ мбар. На этапе вторичной сушки (21 ч) давление составляет примерно $5,9–6,0 \cdot 10^{-2}$ мбар. Окончание сушки определяют с помощью измерения давления в камере при закрытии переходного клапана.

Результаты и обсуждение

Фармацевтическая разработка применительно ко всем ЛФ должна включать как минимум следующие элементы:

- Определение профиля целевого продукта, поскольку это имеет отношение к качеству, безопасности и эффективности, при рассмотрении, например, пути введения ЛФ, биодоступность, дозировку и стабильность.
- Выделение необходимых критических параметров качества (CQAs) фармацевтического продукта для возможности изучения и контроля характеристик продукта, которые оказывают воздействие на его качество.
- Определение качественных параметров лекарственных субстанций, наполнителей и т. п., входящих в препарат, а также выбор типа и количества наполнителей для получения фармацевтического продукта желаемого качества.
- Выбор соответствующего технологического процесса.
- Установление стратегии контроля выбранного технологического процесса [1].

В целях изучения лиофилизатов для приготовления растворов для инъекций выделили основные методологические приемы, с помощью которых следует проанализировать данные, полученные применительно к нашей ЛФ. Прежде всего это *критические*

параметры качества (КПК), являющиеся физическими, химическими, биологическими или микробиологическими свойствами или характеристиками, которые должны находиться в пределах соответствующих границ, диапазона или распределения, для обеспечения желаемого качества продукта. Критические параметры качества в технологии лиофилизации связаны с субстанцией препарата, наполнителями, крио- и лиопротекторами, растворителями, растворами для лиофилизации и готовой ЛФ. Из этого определения вытекает такой важный показатель, как **критический параметр процесса** (Critical Process Parameter) (КПП).

КПП – параметр процесса, изменчивость которого влияет на критический параметр качества, и поэтому должен подлежать контролю и мониторингу для того, чтобы гарантировать, что процесс приведет к получению желаемого качества [1]. В технологии лиофилизации к таким параметрам процесса относятся температура полки лиофильной сушки во время всех стадий лиофилизации, скорость охлаждения

и нагрева камеры во время заморозки и между стадиями процесса первичной и вторичной сушки, длительность процесса заморозки и сублимации, давление в камере, укупорка.

Соответственно, определяется и контролируется КПП с использованием инструментов, представленных в руководстве ICH Q9 «Управление рисками для качества» [2], а именно «Анализ опасности и критические контрольные точки (Hazard Analysis of Critical Control Points, HACCP)». В данном разделе основное внимание уделено понятию «критическая контрольная точка» (ККТ) и тому, как с помощью ККТ совершенствовать управление рисками.

ККТ – точка, в которой необходимо провести контроль для предупреждения или ликвидации опасности или уменьшить ее до допустимого уровня. На начальном этапе перечень потенциальных параметров, воздействующих на лиофилизацию (оценка рисков), может быть весьма обширным, но в процессе углубленного изучения процесса может быть сужен, что позволит оптимизировать технологический

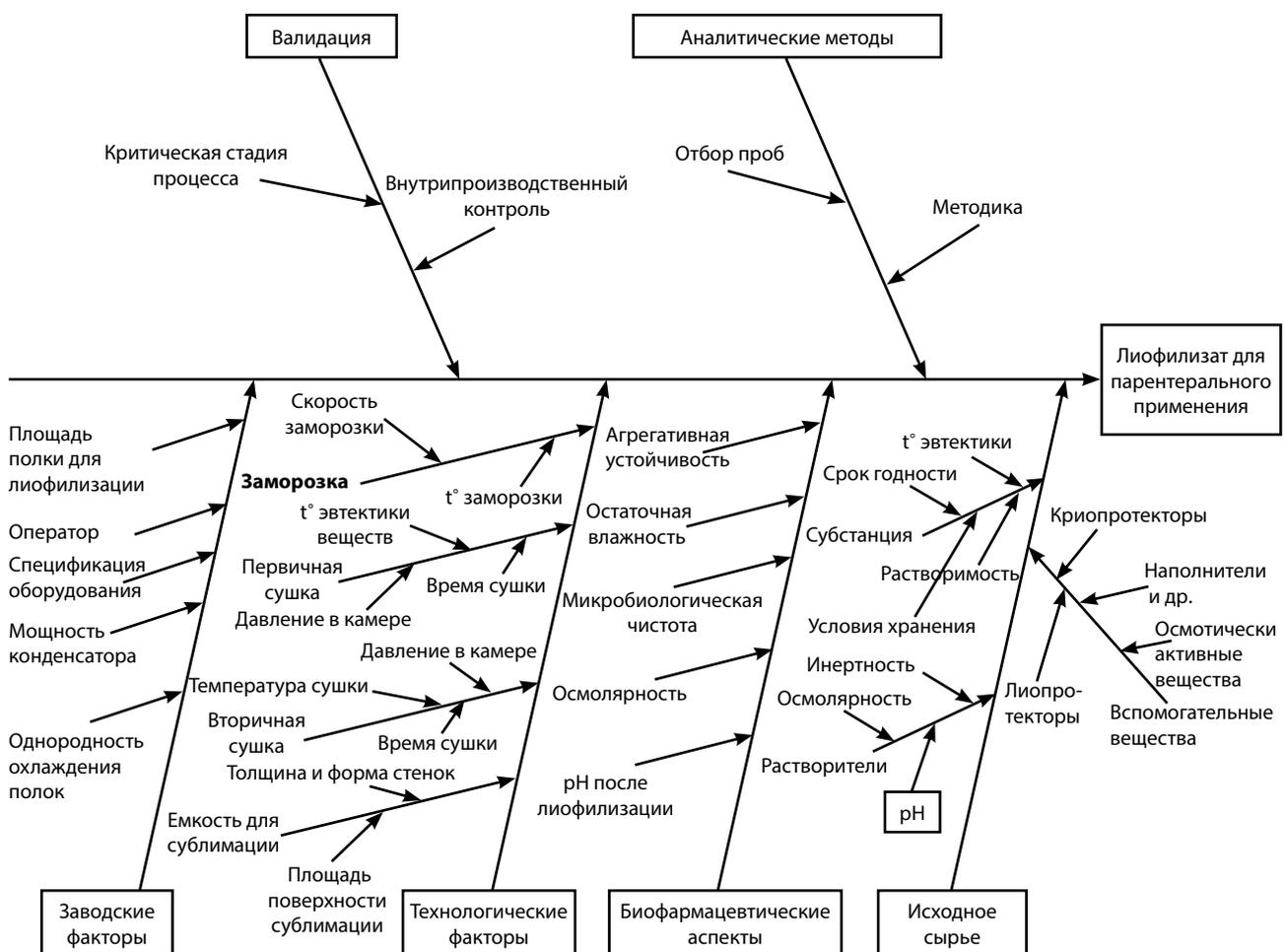


Рис. 2. Диаграмма Ишикавы получения лиофилизатов для парентерального применения

процесс производства лиофилизатов с высокой долей вероятности снижения рисков.

Одним из наиболее распространенных и простых методов анализа оценки рисков может служить диаграмма причин и следствий, так называемая диаграмма Ишикавы («рыбий скелет»). С помощью диаграммы Ишикавы можно оценить переменные, основываясь на вероятности, серьезности, и способности к обнаружению, используя анализ действия режима отказа (FMEA) или подобные инструменты, основанные на первоначальном знании и исходных экспериментальных данных.

Анализ диаграммы (рис. 2) наглядно показывает, что причинами возникновения возможных рисков производства лиофилизата для парентерального применения являются исходное сырье, технологические факторы, заводские и биофармацевтические факторы, а также аналитические методы и валидация процесса.

Основное влияние на качество готовой ЛФ в виде лиофилизата для парентерального применения оказывают 2 основных фактора: технологические факторы и вспомогательные вещества (ВВ). Эти 2 фактора взаимосвязаны и влияют друг на друга, в частности состав и количество ВВ в технологии лиофилизации влияют на выбор температурных режимов заморозки и сублимационной сушки. Также ВВ оказывают определяющее действие на возможность лиофилизации, на стабильность исходной субстанции и на биофармацевтический аспект.

В случае лиофилизатов для парентерального применения на биофармацевтический аспект основное влияние оказывает стабильность продукта, так как необходимая биодоступность обеспечивается парентеральной формой применения. В случае лиофилизации субстанции ГК-2 осуществлен подбор как криопротектора, так и лиопротектора и соотношения между ними и субстанцией. Леопротектор и криопротектор, действуя на разные звенья процесса (криопротектор на стадии замораживания и первичной сублимации, лиопротектор на стадии замораживания и вторичной сублимации), не только дополняют друг друга функционально, но и снижают степень негативного воздействия друг друга [3, 4]. Этому удалось добиться, подобрав вид и соотношение ВВ. При разработке лиофилизата ГК-2 сублимационная сушка ФС без ВВ оказалась неприемлемой, так как полученный лиофилизат не соответствовал показателям, указанным в ГФ XIII. Поэтому первоначально исследовали монокомпонентные составы ФС с крио- и лиопротекторами, но из-за температурных воздействий на ФС наблюдались непрозрачность, сильное изменение рН, и в том числе в некоторых случаях несоответствие лиофилизата по внешнему виду. При этом оптимальные характеристики показали модельные

составы, содержащие крио- и лиопротектор в определенных соотношениях, соответственно среднемолекулярные полиэтиленгликоли (1500, 4000, 600) и сахарозу в качестве лиопротектора. Оптимальные соотношения криопротектора к лиопротектору составили 20:80, 70:30, 80:20 и 90:10, поскольку при этих соотношениях достигается оптимальная макромолекулярная структура из-за добавления частично кристаллизующегося криопротектора, и при этом лиопротектор сахароза, взаимодействуя с гидрофильными группами ФС, приводила к дополнительной стабилизации пептидной молекулы ГК-2 во время вторичной сушки.

В процессе разработки готовой ЛФ, как уже было отмечено выше, необходимо ввести в качестве КПП скорость заморозки, температуру первичной сушки, длительность сублимации и другие факторы, которые влияют на агрегацию и деструкцию субстанции. Поэтому при разработке лиофилизата ГК-2 использовали «быстрый» (средняя скорость заморозки 575 °С/мин) и «медленный» (средняя скорость заморозки 0,383 °С/мин) режимы замораживания. Для определения наиболее оптимального состава устойчивого к температурным воздействиям, как представлено выше, только модельные составы с оптимальным соотношением крио- и лиопротектора соответствовали КПК. Первичную сублимацию проводили при температурных режимах на несколько градусов ниже эвтектических температур, определяемых на дифференциальном сканирующем калориметре (рис. 3). Например, состав ГК-2:ПЭГ 4000:сахароза с соотношением компонентов в мг 1:80:20 лиофилизировали при температуре минус 24 °С в связи с тем, что при сублимации выше эвтектической возникает явление «коллапс» (разрушение структуры лиофилизата).

А режим вторичной сушки подбирали, исходя из свойств ФС, ее температурной устойчивости (так как субстанция подвергается деструкции при температуре выше 10 °С), поэтому выбранная температура составляет 8 ± 2 °С и соответственно время вторичной сушки 21 ч. В соответствии с представленными данными в качестве ККТ следует назвать такие стадии, как приготовление раствора, стерилизация фильтрованием, замораживание, первичная сушка, вторичная сушка и укупорка.

КПК, такие как внешний вид, прозрачность раствора, рН, остаточная влажность, микробиологическая чистота, демонстрируют взаимосвязь с КПП в отношении стабильности субстанции во время лиофилизации. Оценка этих показателей должна быть на всех этапах разработки, а не только в готовом продукте, поскольку это дает возможность узнать, на каком именно этапе происходят основные деструктивные процессы и какие факторы оказывают большее воздействие на субстанцию. Такие критические параметры качества, как

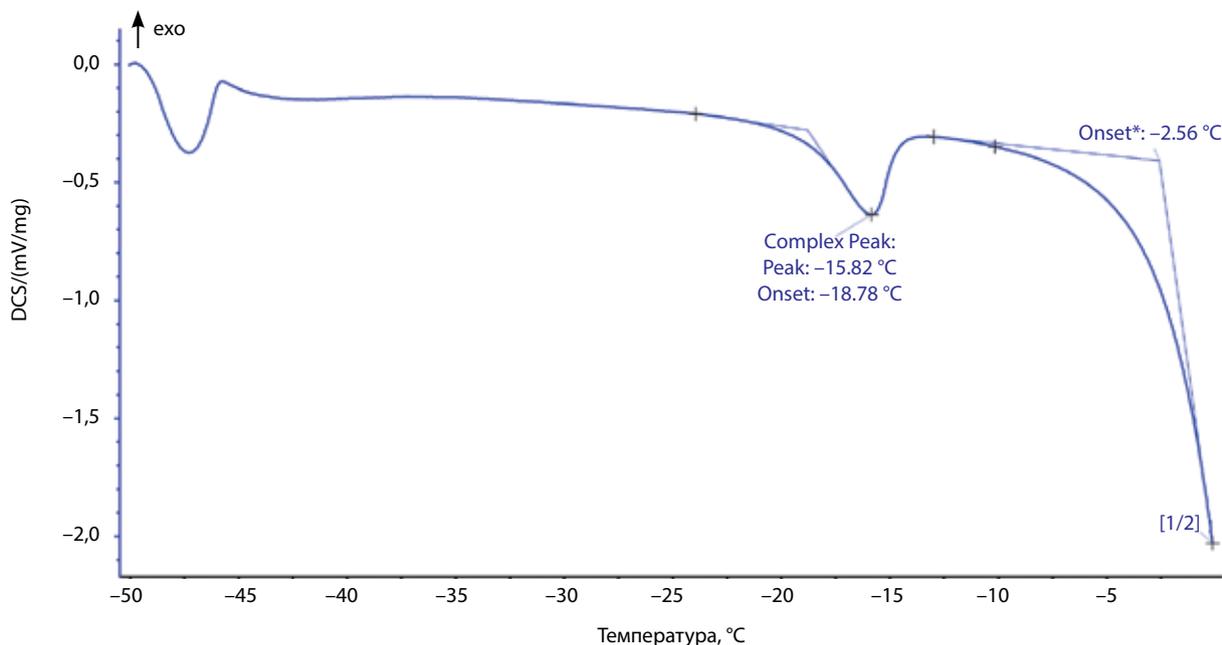


Рис. 3. Дифференциальная сканирующая калориметрия модельного состава ГК-2:сахароза:ПЭГ 4000 с соотношением компонентов, мг, 1:20:80

прозрачность и рН после лиофилизации, имеют критическое значение для лиофилизатов, так как они относятся к самым чувствительным признакам, по которым возможно оценить процессы, происходящие во время заморозки и сублимации. Поэтому подбор оптимального состава лиофилизата для инъекционного применения ГК-2 определялся, исходя из сравнительного анализа отобранных ранее соотношений и модельных составов по таким технологическим характеристикам, как время регидратации, изменение рН после лиофилизации и остаточная влажность. Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций на основе ГК-2 с модельным составом ГК-2:сахароза:ПЭГ 4000 показал соответствие ГФ XIII по таким параметрам, как прозрачность, а рН после лиофилизации не отличался существенно от рН до лиофилизации. Изменение рН после лиофилизации выше допустимых значений, так же как и мутность растворенного лиофилизата, говорит о деструктивных процессах, происходящих во время цикла лиофилизации.

Такие показатели, как остаточная влага, степень кристалличности, позволяют оценить стабильность лиофилизата при хранении. Остаточная влага в наиболее приемлемом составе с ГК-2 составляет 1,8 %, что гораздо ниже требуемых 5 %, однако позволяет уменьшить процессы, происходящие с субстанцией во время хранения. Степень кристалличности, во-первых, позволяет оценить критические процессы, которые происходят во время заморозки и первичной сушки. Во-вторых, благодаря этому параметру мы можем спрогнозировать, могут ли происходить во

время хранения процессы кристаллизации, уменьшающие сроки хранения и разрушающие субстанцию. Известно, что наиболее стабильны при хранении лекарственные средства, находящиеся в кристаллическом состоянии. Поэтому для модельных составов с субстанцией ГК-2 проведено исследование степени кристалличности путем проведения оптической микроскопии в поляризованном свете (рис. 4), в результате которого выявлено, что модельный состав имеет кристаллическую природу после лиофилизации.

Осмолярность раствора, приготовленного из лиофилизата, также является основным параметром, потому что она характеризует биофармацевтические аспекты. К важным параметрам относятся также рН, время регидратации, они применяются для обеспечения наиболее быстрого приготовления и должны соответствовать ГФ XIII. Однако для лиофилизатов для парентерального применения возможны как разработка лиофилизатов с изотоничными компонентами, так и регидратация лиофилизатов изотоничным раствором. В связи с низкой осмолярностью оптимизированного модельного состава лиофилизата ГК-2 предполагается использование изотоничного раствора. Среднее время регидратации оптимизированного модельного состава составляет 15,26 с, что дает возможность подготовить препарат к использованию с наименьшими затратами времени, поскольку время регидратации служит важным показателем для предполагаемого противоиного действия.

Стерильность и апиrogenность должны соблюдаться на всех этапах технологического процесса — от подготовки ВВ и оборудования до предупреждения

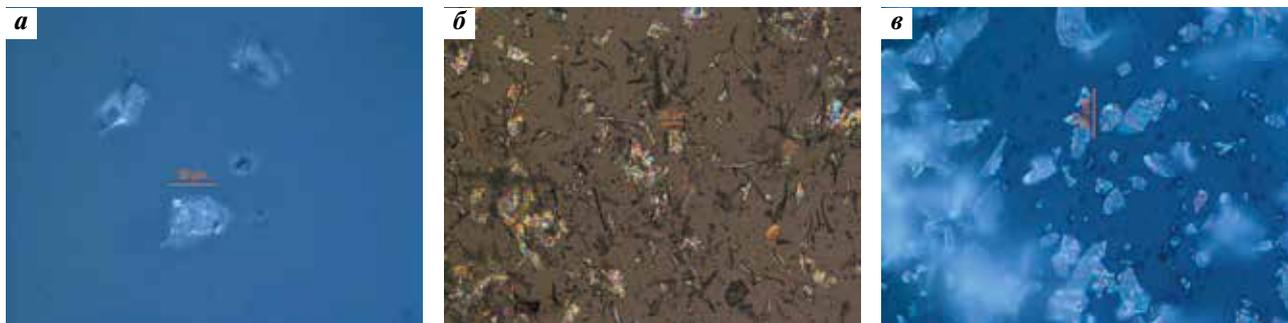


Рис. 4. Оптическая микроскопия в поляризованном свете при увеличении $\times 50$: а – фармацевтической субстанции ГК-2; б – лиофилизованной субстанции ГК-2; в – лиофилизованного модельного состава ГК-2:сахароза:ПЭГ 4000

контаминации в сушильной камере и во время укупорки [5, 6].

При изучении технологических свойств лиофилизата для приготовления инъекций на основе ГК-2 можно сделать вывод: лиофилизат обладает оптимальными технологическими и биофармацевтическими свойствами, что позволяет говорить об успешной фармацевтической разработке. При разработке технологии лиофилизации с учетом требований фармацевтической разработки (ICH Q8) была дана оценка ККТ, подразделяющимся на технологические и биофармацевтические факторы. Правильность соблюдения технологических режимов в ККТ определяют успешность процесса лиофилизации и получения продукта, соответствующего заданным параметрам.

Следующая важная стадия фармацевтической разработки – валидация технологического процесса. Это документальное подтверждение пригодности технологии для получения продукта надлежащего качества и надежности, т. е. постоянное воспроизведение процесса с заданными параметрами и продукта с заданным качеством. Она обязательна и описывается в соответствующих правилах GMP. Валидация в полной мере может быть проведена только в условиях промышленного масштабирования, однако на этапе фармацевтической разработки поставлена задача разработки валидированного и надежного процесса. На стадии фармацевтической разработки во время регистрации продукта фиксируются показатели качества продукта и важнейшие параметры процесса, которые не должны значительно изменяться на последующих этапах жизненного цикла ЛП. Эти показатели качества совместно с параметрами производства формируют необходимый объем информации в регистрационном досье, характеризующий свойства данного продукта для доказательства надежности процесса [7].

Для технологического обеспечения лиофилизации первостепенное значение имеет подготовка воды для инъекций и воздуха асептического блока, в ко-

тором происходит подготовка раствора для дальнейшей лиофилизации, поскольку растворы для лиофилизации не могут быть простерилизованы традиционными методами (автоклавированием или сухожаровой стерилизацией) в конечном продукте ввиду термочувствительности ФС ГК-2. Для стерилизации раствора ГК-2 подходит только фильтрация через фильтр 0,22 мкм, и предъявляются повышенные требования к подготовке воды для инъекций. В то же время подготовка очищенного воздуха является неотъемлемой частью производства лиофилизатов ГК-2, поскольку перед загрузкой на полки и лиофилизацией резиновые пробки для лиофилизации находятся в полуоткрытом состоянии для обеспечения доступа вакуума и в дальнейшем в процессе массообменных процессов во время сублимации и вторичного досушивания. Поэтому к важным ККТ относится чистота воздуха перед, во время установки на полки лиофилизатов и после завершения цикла лиофилизации, т. е. во время окончательной укупорки.

Конструкционные особенности лиофильной сушилки обеспечивают равномерное распределение охлаждения, надежное образование вакуума, процессы массо- и теплообмена, а также укупорку флаконов в инертной среде, чтобы в дальнейшем в условиях заводского производства лиофилизированный продукт обеспечивал все необходимые параметры качества. Кроме того, с целью получения стерильных ЛФ конструкторы избавляют систему розлива приготовленного и профилированного раствора от «мертвых зон», в которых продукт может застаиваться и вызывать контаминацию, а также соблюдается строго установленный режим «чистки» оборудования и ведется постоянный учет возможных загрязнений. В результате проведенного исследования нами предложена технологическая схема производства лиофилизата для приготовления раствора для инъекций ГК-2 (рис. 5).

Комплексный анализ технологической схемы производства и диаграммы Ишикавы показал, что наибольший риск может наблюдаться на стадиях

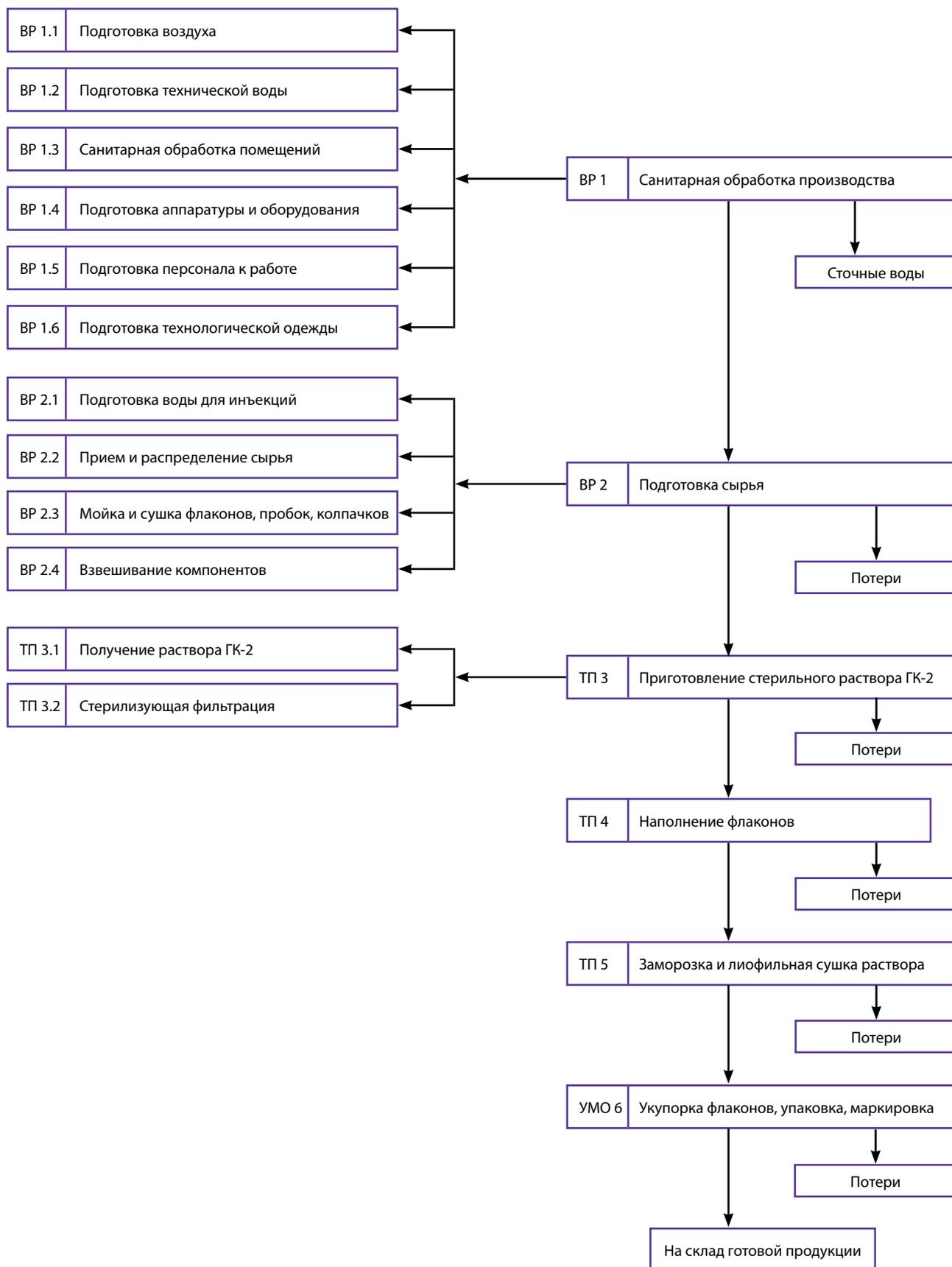


Рис. 5. Технологическая схема производства лиофилизатов для парентерального применения на основе ГК-2

Контрольные точки производства лиофилизатов для приготовления растворов для инъекций ГК-2

Контрольные точки производства	Стадия производства				
	Приготовление раствора и фильтрация	Замораживание раствора	Первичная сушка лиофилизата	Вторичная сушка лиофилизата	Укупорка
Контроль температуры	+	+	+	+	+
Количество компонентов	+	–	–	–	–
Контроль давления	–	–	+	+	+
Продолжительность производственных стадий	+	+	+	+	–
Количественный анализ компонентов	–	–	–	–	+
Микробиологическая чистота и бактериальные эндотоксины	+	–	–	–	+
	Момент либо повод для документирования				

приготовления раствора и фильтрации, замораживания раствора, первичной сушки лиофилизата, вторичной сушки лиофилизата, а также укупорки флаконов. Для определения контрольных точек производства в оценке качества лиофилизата для приготовления раствора для инъекций ГК-2 нами предложен ряд критериев (см. таблицу).

Заключение

Проведены исследования по разработке технологии получения лиофилизата для приготовления раствора для инъекций ГК-2 по методам и с учетом требований, изложенных в «Руководстве по разработке и производству ЛП (фармацевтическая разработка)» ЕврАзЭС, ICH Q8 «Фармацевтическая разработка» и ICH Q9 «Управление рисками для ка-

чества». Были разработаны диаграмма Ишикавы и технологическая схема производства лиофилизатов для приготовления растворов для инъекций на основе ГК-2. Комплексный анализ разработанной диаграммы и технологической схемы производства дает возможность выделить КПК, ККТ, позволяющие нам минимизировать возникновение возможных рисков производства лиофилизатов.

По результатам исследований технологических и биофармацевтических факторов разработанный лиофилизат для приготовления инъекций на основе ГК-2 показал оптимальные технологические и биофармацевтические свойства, что позволяет сделать вывод о пригодности состава и технологии для дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. ICH Q8. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, 2005. 28 p.
2. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q9: Quality Risk Management, ICH. Geneva, Switzerland, 2005. 30 p.
3. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В., Марахова А. И. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации пептидов и белков. Фармация 2017;66(1):14–8. [Blynskaya E. V., Tishkov S. V., Alekseev K. V., Marakhova A. I. Auxiliary substances in the technology of lyophilization of peptides and proteins. Farmatsya = Pharmacy 2017;66(1):14–8. (In Russ.)].
4. Блынская Е. В., Тишков С. В., Алексеев К. В. Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):6–11. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11. [Blynskaya E. V., Tishkov S. V., Alekseev K. V. Technological approaches to improving the process of lyophilization of protein and peptide drugs. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(1):6–11. (In Russ.)].
5. Гулякин И. Д., Хашем Али, Николаева Л. Л. и др. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индокарбазола ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):55–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60. [Gulyakin I. D., Hashem Ali, Nikolaeva L. L. et al. Development of a new technology for the preparation

of a dosage form for the intravenous administration of an indole carbazole derivative, LHS-1208. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(2):55–60. (In Russ.).

6. Ланцова А.В., Котова Е.А., Санарова Е.В. и др. Разработка лио-

филизированной липосомальной лекарственной формы цифелина. Российский биотерапевтический журнал 2012;14(2):79–84.

DOI: 10.30906/0023-1134-2012-46-5-39-42. [Lantsova A.V., Kotova E.A., Sanarova E.V. et al. Development of a lyophilized liposomal drug form

of cipheline. Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):79–84. (In Russ.).

7. The Common Technical Document for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Quality – M4Q (R1). Quality Overall Summary of Module 3: Quality. London, 2003. 23 p.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.В. Тишков/S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ОЛИВАМИДА В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРОЛИКАХ

Э.Р. Переверзева, М.И. Трещалин, В.А. Голибродо, А.Н. Тевяшова, И.Д. Трещалин

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Михаил Иванович Трещалин funky@beatween.ru

Введение. Антибиотики группы ауреоловой кислоты – высокоактивные противоопухолевые препараты. Новые данные о механизме их действия обусловили необходимость создания аналогов с улучшенными фармакологическими свойствами. В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» были разработаны методы селективной химической модификации антибиотика группы ауреоловой кислоты оливомицина А, получен ряд полусинтетических производных. Наиболее активное соединение – N, N-диметиламиноэтиламид 1'-дез-(2,3-дигидроксибутироил)-1'-карбокси-оливомицина А (оливаמיד) – было отобрано для углубленного доклинического изучения.

Цель исследования – доклиническое изучение токсикологической безопасности лекарственной формы препарата оливаמיד в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы. Исследование проведено на кроликах «Советская шиншилла». Препарат в лекарственной форме вводили внутривенно ежедневно в течение 15 дней в дозах, суммарно составляющих максимально переносимую и дозу, вызывающую гибель 50 % животных (ЛД₅₀) – (разовые дозы 0,02 и 0,04 мг/кг соответственно). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса животных подвергали этаназии. Проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что введение оливамида в дозе, суммарно составляющей максимально переносимую дозу, приводит к повышению активности аспаратаминотрансферазы, увеличению содержания мочевины и креатинина. При анализе мочи было отмечено появление белка, уробилиногена и увеличение удельного веса. При применении оливамида в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀ помимо отмеченных выше показателей, было выявлено повышение активности щелочной фосфатазы и уровня общего билирубина. При патоморфологическом исследовании были найдены повреждения структуры печени и почек, интенсивность которых зависела от дозы препарата.

Заключение. Выявленные токсические свойства оливамида зависят от величины примененной дозы. При курсовом применении препарата в дозе, суммарно составляющей максимально переносимую дозу, они практически полностью обратимы в течение 30 дней.

Ключевые слова: оливаמיד, оливомицин А, ауреоловая кислота, хроническая токсичность, кролики

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-91-97

TOXICOLOGICAL STUDY OF OLIVAMIDE IN CHRONIC EXPERIMENT ON RABBITS

E.R. Pereverzeva, M.I. Treschalin, V.A. Golibrod, A.N. Tevyashova, I.D. Treschalin

Gause Institute of new antibiotics; 1 bldg, 11 B. Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia

Introduction. Antibiotics of aureolic acid group are highly effective anticancer drugs. New data about their mode of action caused the need for creation of analogs with improved pharmacological properties. The methods of selective chemical modification of aureolic acid antibiotic olivomycin A were developed at the Gause Institute of New Antibiotics. Some semisynthetic derivatives have been prepared. The most active compound – N, N-dimethylaminoethylamide 1'-des-(2,3-dihydroxybutyroi)-1'-carboxy-olivomycin A (olivamide) – was selected for advanced preclinical testing.

Objective. The aim of the study was to investigate the toxicological safety of olivamide drug formulation in chronic experiment on rabbits.

Materials and methods. The study was performed in male and female “Soviet chinchilla” rabbits. Drug formulation was administrated intravenously at the total doses of maximum tolerated dose and 50 % lethal dose (15 × 0.02 mg/kg or 15 × 0.04 mg/kg with 24-h interval). During the experiment body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed. Animals were sacrificed 1 and 30 days post treatment. The internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. It has been shown that the treatment with total dose of olivamide maximum tolerated dose produces an increase of aspartate aminotransferase, urea and creatinine level in serum. Urinalysis revealed the elevation of protein, urobilinogen and urine specific gravity. Administration of high dose of olivamide in addition to the above-mentioned laboratory parameter caused the raising of alkaline phosphatase and total bilirubin level in serum. Microscopic pathology observation showed structure abnormalities of varying severity in liver and kidneys.

Conclusion. *Olivamide drug formulation displayed dose-dependent toxic properties. Multiple administration of low dose of the drug produces transient toxic effects completely reversible within 30 days.*

Key words: *olivamide, olivomycin, aureolic acid, chronic toxicity, rabbits*

Введение

Среди первых представителей противоопухолевых антибиотиков, вошедших в клиническую практику в 60–70-х годах прошлого столетия, были антибиотики группы ауреолевой кислоты (АК): оливомицин А (ОА), хромомицин (ХМ) и митрамицин (М). Препараты очень близки по структуре. ХМ и М имеют одинаковый хромофор хромомицинон, но отличаются сахарными остатками. Хромофор ОА оливин не имеет метильной группы в положении 7 хромомицинона [1]. В клинике ОА был эффективен при лечении опухолей яичка (тератобластома, эмбриональный рак), хорионэпителиомы матки, злокачественных опухолей миндалин. В комбинации с другими препаратами его использовали для лечения некоторых форм сарком мягких тканей. М применяли при лечении эмбрионального рака яичка. Во время клинических испытаний ХМ наблюдали случаи объективного эффекта при раке желудка, толстой кишки, костных и мягкотканых саркомах [2]. Несмотря на близость строения, эти препараты отличались не только по спектру действия, но и по токсичности. ОА наименее токсичен и имеет наилучший терапевтический индекс. ХМ оказался наиболее токсичным из 3 антибиотиков. При клинических испытаниях почти у всех больных наблюдали развитие почечной недостаточности, вплоть до острого некроза канальцев. Одним из самых тяжелых проявлений побочного действия М в клинике оказался геморрагический диатез, сопровождающийся тромбоцитопенией [3]. Эти препараты применялись довольно широко, однако позже были признаны недостаточно эффективными, слишком токсичными, и их перестали использовать для лечения больных со злокачественными опухолями.

Интерес к антибиотикам группы АК возродился в 2000-х годах. Он был обусловлен появлением новых данных о механизме их действия. Так, было показано, что в основе противоопухолевого эффекта антибиотиков этой группы лежит ингибирование процессов репликации и транскрипции посредством взаимодействия с GC-богатыми нуклеотидными последовательностями в присутствии ионов Mg^{2+} , в частности с сайтом транскрипционного фактора Sp1, расположенным в этом регионе [4]. Белок Sp1, влияющий на клеточный рост, дифференциацию и апоптоз, играет критическую роль в пролиферации клеток и метастазировании различных видов опухолей [5]. Кроме того, было установлено, что антибиотики

группы АК предотвращают развитие резистентности опухолевых клеток к другим противоопухолевым средствам, в том числе по механизму, связанному с ингибированием транскрипции гена *MDR1*, гиперэкспрессия которого обеспечивает феномен множественной лекарственной устойчивости [6, 7].

Появление новых технологических подходов, таких как комбинаторный биосинтез, биокатализ, генная инженерия, позволило получить аналоги природных структур с улучшенными химиотерапевтическими свойствами [8]. Однако такой эффективный способ получения новых препаратов, как химическая модификация природных соединений, для антибиотиков группы АК ранее практически не применялся [9]. В ФГБНУ «НИИНА» были изучены различные направления химической модификации ОА как наиболее перспективного цитотоксического вещества, обладающего наилучшим химиотерапевтическим индексом среди антибиотиков группы АК, мощного индуктора апоптоза опухолевых клеток и ингибитора P53-индуцированной транскрипции [10]. Были получены серии полусинтетических производных, ряд из которых показал преимущества перед исходным антибиотиком [11, 12]. Соединение N, N-диметиламиноэтилаид 1'-дез-(2,3-дигидроксибутирил)-1'-карбокси-оливомицина А (оливамид) было отобрано для углубленного доклинического изучения.

Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с правилами экспериментального изучения оригинальных фармакологических веществ [13] с соблюдением этических норм обращения с животными, принятых Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [14].

Исследования проведены на кроликах породы Советская шиншилла, самцах и самках массой 2500–2800 г, полученных из питомника «Белый мох». Животные были разделены на 6 групп (3 группы самцов и 3 группы самок) по 6 особей. В качестве суммарных доз были выбраны максимально переносимая доза (МПД) – 0,28 мг/кг доза, вызывающая гибель 50 % животных (LD_{50}), – 0,63 мг/кг, которые были рассчитаны для кроликов путем пересчета с соответствующих доз для крыс с учетом коэффициента поверхности тела [15] и коэффициента кумуляции оливамида. Препарат в лекарственной форме вводили внутривенно в краевую вену уха ежедневно в течение 15 сут.

Разовые суточные дозы составили соответственно 0,02 и 0,04 мг/кг. Наблюдение продолжали в течение 30 сут после прекращения введений препарата.

На протяжении исследования ежедневно проводили оценку состояния и поведения животных, 1 раз в неделю определяли массу тела. Гематологическое исследование периферической крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула и гематокрит) проводили перед началом курса введений (0 сутки), на 1, 7 и 15-й дни во время курса, на 3, 5, 7-е; 10, 20 и 30-е сутки после окончания курса введений с помощью автоматического гематологического анализатора «Abacus Junior Vet» (Diatron, Австрия). Биохимическое исследование сыворотки крови животных с определением аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), креатинина, мочевины, билирубина прямого и общего, общего белка, альбумина, глюкозы осуществляли на 1-й и 30-й день после окончания курса введений препарата при помощи автоматического биохимического анализатора «ChemWell» (Awareness Technology Inc., США). Общий анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тельца, белок, уробилиноген, удельный вес) проводили на 1-й и 30-й день после окончания введений препарата, используя автоматический анализатор мочи «Laura Smart» (Erba Lachema, Чехия). ЭКГ во 2-м стандартном отведении снимали на 1-е и 30-е сутки после курса (электрокардиограф ЭК1Т-07, «Аксион», Россия).

Статистическую обработку количественных данных проводили по критерию *t* Фишера–Стьюдента при помощи компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

На 1-е и 30-е сутки по окончании курса введений препарата половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии, определяли массовые коэффициенты тимуса, сердца, печени, почек, селезенки. Участки внутренних органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилином и эозином и подвергали световой микроскопии.

Результаты и обсуждение

На протяжении всего эксперимента гибели животных не наблюдалось. Значимых отклонений от контрольных значений показателей периферической крови не выявлено. Отклонений в поведенческих реакциях животных не отмечено.

При биохимическом исследовании сыворотки крови и у самцов, и у самок на 1-е сутки после окончания введений оливамида в низкой дозе было зарегистрировано повышение активности АСТ (рис. 1–2),

содержания креатинина (рис. 3–4) и мочевины (рис. 5–6). К концу наблюдения значения этих показателей не отличались от контроля. При применении препарата в высокой дозе наряду с отмеченными выше изменениями происходило повышение активности ЩФ (рис. 7–8) и уровня общего билирубина (рис. 9–10). При этом повышенный уровень АСТ и мочевины сохранялся до 30 сут после окончания курса введений.

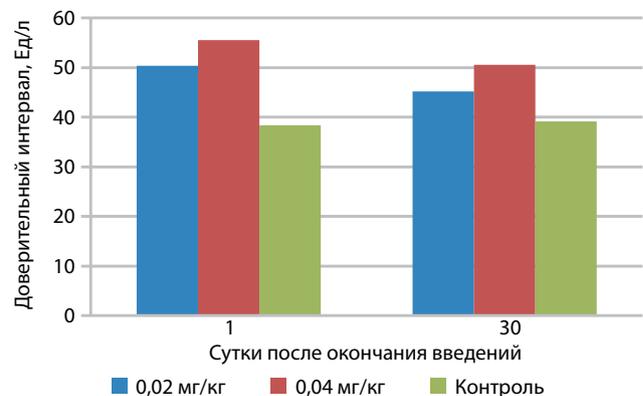


Рис. 1. Динамика изменения уровня АСТ в сыворотке крови самцов кроликов

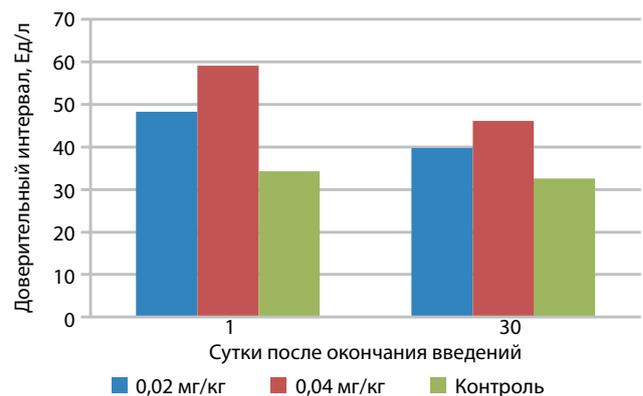


Рис. 2. Динамика изменения уровня АСТ в сыворотке крови самок кроликов

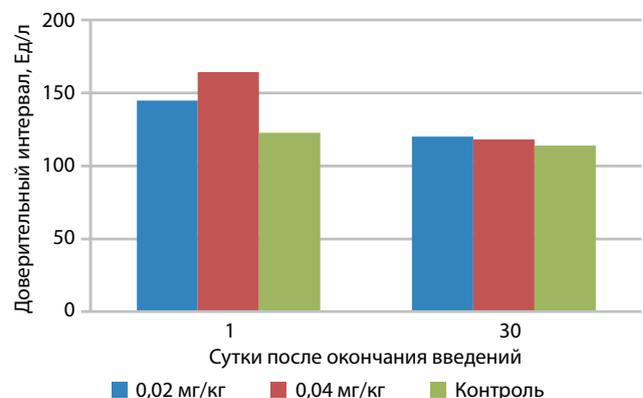


Рис. 3. Динамика изменения уровня креатинина в сыворотке крови самцов кроликов

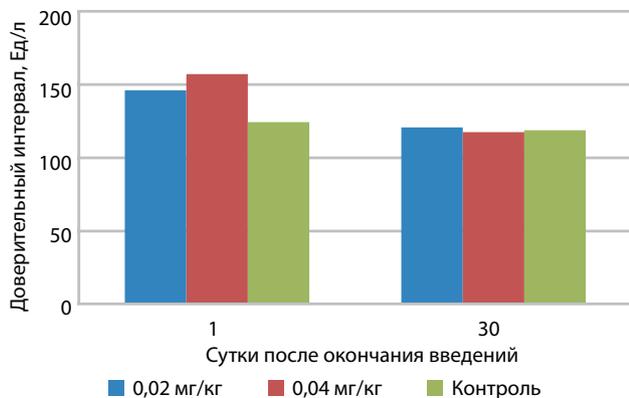


Рис. 4. Динамика изменения уровня креатинина в сыворотке крови самок кроликов

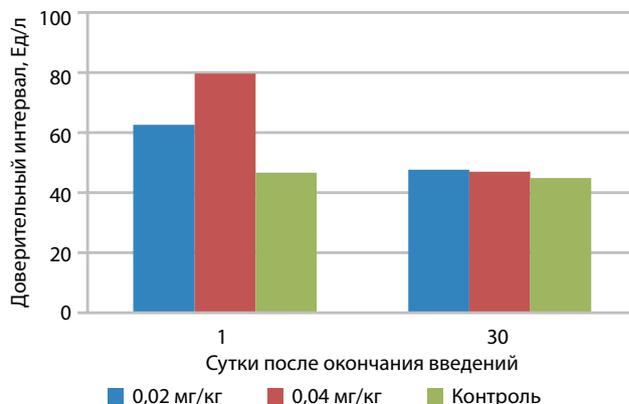


Рис. 7. Динамика изменения уровня ЩФ в сыворотке крови самцов кроликов

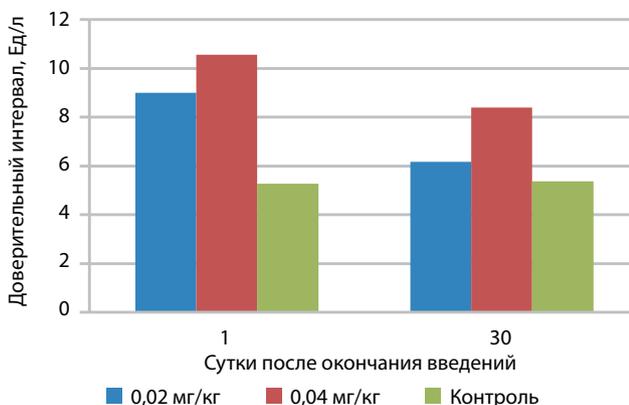


Рис. 5. Динамика изменения уровня мочевины в сыворотке крови самок кроликов

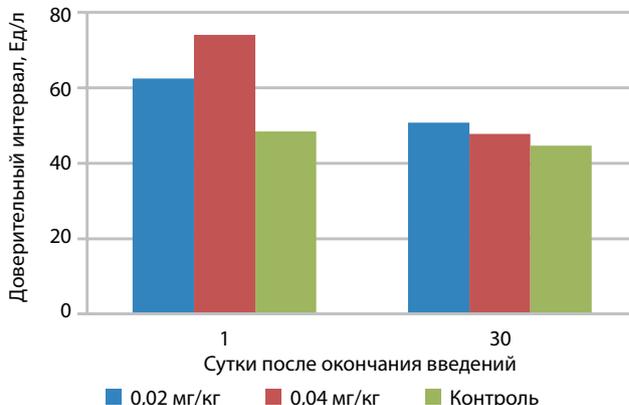


Рис. 8. Динамика изменения уровня ЩФ в сыворотке крови самок кроликов

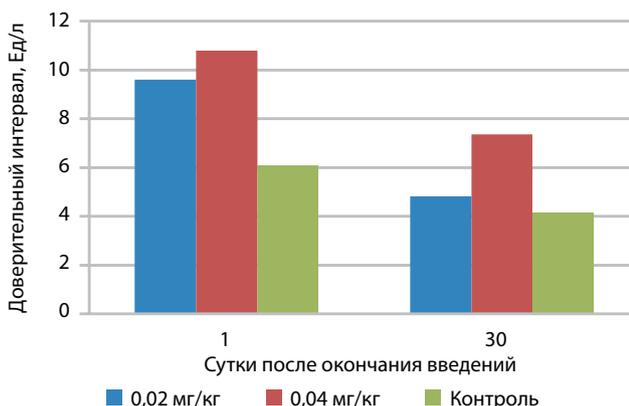


Рис. 6. Динамика изменения уровня мочевины в сыворотке крови самцов кроликов

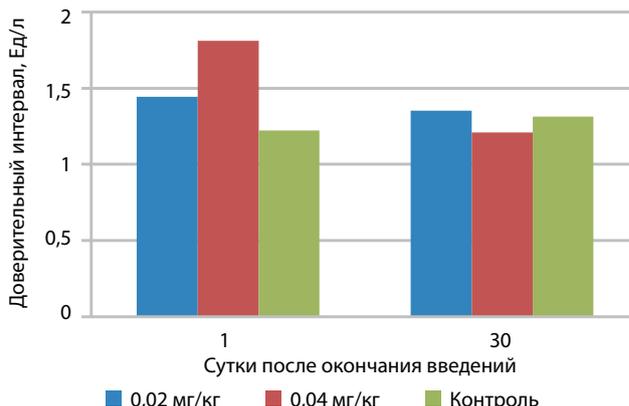


Рис. 9. Динамика изменения уровня общего билирубина в сыворотке крови самок кроликов

При исследовании состава мочи на 1-е сутки после окончания курса введений препарата в обеих изученных дозах как у самцов, так и у самок отмечено появление белка и уробилиногена, увеличение удельного веса. На 30-е сутки после отмены препарата у кроликов, получавших оливамирид в высокой

дозе, сохранялось повышенное содержание уробилиногена. Содержание белка в моче и удельный вес не отличались от контроля.

Патоморфологическое исследование показало, что при ежедневном внутривенном введении в течение 15 дней в обеих изученных дозах оливамирид ока-

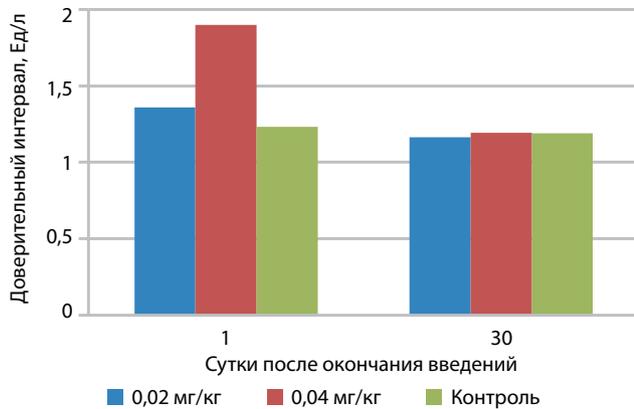


Рис. 10. Динамика изменения уровня общего билирубина в сыворотке крови самок кроликов

зывает повреждающее действие на структуру печени и почек кроликов, которое выражается как в дистрофических, так и в деструктивных изменениях клеток паренхимы органов. В печени преобладали явления вакуольной дистрофии, в почках — некротические

процессы. Характер морфологических изменений не зависел от пола животных.

При применении препарата в высокой дозе вакуольная дистрофия гепатоцитов носила тотальный характер (рис. 11а, б). Вокруг некоторых триад был выявлен некроз гепатоцитов (рис. 11в). В течение месяца структура печени частично восстанавливалась, очаги некроза подвергались организации (рис. 11г). При использовании оливамида в дозе, суммарно составляющей МПД, небольшие очаги вакуольной дистрофии возникали только вблизи центральных вен, а к концу наблюдения структура органа не отличалась от контроля.

Применение препарата в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, приводило к изменению структуры как канальцев, так и клубочков почки. На 1-е сутки после курса введений препарата во всех зонах почки были найдены очаги вакуольной дистрофии и деструкции эпителия извитых и прямых канальцев. В корковой и мозговой зоне были выявлены «лапчатые» клубочки, иногда с резко утолщенной капсулой

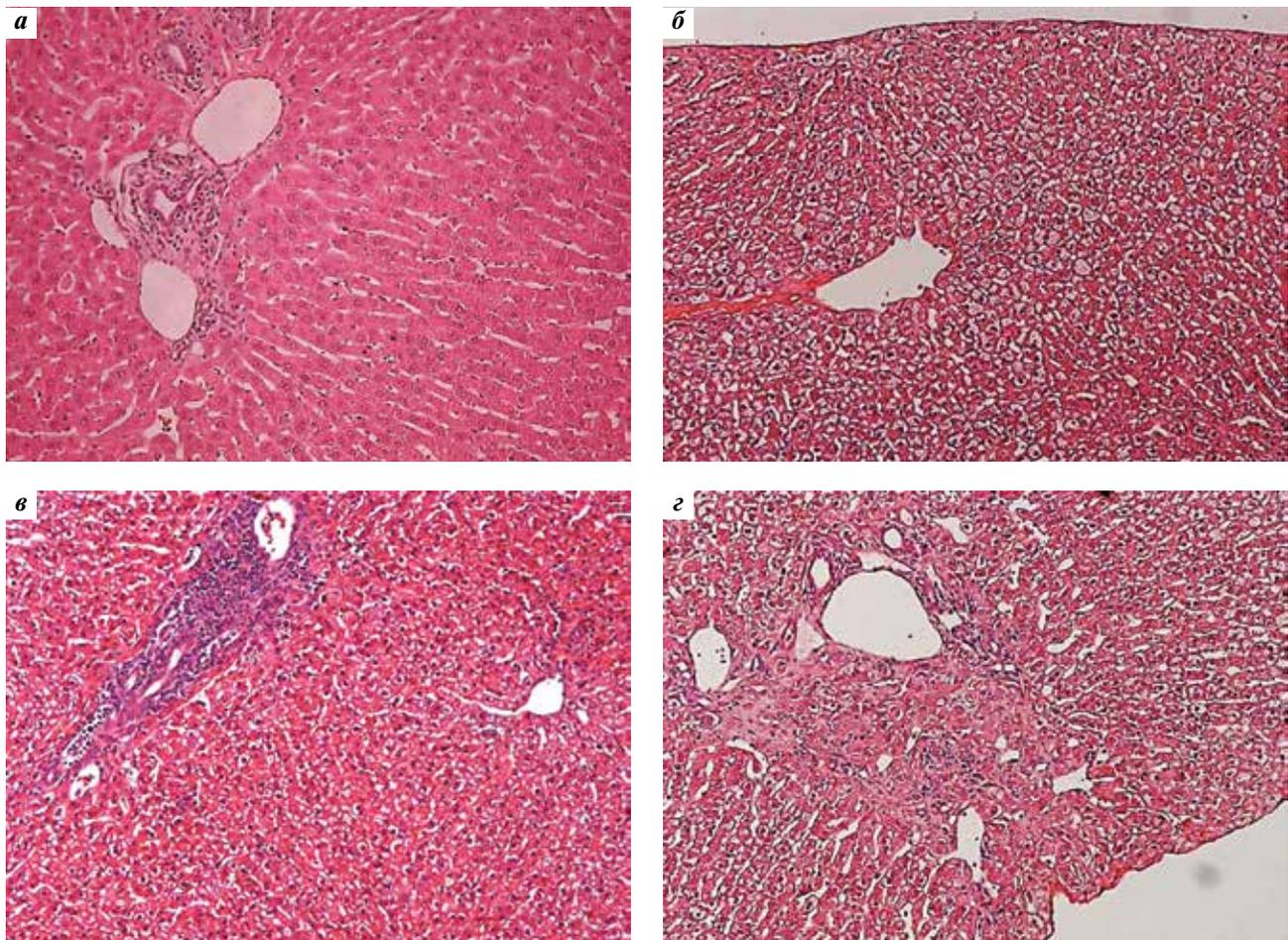


Рис. 11. Патоморфологическое исследование печени кролика. $\times 20$: а — интактный контроль, триада; б — оливаמיד, 0,04 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Вакуольная дистрофия гепатоцитов; в — оливаמיד, 0,04 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Некроз гепатоцитов вокруг триады; г — оливаמיד, 0,04 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Очаг некроза гепатоцитов вокруг триады в стадии организации

(рис. 12а, б). Отдельные нефроны подвергались тотальному некрозу, который к 30-м суткам наблюдения завершался фиброзом капсулы клубочков, склерозом очагов некроза и формированием кист на месте деструкции канальцев (рис. 12в, г).

При применении препарата в низкой дозе изменения в ткани почки возникали не у всех животных и носили мелкоочаговый характер, затрагивая небольшие группы извитых канальцев (рис. 12д). В течение 30 дней очаги некроза подвергались организации (рис. 12е).

В остальных органах и тканях патологических изменений не обнаружено.

Таким образом, в хроническом эксперименте на кроликах было установлено, что оливамида обладает гепато- и нефротоксическими свойствами. Гепатотоксичность препарата проявляется в виде повышения активности АЛТ, АСТ и уровня билирубина. Морфологически она выражается в развитии вакуольной дистрофии гепатоцитов и появлении очагов микронекроза. При применении препарата в дозе, суммарно составляющей МПД, изменения клинико-лабораторных показателей и структуры органа полностью обратимы в течение месяца.

Основной лимитирующий вид токсичности оливамида – нефротоксичность. Она проявляется в повышении уровня мочевины и креатинина в сыворотке крови, появлении уробилиногена и белка в моче и увеличении ее удельного веса.

Особенностью нефротоксического действия оливамида является его свойство повреждать структуру капилляров клубочков, вызывая фибропластический гломерулонефрит, который морфологически выражается в «лапчатости» клубочков и фиброзе их капсулы, и, как следствие, деструкцию канальцев. Очаговый, а иногда тотальный некроз отдельных нефронов, возникающий при применении препарата в высокой дозе, сопровождается повышением активности ЩФ в сыворотке крови. Некротические процессы завершаются формированием кист и склерозом поврежденных участков почки. При использовании препарата в низкой дозе повреждения структуры почки отмечаются лишь у отдельных животных и затрагивают отдельные клубочки и извитые канальцы. В течение 30 дней биохимические показатели сыворотки крови и состав мочи нормализуются, а очаги деструкции подвергаются организации.

Заключение

Оливамида не обладает гематотоксическими свойствами, не оказывает влияния сердечно-сосудистую и пищеварительную систему. Интенсивность изменений структуры и функции печени и почек кроликов, возникающих под действием препарата, зависит от величины примененной дозы. Это позволяет рекомендовать препарат для дальнейшего продвижения.

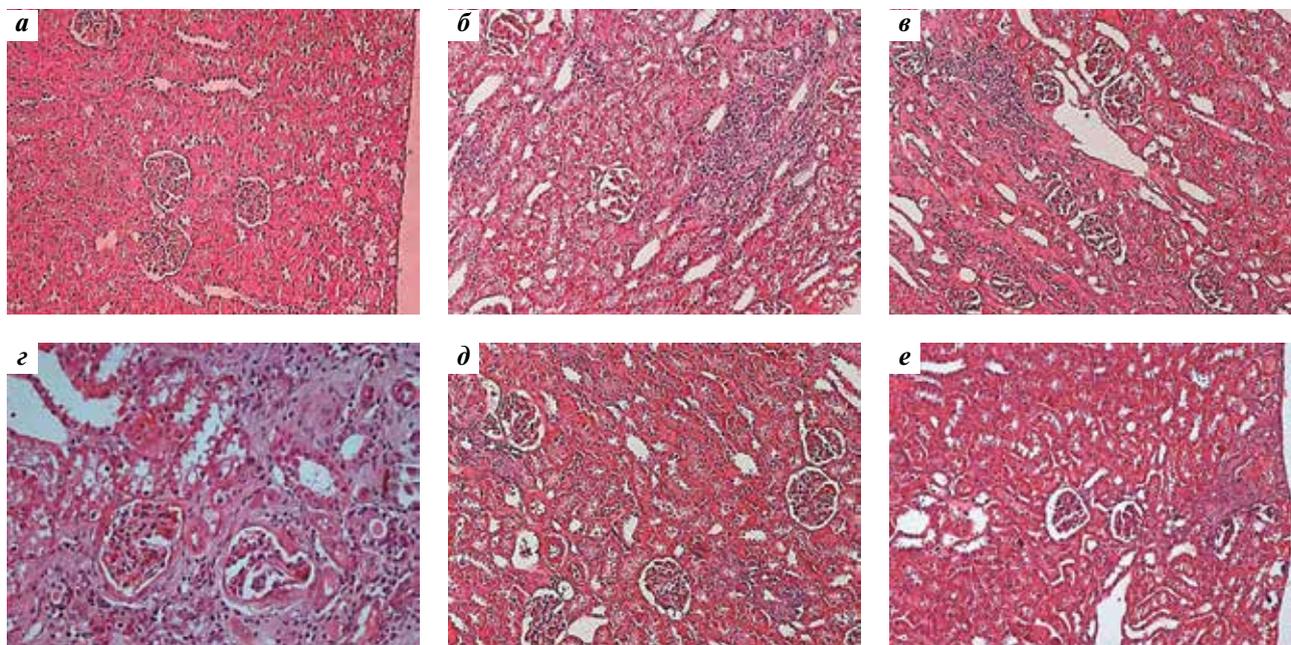


Рис. 12. Патоморфологическое исследование почки кролика. $\times 20$: а – интактный контроль; б – оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Некроз, деструкция, вакуольная дистрофия эпителия извитых канальцев, кистообразное расширение просвета, «лапчатые» клубочки; в – оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Склероз в области некроза канальцев, кисты, выстланные плоским эпителием; г – оливамида, 0,04 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Фиброз капсулы клубочков, $\times 40$; д – оливамида, 0,02 мг/кг $\times 15$, 1-е сутки после курса. Мелкие очаги вакуольной дистрофии и деструкции эпителия извитых канальцев; е – оливамида, 0,02 мг/кг $\times 15$, 30-е сутки после курса. Очаг некроза в стадии организации

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Гаузе Г.Ф., Дудник Ю.В. Противоопухолевые антибиотики. М.: Медицина; 1987:12–7. [Gause G.F., Dudnik Yu.V. Antitumor antibiotics. M.: Medicine; 1987:12–7. (In Russ.)].
- Химиотерапия злокачественных опухолей. Под ред. Н.Н. Блохина. М.: Медицина; 1977:126–9 [Chemotherapy of malignant tumors. By ed. N.N. Blokhin M.: Medicine; 1977:126–9. (In Russ.)].
- Gause G.F. Chromomycin, Olivomycin, Mithramycin. In: Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. Handbook of Experimental Pharmacology (Heffter-Heubner/New Series). Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975. Vol. 38/2. Pp. 615–622. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-65806-8_32.
- Vizcaíno C., Mansilla S., Núñez L.E. et al. Novel mithramycins abrogate the involvement of protein factors in the transcription of cell cycle control genes. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1133–42. PMID: 22981341. DOI:10.1016/j.bcp.2012.08.003.
- Deacon K., Onion D., Kumari R. et al. Elevated SP-1 transcription factor expression and activity drives basal and hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in non-small cell lung cancer. *J Biol Chem* 2012;287(47):39967–81. PMID: 22992725. DOI: 10.1074/jbc.M112.397042.
- Mir M.A., Majee S., Das S., Dasgupta D. Association of chromatin with anticancer antibiotics, mithramycin and chromomycin A3. *Bioorg Med Chem* 2003;11(13):2791–801. PMID: 12788353. DOI:10.1016/s0968-0896(03)00211-6.
- Tagashira M., Kitagawa T., Isonishi S. et al. Mithramycin represses MDR1 gene expression in vitro, modulating multidrug resistance. *Biol Pharm Bul* 2000;23(8):926–9. PMID: 10963297.
- González-Sabin J., Moris F. Exploring novel opportunities for aureolic acids as anticancer drugs. *Biochem & Pharmacol* 2013;2(1):1–3. DOI: 10.4172/2167-0501.1000e140.
- Тевяшова А.Н. Оливомидин А – противоопухолевый антибиотик группы ауреоловой кислоты (обзор). *Химико-фармацевтический журнал* 2016;50(7):3–8. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-7-3-8. [Tevyashova A.N. Olivomycin A – antitumor antibiotic of aureolic acid group. *Himiko-farmaceuticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal* 2016;50(7):3–8. (In Russ.)].
- Симонова В.С., Самусенко А.В., Филиппова Н.А. и др. Оливомидин вызывает апоптоз опухолевых клеток и подавляет P53-индуцированную транскрипцию. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2005;4:451–5. [Simonova V.S., Samusenko A.V., Filippova N.A. et al. Olivomycin causes tumor cell apoptosis and suppresses P53-induced transcription. *Billyuten experimentalnoy biologicheskoy medicinj = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2005;4:451–5. (In Russ.)].
- Tevyashova A.N., Olsufyeva E.N., Balzarini J. et al. Modification of the antibiotic olivomycin I at the 2'-keto group of the side chain. Novel derivatives, antitumor and topoisomerase I-poisoning activity. *J Antibiot (Tokyo)* 2009;62:37–41. PMID: 19132061. DOI: 10.1038/ja.2008.7.
- Tevyashova A.N., Shtil A.A., Olsufyeva E.N. et al. Modification of olivomycin A at the side chain of the aglycon yields the derivative with perspective antitumor characteristics. *Bioorg Med Chem* 2011;19:7387–93. PMID: 22088308. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.10.055.
- Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. и др. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова и др. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–24. [Yakubovskaya R.I., Kazachkina N.I., Karmakova T.A. et al. Methodical recommendations on the study of photoinduced antitumor properties of drugs. In: *Guide to conducting preclinical studies of medicines*. Ed. by A.N. Mironov. P.I. Moscow: Grif i K, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
- Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
- Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125.

ORCID авторов/ORCID of authors

Э.Р. Переверзева/E.R. Pereverzeva: <https://orcid.org/0000-0001-7368-9695>

В.А. Голибродо/V.A. Golibrodov: <https://orcid.org/0000-0001-8643-6427>

А.Н. Тевяшова/A.N. Tevyashova: <https://orcid.org/0000-0003-1091-1011>

И.Д. Трещалин/I.D. Treschalin: <https://orcid.org/0000-0001-7331-5490>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

ПРЕДКЛИНИЧЕСКОЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОРМУСТИНА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ У КРЫС В УСЛОВИЯХ СУБХРОНИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

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

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

Контакты: Вера Андреевна Чалей v.chaley@list.ru

Введение. В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведены доклинические токсикологические исследования лиофилизированной лекарственной формы ормустина (Ормустин) — нового противоопухолевого препарата из класса нитрозоалкилмочевин. В работе представлены результаты изучения субхронической токсичности Ормустина на крысах.

Цель исследования — изучение субхронической токсичности Ормустина на крысах при ежедневном 3-кратном внутривенном введении.

Материалы и методы. Исследование проведено на 40 неинбредных крысах-самцах. Ормустин вводили внутривенно ежедневно 3-кратно в суммарных дозах 300, 200 и 100 мг/кг. Срок наблюдения — 45 сут. На протяжении всего срока наблюдения проводили необходимые клинико-лабораторные исследования. Для изучения повреждающего действия Ормустина на органы и ткани проводили патоморфологическое исследование на 3-и и 45-е сутки наблюдения.

Результаты. Установлено, что Ормустин при многократном применении у крыс в 3 исследованных дозах обладает гемато-, нефро-, кардио- и гастроинтестинальной токсичностью. Глубина и степень повреждений, а также их обратимость зависят от величины примененной дозы Ормустина.

Выводы. На основании полученных данных определены уровни токсических доз Ормустина, а именно: суммарная доза 300 мг/кг охарактеризована как высокая токсическая доза, суммарные дозы 200 и 100 мг/кг — как низкие токсические дозы. Это позволило рекомендовать Ормустин для дальнейшего исследования.

Ключевые слова: Ормустин, производные нитрозоалкилмочевин, доклиническое исследование, токсичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-98-105

PRE-CLINICAL STUDY OF SUBCHRONIC TOXICITY OF ORMUSTINE ON RATS

V.A. Chaley, O.I. Konyaeva, N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, T.V. Abramova, V.M. Bukhman, N.Yu. Kulbachevskaya
N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. In N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology Ministry of Health of Russia were made preclinical toxicological studies the lyophilized dosage form of ormustine (Ormustine), a new antitumor drug from the class of nitrosoureas. The paper presents some results of study the subchronic toxicity of Ormustine on rats.

Objective. The objective of present study was to investigate the subchronic toxicity of Ormustine on rats with a daily 3 times intravenous administration.

Materials and methods. The study was performed on 40 outbred male rats. Ormustine was administered intravenously daily 3 times in total doses of 300, 200 and 100 mg/kg. The observation period was 45 days. During the observation period, the necessary clinical and laboratory tests were performed. To study the damaging effect of Ormustine to organs and tissues, a pathomorphological examination was carried out at the 3rd and 45th day of observation.

Results. It has been established that Ormustine has hemato-, nephro-, cardio- and gastrointestinal toxicity when administered repeatedly to rats in the three doses studied. The depth and extent of damage, as well as their reversibility, depend on the magnitude of the applied dose of Ormustine.

Conclusion. On the basis of the data obtained, the levels of toxic doses of Ormustin have been determined, namely: a total dose of 300 mg/kg is characterized as a high toxic dose; total doses of 200 and 100 mg/kg are characterized as low toxic doses. This results allows Ormustin to be recommended for next study.

Key words: Ormustine, derivative of nitrosoalkylurea, preclinical study, toxicity, rats

Введение

Препараты из класса нитрозоалкилмочевин (НАМ) успешно применяются для лечения обширного спектра онкологических заболеваний. Особенности механизма действия НАМ обуславливают широту их спектра действия, высокую активность в отношении ряда солидных опухолей, отсутствие перекрестной резистентности с классическими алкилирующими агентами. Однако такие свойства НАМ, как низкая избирательность действия, отсроченная и кумулятивная токсичность, ограничивают их применение. В связи с этим проводится изыскание новых, потенциально эффективных в отношении противоопухолевого действия веществ из данного класса, обладающих более избирательным действием в сочетании с меньшей токсичностью [1–4].

Основываясь на данных о том, что клетка при перерождении в злокачественную увеличивает потребление аминокислот и ее мембрана обладает большей проницаемостью для них, чем мембрана нормальной клетки, в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН разработаны оригинальные методы синтеза большой группы алкилнитрозокарбамоилпроизводных аминокислот. Особенности их строения позволяют ожидать, помимо избирательной доставки в раковые клетки, и расширения спектра противоопухолевой активности за счет возможного образования в числе продуктов биodeградации этих молекул не только алкилирующих и карбомилирующих частиц, но и производных α -аминокислот – потенциальных антиметаболитов. В числе синтезированных и прошедших отбор соединений оказалось производное из класса НАМ на основе L-орнитина, получившее название Ормустин и прошедшее далее ряд доклинических испытаний в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [2, 4–6].

В лаборатории разработки лекарственных форм создана парентеральная лекарственная форма Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг (далее – Ормустин) [7–9].

В исследованиях, проведенных в лаборатории экспериментальной химиотерапии и лаборатории комбинированной терапии опухолей, Ормустин показал высокий противоопухолевый эффект на следующих перевиваемых опухолях: лимфоцитарная лейкемия P-388, лимфоидная лейкемия L-1210, рак шейки матки РШМ-5, меланома В-16, эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC), а также на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel1 [10–13].

В лаборатории фармакологии и токсикологии было проведено полное доклиническое токсикологическое исследование препарата, результаты которого частично представлены в научных журналах и виде тезисов на конференциях [14–18].

Цель исследования – доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого препарата Ормустин на крысах. **Задача исследования** – изучение субхронической токсичности препарата Ормустин при 3-кратном ежедневном внутривенном применении у неинбредных крыс-самцов.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с российскими и международными требованиями [19–25].

Работа проведена на 40 здоровых неинбредных крысах-самцах, полученных из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все животные были здоровы. Ормустин использовали в лиофилизированной лекарственной форме, полученной из лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Препарат вводили в рекомендованной концентрации (растворитель – 5 % раствор глюкозы) внутривенно ежедневно 3-кратно в 3 дозах, рассчитанных, исходя из максимально переносимой дозы, определенной в опытах по острой токсичности на крысах при внутривенном введении: суммарные дозы 300, 200 и 100 мг/кг. День последнего введения препарата принимали за 0, фоновые показатели фиксировали за 3 дня до начала введения препарата. В каждой группе животных использовали по 10 крыс, включая контроль. Пять крыс из каждой группы выводили из эксперимента на 3-и сутки, остальные 5 – на 45-е сутки после окончания курса введения препарата. Продолжительность наблюдения за животными после 3-кратного ежедневного внутривенного введения Ормустина составила 45 сут.

Критериями оценки субхронической токсичности были: число павших животных и сроки их гибели; клиническая картина интоксикации; поведенческие реакции; динамика массы тела животных; данные клинико-лабораторных исследований (клинический анализ крови, биохимический анализ сыворотки крови, суточный диурез, анализ мочи, микроскопия осадка мочи, электрокардиография – ЭКГ); данные аутопсии павших и выведенных из эксперимента животных с макроскопической и гистологической оценками.

При исследовании субхронической токсичности на крысах устанавливали уровни токсических доз, а именно:

- а) дозы, вызывающие значительные токсические изменения в органах и тканях, – высокие токсические дозы;
- б) вызывающие слабые незначительные изменения – низкие токсические дозы;
- в) не вызывающие нарушений в органах и тканях – высокие нетоксические дозы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel и BioStat Professional по критерию *t* Фишера–Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии.

Результаты

Ормустин во всех изученных дозах не вызывал гибели животных, не оказывал влияния на общее состояние животных, не изменял их поведенческие реакции. На протяжении всего срока наблюдения отмечались такие проявления токсического действия препарата, как алопеция, диарея, снижение массы тела и дальнейшее отставание в ее приросте, лейкоцито- и тромбоцитопения. Степень описанных изменений и скорость их обратимости зависели от величины примененной дозы Ормустина [15].

У крыс, получивших Ормустин в суммарных дозах 300 и 200 мг/кг, биохимическое исследование сыворотки крови в сравнении с показателями животных контрольной группы выявило на 3-и сутки наблюдения дозозависимое снижение уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ), обратимое к концу наблюдения, и увеличение содержания мочевины, к концу наблюдения прогрессирующее при применении препарата в дозе 300 мг/кг и обратимое при применении в дозе 200 мг/кг. Уровень остальных исследованных биомаркеров колебался на уровне показателей контрольных крыс и в пределах физиологической нормы для данного вида животных (рис. 1–2). Ормустин, примененный в суммарной дозе 100 мг/кг, не влиял на биохимические показатели сыворотки крови крыс.

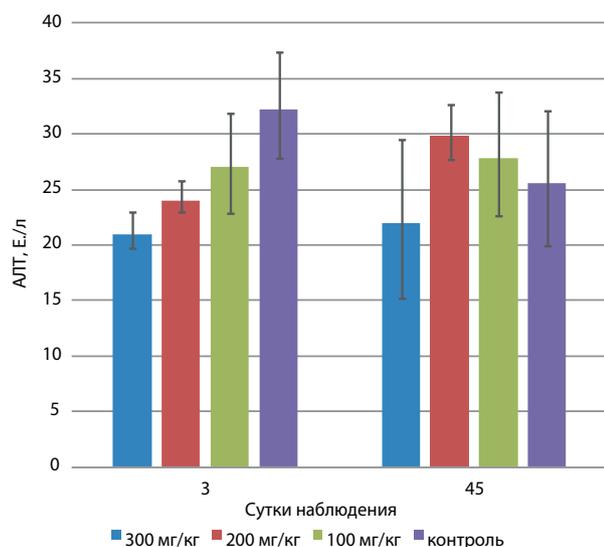


Рис. 1. Показатели АЛТ в сыворотке крови неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина

Исследование функций сердца не выявило количественных изменений показателей временных интервалов на ЭКГ животных. Однако отмечались качественные изменения: появление патологического комплекса QS на 3-и и 30-е сутки у 2 из 5 крыс, получивших Ормустин в суммарной дозе 300 мг/кг, и нарушение сердечного ритма (желудочковая экстрасистолия) на 15-е и 30-е сутки у 2 из 5 крыс после применения препарата в суммарной дозе 100 мг/кг.

Влияния Ормустина на суточный диурез крыс не отмечено на протяжении всего срока наблюдения. В моче крыс, получивших Ормустин в суммарной дозе 300 мг/кг, на 15-е и 45-е сутки наблюдения обнаружены гиалиновые цилиндры. У животных, получивших Ормустин в суммарных дозах 200 и 100 мг/кг, на протяжении всего срока наблюдения изменений в анализе мочи не отмечено.

При аутопсии морфометрический анализ внутренних органов крыс, получивших препарат во всех дозах, выявил дозозависимое уменьшение относительной массы тимуса и селезенки на раннем сроке по сравнению с данными контрольной группы. К концу наблюдения показатели восстановились до уровня контроля, однако у крыс, получивших препарат в дозе 300 мг/кг, увеличилась относительная масса почек [15].

Патоморфологический анализ показал, что повреждающему действию препарата подвергаются лимфопролиферативные органы, почки, тонкий кишечник и сердце. Глубина и степень этих повреждений, а также их обратимость зависят от величины примененной дозы Ормустина.

Так, у всех крыс, получивших препарат в суммарной дозе 300 мг/кг, к 3-м суткам наблюдения

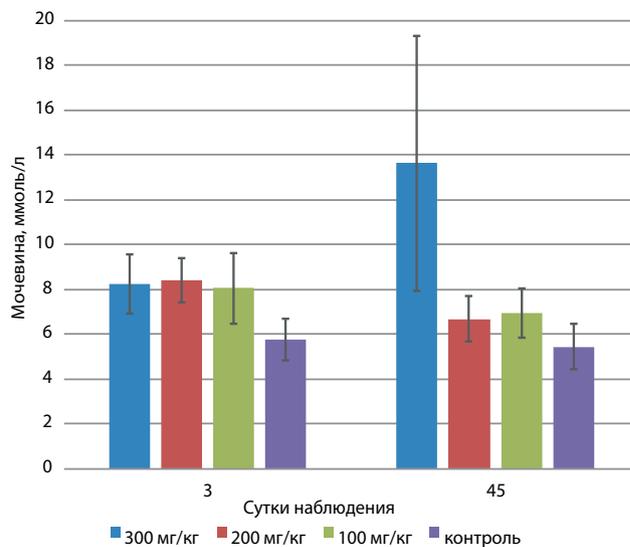


Рис. 2. Показатели мочевины в сыворотке крови неинбредных крыс-самцов после 3-кратного внутривенного ежедневного введения Ормустина

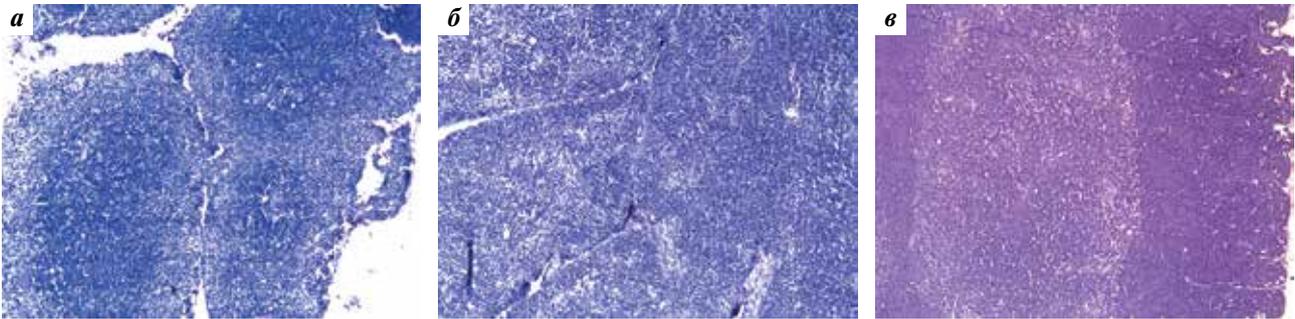


Рис. 3. Патоморфологическое исследование. Тимус крысы: а – Ормустин, 300 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Выраженная гипоплазия лимфоцитов в корковой зоне; б – Ормустин, 100 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Кортикальное и мозговое вещества без изменений. Морфологическая картина соответствует контролю; в – интактный контроль. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

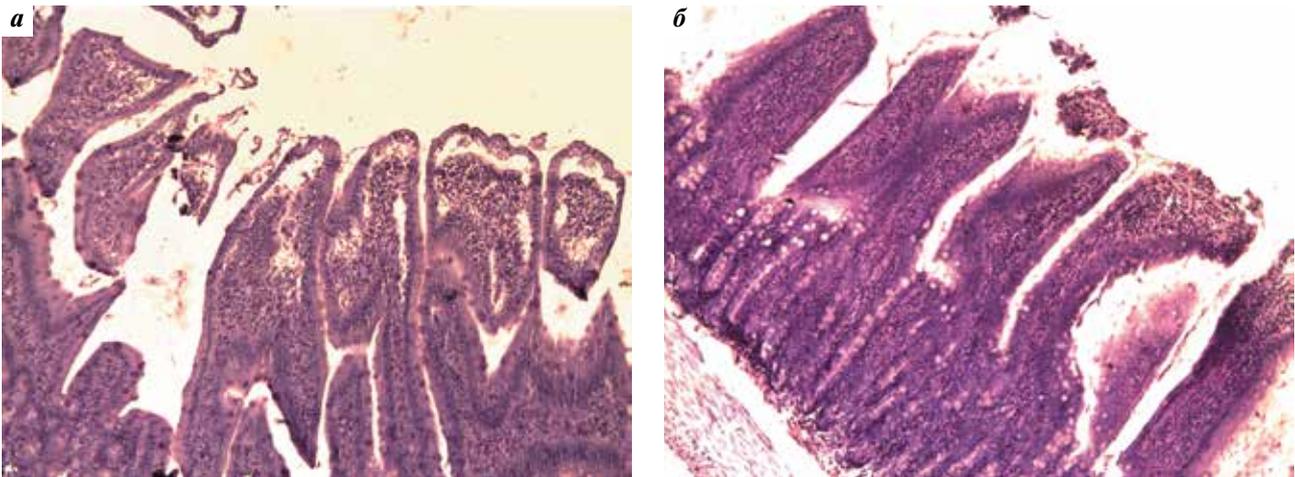


Рис. 4. Патоморфологическое исследование. Двенадцатиперстная кишка крысы: а – Ормустин, 200 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Отек и десквамация эпителия в апикальной части ворсинок. $\times 400$; б – интактный контроль. $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином

отмечали выраженную гипоплазию лимфоцитов в тимусе; дистрофические и деструктивные изменения в тонком кишечнике и почках – у большинства животных; гипоплазию кроветворных клеток в костном мозге и лейкоцитов в селезенке, а также участки гиперэозинофильных кардиомиоцитов (участки дистрофии и ишемии) в миокарде – у отдельных крыс. К концу наблюдения изменения сохранялись в тимусе и почках отдельных крыс. Ормустин, примененный в суммарной дозе 200 мг/кг, на раннем сроке вызывал сходные, но менее выраженные по сравнению с высокой дозой изменения в тимусе большинства крыс, в тонком кишечнике и почках отдельных крыс. К концу срока наблюдения морфологические изменения, отмеченные ранее, не выявлялись. Препарат в дозе 100 мг/кг не вызвал выраженных морфологических изменений в органах крыс как на 3-и, так и на 45-е сутки (рис. 3–7).

Оценивая в совокупности полученные данные, можно сказать, что Ормустин обладает дозозависимым гематотоксическим действием, вызывая обратимые тромбоцитопению и лейкоцитопению, про-

являющуюся снижением относительного количества лимфоцитов. Иммуносупрессивное действие препарата подтверждается морфометрически во всех дозах (уменьшение относительной массы тимуса и селезенки) и патоморфологически (гипоплазия лимфоцитов в корковом веществе в тимусе большинства крыс, в костном мозге и селезенке единичных крыс). Морфологические изменения регистрируются после применения Ормустина только в высокой и средней дозах и полностью обратимы к концу наблюдения лишь в средней дозе.

Нефротоксическое действие препарата, примененного в высокой и средней дозах, затрагивает на раннем сроке корковое вещество почек, что проявляется в виде сморщенных (спавшихся) сосудистых клубочков и деструктивных очаговых изменений извитых и прямых канальцев. На позднем сроке изменения частично выявляются и в мозговом веществе почек у крыс, получивших Ормустин в высокой дозе. Клинически это проявляется прогрессирующим возрастанием уровня мочевины в сыворотке крови, обнаружением единичных гиалиновых цилиндров

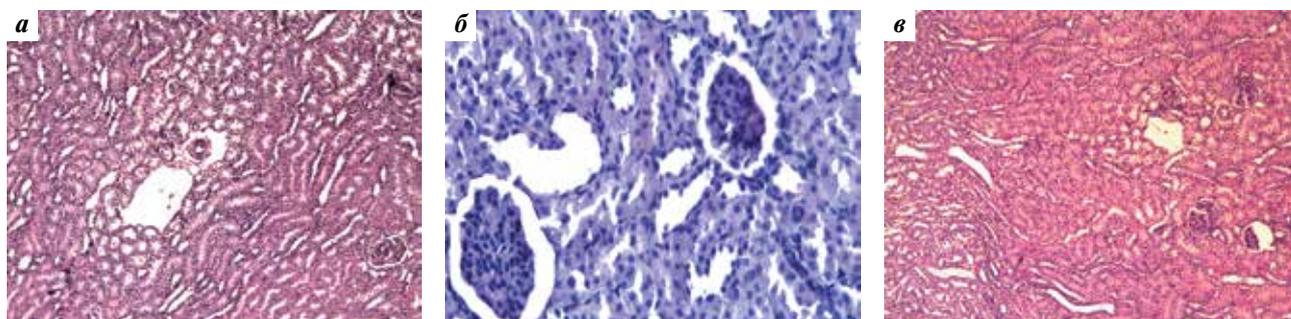


Рис. 5. Патоморфологическое исследование. Почка крысы. Кортикальное вещество: а – Ормустин, 200 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Периваскулярный отек. Участок извитых канальцев с признаками повреждения; в просвете канальцев комочки бесструктурных масс; б – Ормустин, 200 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Уплотнение и спадение сосудистых петель клубочков. $\times 400$; в – интактный контроль. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 100$

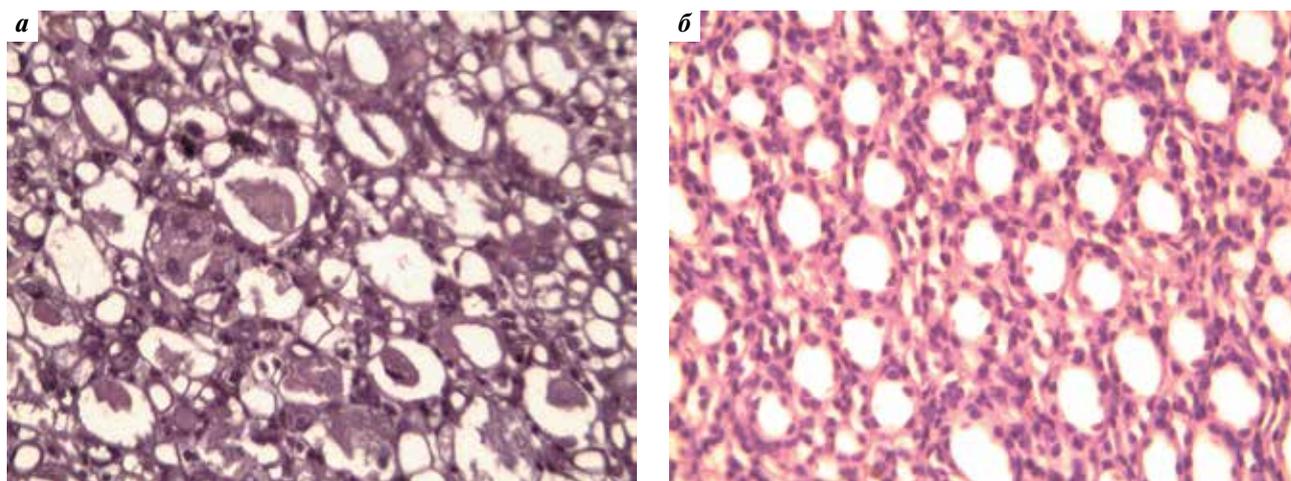


Рис. 6. Патоморфологическое исследование. Почка крысы. Мозговое вещество: а – Ормустин, 300 мг/кг, 45-е сутки наблюдения. Деструктивные изменения в мозговом веществе. В просвете прямых канальцев и собирательных трубочек десквамированный эпителий и бесструктурные массы (цилиндры); б – интактный контроль. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 400$

в моче на 15-е и 45-е сутки наблюдения, а морфометрически – увеличением относительной массы почек.

Препарат, примененный в суммарных дозах 300 и 200 мг/кг, обладает также дозозависимой обратной гастроинтестинальной токсичностью, проявляющейся клинически снижением массы тела крыс в начале наблюдения и дальнейшим отставанием в ее приросте; диареей у некоторых крыс в начале срока наблюдения, а при патоморфологическом исследовании – десквамацией эпителия апикальной части ворсинок тонкого кишечника у отдельных крыс.

Ормустин обладает также кардиотоксическим действием. Это проявляется клинически в виде качественных изменений на ЭКГ у отдельных крыс, получивших препарат в суммарной дозе 300 мг/кг, что является результатом ишемии или метаболических нарушений миокарда, зарегистрированных морфологически в виде гиперэозинофилии кардиомиоцитов на раннем сроке (рис. 7а). Что касается нарушений сердечного ритма у некоторых крыс, получивших Ормустин в дозе 100 мг/кг, мы расцени-

ваем эти изменения как погрешность методики регистрации ЭКГ (влияние многократного эфирного наркоза) и считаем эту дозу не кардиотоксичной, так как морфологически функциональные изменения, отмеченные при применении препарата в данной дозе, не подтверждаются (см. рис. 7).

Вышеупомянутое небольшое снижение активности АЛТ в сыворотке крови крыс, получивших Ормустин в суммарных дозах 300 и 200 мг/кг, по-видимому, является на раннем сроке следствием почечной недостаточности, а на позднем сроке наблюдения – следствием снижения всасывания в тонком кишечнике пиридоксина.

Заключение

В ходе изучения субхронической токсичности Ормустина на крысах установлено, что препарат при многократном применении в суммарной дозе 300 мг/кг обладает гемато-, нефро-, гастроинтестинальной и кардиотоксичностью, причем повреждения ткани почек и тимуса обратимы не полностью

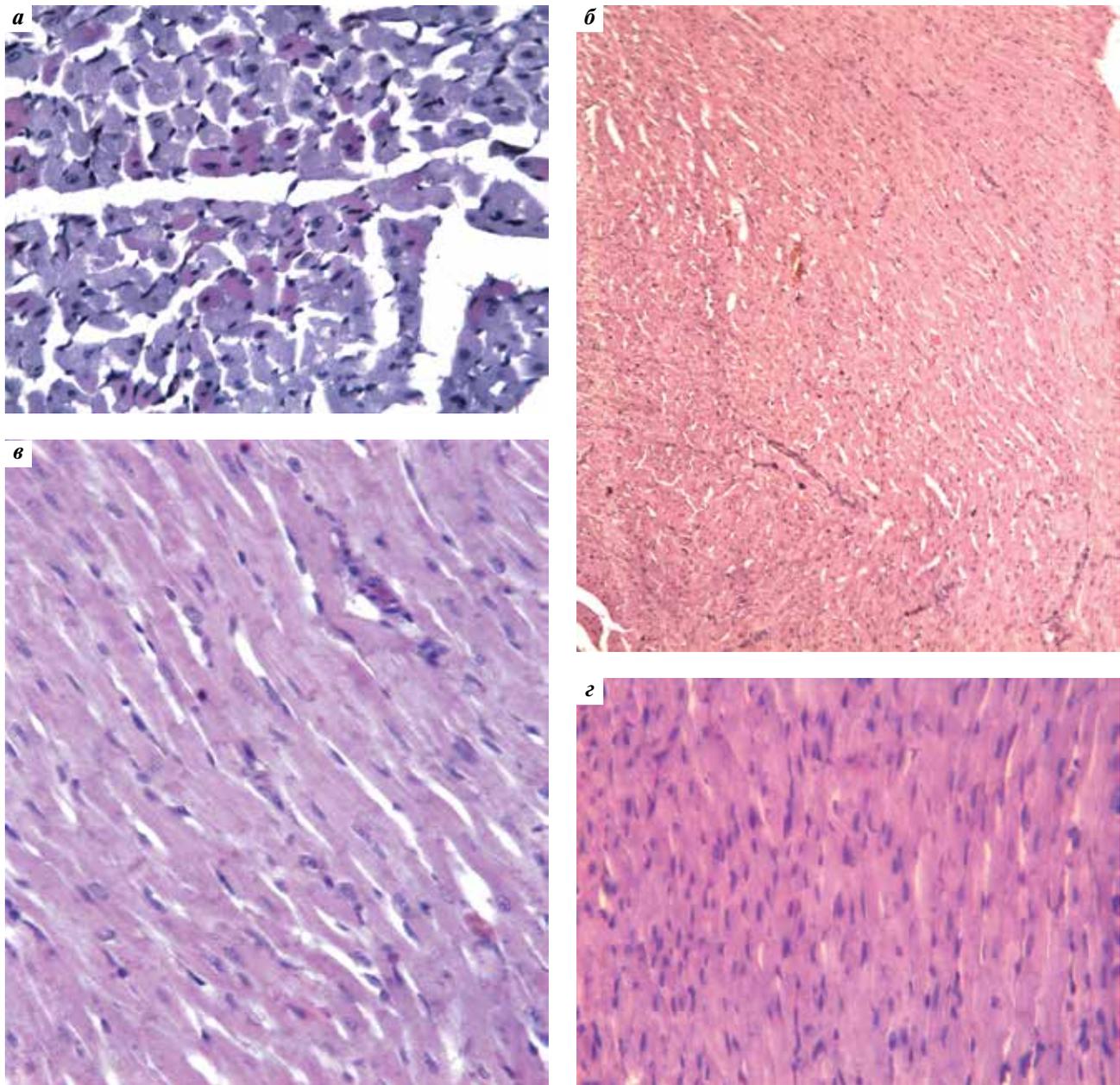


Рис. 7. Патоморфологическое исследование. Сердце крысы: а – Ормустин, 300 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Миокард левого желудочка. Поперечный срез. Отдельные кардиомиоциты с признаками набухания и гиперэозинофилии. $\times 400$; б – Ормустин, 100 мг/кг, 3-и сутки наблюдения. Миокард. Морфологическая картина соответствует контролю. $\times 100$; в – Ормустин, 100 мг/кг, 45-е сутки наблюдения. Миокард. Морфологическая картина соответствует контролю. $\times 400$; г – интактный контроль. Миокард. $\times 400$. Окраска гематоксилином и эозином

и через 45 сут после окончания курса введения Ормустина. В суммарной дозе 200 мг/кг препарат вызывает сходные менее выраженные по сравнению с высокой дозой и полностью обратимые функциональные и морфологические изменения, затрагивающие только почки, тимус и тонкий кишечник. В суммарной дозе 100 мг/кг препарат проявляет свои токсические свойства только в виде обратимой алопеции и уменьшения относительных масс тимуса и селезенки. Таким образом, глубина и степень повреждений внутренних органов, а также их обра-

тимность зависят от величины примененной дозы Ормустина.

На основании полученных данных определены уровни токсических доз Ормустина, а именно: суммарная доза 300 мг/кг охарактеризована как высокая токсическая доза (вызывающая значительные токсические изменения в органах и тканях); суммарные дозы 200 и 100 мг/кг – как низкие токсические дозы (вызывающие слабые незначительные изменения в органах и тканях). Полученные результаты позволили рекомендовать Ормустин для дальнейшего исследования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Корман Д.Б. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. М.: Практическая медицина, 2014. С. 46–57. [Korman D.B. Targets and mechanisms of action of anticancer drugs. M.: Practical medicine, 2014. Pp. 46–57. (In Russ.)].
2. Краснов В.П., Левит Г.Л., Барышникова М.А. и др. Нитрозомочевина на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат Лизомустин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):46. [Krasnov V.P., Levit G.L., Baryshnikova M.A. et al. Nitrosourea on the basis of amino acids. Original anticancer drug Lisomustin. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2013;12(2):46. (In Russ.)].
3. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. Противоопухолевые препараты, производные нитрозоалкилмочевины, применяемые для лечения новообразований различного генеза. Биофармацевтический журнал 2014;6(5):38–51. [Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. Antineoplastic preparations derivative of nitrosoalkylurea for treatment of cancer neoplastic of different genesis. Biofarmatsevticheskiy zhurnal = Biopharmaceutical journal 2014;6(5):38–51. (In Russ.)].
4. Левит Г.Л. Аминокислоты в регио- и стереонаправленном синтезе физиологически активных соединений. Автореф. дис. ... докт. хим. наук. Екатеринбург, 2009. [Levit G.L. Amino acids in regio- and stereoselective synthesis of physiologically active compounds. Abstract dis.... doc. chem. sciences. Ekaterinburg, 2009. (In Russ.)].
5. Manig F., Kuhne K., von Neubeck C. et al. The why and how of amino acid analytics in cancer diagnostics and therapy. Journal of Biotechnology 2017;242:30–54. PMID: 27932276. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.001.
6. Краснов В.П., Левит Г.Л., Матвеева Т.В. и др. Патент РФ № 2503657, 2012. Nδ-нитрозо-Nδ-[(2-хлорэтил) карбамоил]-L-орнитин. [Krasnov V.P., Levit G.L., Matveeva T.V. et al. Patent of the Russian Federation No. 2503657, 2012. Nδ-nitroso-Nδ-[(2-chloroethyl)-carbamoyl]-L-ornithine. (In Russ.)].
7. Бунятян Н.Д., Николаева Л.Л., Олефир Ю.В. и др. Валидация методики количественного определения ормустина в лиофилизированной лекарственной форме. Химико-фармацевтический журнал 2017;51(11):53–6. [Bunyatyanyan N.D., Nikolaeva L.L., Olefir Yu.V. et al. Validation of methods of quantitative determination of ormustine in a lyophilized dosage form. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Chemical-pharmaceutical journal 2017;51(11):53–6. (In Russ.)].
8. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевины. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):113. [Nikolaeva L.L., Lantsova A.V., Sanarova E.V. et al. The parenteral dosage form new connection of class nitrosoalkylurea. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):113. (In Russ.)].
9. Nikolaeva, L., Oborotova, N., Bunyatyan, N. et al. The development of a parenteral pharmaceutical formulation of a new class of compounds of nitrosourea. Pharmaceuticals 2016;9(4):68. PMID: 27318283. DOI: 10.3390/ph9040068.
10. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкилмочевин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):8. [Baryshnikova M.A., Albassit B., Saprykina N.S. et al. Anticancer activity of new compounds from the class of nitrosoalkylurea. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2013;12(2):8. (In Russ.)].
11. Сапрыкина Н.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая активность ормустина на перевиваемых солидных опухолях мышей. Часть I. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):55–60. [Saprykina N.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Antitumor activity of ormustine in transplantable solid tumors of mice. Part I. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2017;16(4):55–60. (In Russ.)].
12. Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Калишьян М.С. и др. Сравнительное изучение нового нитрозопроизводного ормустина с мустофораном на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):132–3. [Smirnova G.B., Borisova Yu.A., Kalishyan M.S. et al. Comparative study of a new nitrosated derivatives ormustine with mustophoran on subcutaneous xenografts of human melanoma Mel7. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):132–3. (In Russ.)].
13. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая эффективность ормустина, нового препарата класса алкилнитрозомочевин, в отношении перевиваемых опухолей мышей. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):133. [Smirnova Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Antitumor efficacy of ormustine, a new drug class nitrosoalkylurea, against transplantable tumors of mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):133. (In Russ.)].
14. Чалей В.А., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю. и др. Изучение «острой» токсичности Ормустина на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):143–4. [Chaley V.A., Konyayeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu. et al. The study of the acute toxicity of Ormumine in small laboratory animals. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(1):143–4. (In Russ.)].
15. Чалей В.А., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого препарата Ормустин на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):65–72. [Chaley V.A., Konyayeva O. I., Ermakova N.P. et al. Preclinical toxicity study of a new antineoplastic drug Ormumine in small laboratory animals. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2015;14(4):65–72. (In Russ.)].
16. Ермакова Н.П., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю. и др. Изучение алергизирующих свойств Ормустина на морских свинках. Оценка анафилактической активности. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):37–8. [Ermakova N.P., Konyayeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu. Study of allergic properties of Ormumine on Guinea pigs. Assessment of anaphylactic activity. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. = Russian biotherapeutic journal 2016;15(1):37–8 (In Russ.)].
17. Меркулова И.Б., Абрамова Т.В., Коняева О.И. и др. Патоморфологи-

- ческое исследование внутренних органов крыс и собак при изучении субхронической токсичности лиофилизированной лекарственной формы ормустина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):64–5. [Merkulova I.V., Abramova T.V., Konyaeva O.I. et al. Pathomorphological examination of internal organs of rats and dogs in the subchronic toxicity study of lyophilized dosage form of ormustine. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2016;15(1):64–5. (In Russ.)].
18. Чалей В.А., Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю. и др. Доклиническое токсикологическое изучение лиофилизированной лекарственной формы Ормустина. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):115–6. [Chaley V.A., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu. et al. Pre-clinical toxicological study of a lyophilized dosage form of ormustine. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian biotherapeutic journal 2016;15(1):115–6. (In Russ.)].
19. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
20. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабахян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002:1–53. [Bolshakov O.P., Neznanov N.G., Babakhyan R.V. Didactic and Ethical Aspects of Research on Biomodels and Laboratory Animals. Good clinical practice 2002:1–53. (In Russ.)].
21. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 170–204. [Methodological instructions for studying the general toxic effects of antitumor drugs. In: Guide to experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed. by R. U. Khabriev. 2th ed., revised and additional edition. M.: Medicine, 2005. Pp. 170–204. (In Russ.)].
22. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–24. [A guide to preclinical drug research. Ed. by A.N. Mironov. M: Grif and Co, 2012. Pp. 13–24. (In Russ.)].
23. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 53434–2009). М.: Стандартинформ, 2010. [Principles of Good Laboratory Practice. National Standard of the Russian Federation (GOST 53434–2009). Moscow: Standartinform, 2010. (In Russ.)].
24. Об утверждении Правил лабораторной практики. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 1 апреля 2016 г. N 199н. [On approval of the Rules of Laboratory Practice. Order of the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation from 01 April 2016 No. 199n. (In Russ.)].
25. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств 2-е изд., доп. М., 2008. 196 с. [Gus'kova T.A. Toxicology of medicines (second edition supplemented). Moscow, 2008. 196 p. (In Russ.)].

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Чалей/V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>

В.М. Бухман/V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>

Н.Ю. Кульбачевская/N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

АССОЦИАЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ОСНОВНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ РАЗВИТИЯ РАКА ЖЕЛУДКА С ЕГО МЕТАСТАЗИРОВАНИЕМ

Ф.М. Кипкеева¹, Т.А. Музаффарова¹, М.П. Никулин², П.В. Апанович¹, С.Н. Неред², М.Н. Нариманов²,
О.А. Малихова², Т.А. Богущ², И.С. Стилиди², А.В. Карпукхин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1;

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

Контакты: Фатима Магомедовна Кипкеева Foru_k@mail.ru

Цель исследования — выявление генов, экспрессия которых ассоциирована с метастазированием опухоли рака желудка (РЖ).
Материалы и методы. Использовали метод количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени на парных образцах опухоль — норма.

Результаты. Показана ассоциация с метастазированием экспрессии генов VEGF R1, FGFR2 и NRP-1. Значение отношения шансов (ОШ) оказалось наибольшим для гена FGFR2: ОШ 175,00; 95 % доверительный интервал (ДИ) 8,972–3413,271; для гена VEGFR1 — ОШ 4,622; 95 % ДИ 1,240–17,227, для NRP1 — ОШ 2,667; 95 % ДИ 0,597–11,915. При оценке совместно повышенной экспрессии генов VEGFR1 и NRP1 — ОШ 5,778; 95 % ДИ 1,393–23,909; $p = 0,0147$. Частота повышенной экспрессии FGFR2 составила 5 % при диссеминированном РЖ, в то время как при локализованном РЖ она достигает 53 %.

Заключение. Разрабатываемый таргетный препарат против FGFR2, скорее всего, при диссеминированном РЖ будет иметь ограниченную 5–10 % частоту эффективного действия. Его применение на ранних стадиях РЖ может способствовать предотвращению перехода опухоли в метастатическую стадию. Возможное взаимодействие VEGFR1 и NRP1 будет приводить к небольшому вкладу в метастазирование РЖ по сравнению с влиянием экспрессии только VEGFR1.

Ключевые слова: рак желудка, метастазирование, экспрессия генов

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-106-110

ASSOCIATION OF GASTRIC CANCER MAIN SIGNALING PATHWAY GENE EXPRESSION WITH METASTASIS

F.M. Kipkeeva¹, T.A. Muzaffarova¹, M.P. Nikulin², P.V. Apanovich¹, S.N. Nered², M.N. Narimanov²,
O.A. Malikhova², T.A. Bogush², I.S. Stilidi², A.V. Karpukhin¹

¹Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechie St., Moscow 115478, Russia;

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

Objective of the study. Identification of genes, the expression of which is associated with the metastasis of gastric cancer tumor.

Materials and methods. Quantitative real-time PCR on paired tumor — normal samples.

Results. An association with the metastasis of the VEGFR1, FGFR2 and NRP-1 gene expression is shown. The odds ratio (OR) was the highest for the FGFR2 gene: OR 175.00; 95 % CI 8.972–3413.271; for the VEGFR1 gene, OR 4.622, 95 % CI 1.240–17.227, for NRP1 — OR 2.667; 95 % CI 0.597–11.915. When assessing the jointly elevated expression of VEGFR1 and NRP1 genes, OR 5,778; 95 % CI 1.393–23.909; $p = 0.0147$. The frequency of increased expression of FGFR2 was 5 % in case of metastasis, while in the case of localized GC it reached 53 %.

Conclusion. The target drug against FGFR2, which is being developed, is likely to have a limited 5–10 % frequency of effective action in metastatic GC. Its use in the early stages of GC can help prevent the transition of the tumor to the metastatic stage. The possible interaction of VEGFR1 and NRP1 will result in a small contribution to the metastasis of GC as compared to the effect of VEGFR1-only expression.

Key words: gastric cancer, metastasis, gene expression

Введение

Рак желудка (РЖ) относится к наиболее распространенным типам онкологических заболеваний, занимает 4-е место в мире по частоте случаев и характеризуется плохой выживаемостью [1].

Одной из причин высокой смертности больных РЖ является частый переход болезни в метастатическую стадию. В связи с этим весьма актуальным является выявление генов, ассоциированных с метастазированием опухоли. Знание таких генов и особенностей

их функционирования при переходе к диссеминированному состоянию позволит персонализировать терапию и, следовательно, повысить ее эффективность. При этом могут открываться перспективы терапии не только метастатического РЖ, но и более ранних его стадий для предотвращения образования метастазов. Кроме того, такие гены могут быть источником биомаркеров, сигнализирующих о повышенном риске метастазирования опухоли.

В терапии разных типов рака в настоящее время активно используются таргетные препараты, воздействующие на конкретные гены-мишени. При РЖ используют таргетные препараты трастузумаб – моноклональное антитело против HER2 – и рамцирумаб, ингибирующий тирозинкиназный рецептор VEGFR2. Кроме того, разрабатываются средства терапии, направленные на другие гены-мишени, относящиеся к основным путям развития РЖ – PI3K-AKT-mTOR и RAS-RAF-MEK. В качестве мишеней при этом чаще всего рассматриваются ростовые факторы и их рецепторы. К таковым относятся эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), трансформирующий фактор роста (TGF- β), нейропиплин1 (NRP1) [2, 3]. Последний из указанных способен связываться с разными лигандами (TGF- β , FGF) и рецепторами VEGF (VEGFR1 и VEGFR2), модулируя их активность [4].

Цель исследования – выявление генов, экспрессия которых ассоциирована с метастазированием опухоли при диссеминированном раке желудка (ДРЖ) и РЖ на более ранних стадиях.

Материалы и методы

От каждого больного, включенного в исследование, были взяты парные образцы нормальной и опухолевой тканей желудка. Забор материала проводился при биопсии (во время фиброгастроскопии) или во время операции пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Были исследованы парные образцы (опухоль – норма) ткани желудка 30 больных ДРЖ в возрасте 29–87 лет и 25 больных с РЖ без отдаленных метастазов (I–III стадии) в возрасте 39–80 лет. Все образцы охарактеризованы гистологически. Основное их число представлено аденокарциномой.

Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в парных образцах опухоль – норма изучали уровни экспрессии мРНК генов *VEGF*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *NRP1*, *bFGF*, *FGFR2*, *TGF- β* , *HER2/neu*.

Из каждой пары образцов выделяли суммарную фракцию РНК. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Mini Kit (QIAGEN, США). Обратную транскрипцию проводили, используя набор ImProm-II™

Reverse Transcriptase (Promega, США). ПЦР-РВ осуществляли на приборе Step One Plus фирмы Applied Biosystems (США). Каждое измерение проводили трехкратно. ПЦР-РВ проводили с использованием наборов TaqMan® Gene Expression Assays в соответствии с инструкцией изготовителя.

Использованные наборы:

HER 2 – TagMan Gene Expression Assay Hs 01001580_m1.

VEGFA – TagMan Gene Expression Assay Hs 00900055_m1.

NRP1 – TagMan Gene Expression Assay Hs00826128_m1.

bFGF / FGF2 – TagMan Gene Expression Assay Hs00266645_m1.

TGF β – TagMan Gene Expression Assay Hs00998133_m1.

FGFR2 – TagMan Gene Expression Assay Hs01552918_m1.

VEGFR1 / FLT1 – TagMan Gene Expression Assay Hs01052961_m1.

VEGFR2 / KDR – TagMan Gene Expression Assay Hs00911700_m1.

GAPDH – TagMan Gene Expression Assay Hs02786624_g1.

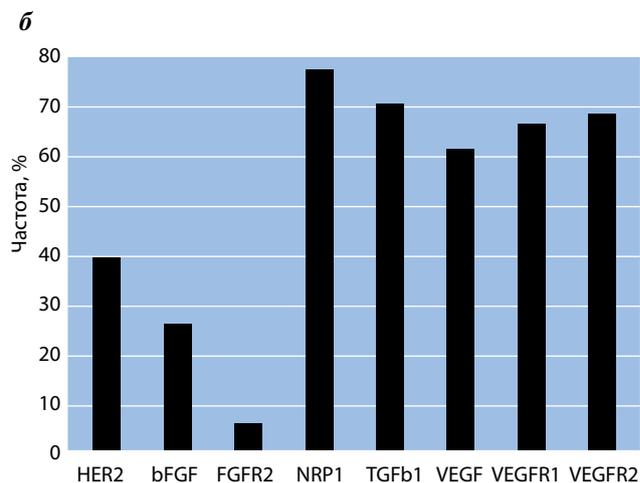
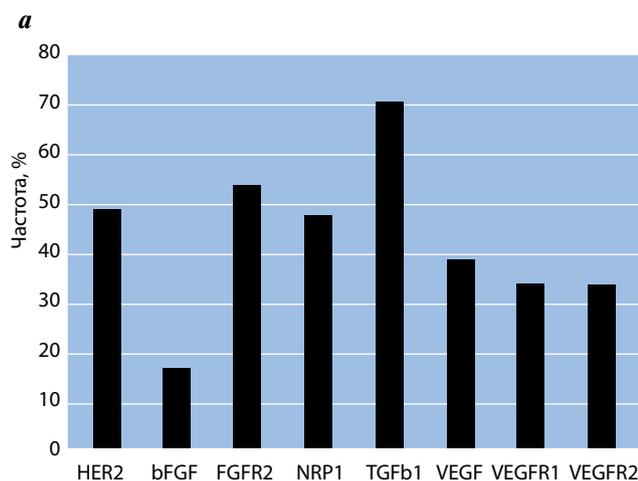
Для анализа полученных результатов использовали встроенную программу Applied Biosystems Step One Plus. В качестве контрольного использовали ген *GAPDH*. В результате обработки измерений получены значения уровней экспрессии генов в опухолевой ткани относительно нормальной. Пороговый уровень экспрессии гена в опухоли определяли с помощью ROC-анализа. Для гена *VEGFR1* он составил $>0,5$, для генов *FGFR2* и *NRP1*: 0 и $>0,97$ соответственно.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета стандартных программ Statistica 10 и программы MedCalc. Были применены методы – точный критерий Фишера и ROC-анализ. Уровень значимости для выявленных различий принимали при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Были исследованы особенности экспрессии ряда генов – в образцах РЖ на ранних этапах развития (до диссеминированного состояния) и ДРЖ. На рисунке представлены результаты определения уровней экспрессии на ранних стадиях развития РЖ относительно нормальной ткани того же органа и при диссеминированном состоянии.

Частота повышенной относительно нормы экспрессии исследованных генов при ДРЖ в ряде случаев имеет тенденцию к повышению (гены *VEGFR1*, *VEGFR2* и *NRP1*) или снижению (ген *FGFR2*) по отношению к более ранним стадиям развития РЖ (см. рисунок).



Частоты повышенной относительно нормы уровней экспрессии генов на ранних стадиях (до диссеминированного состояния) развития РЖ (а) и при ДРЖ (б)

Для этих генов (*FGFR2*, *VEGFR1*, *VEGFR2* и *NRP1*) найдены статистически значимые различия в частотах повышенной экспрессии ($p = 0,0001–0,04$, точный критерий Фишера). Частота повышенной экспрессии генов *VEGFR1*, *VEGFR2* при ДРЖ возросла примерно в 2 раза. Эти гены были выбраны для более детального изучения различий в экспрессии при ДРЖ и местно-распространенном РЖ.

Был применен ROC-анализ. Результаты определения связи уровней экспрессии изучаемых генов с диссеминацией опухоли РЖ приведены в таблице.

Результаты определения связи уровней экспрессии генов с метастазированием опухоли РЖ

Ген	Отдаленные метастазы, значения p при ДРЖ и РЖ без отдаленных метастазов (I–III стадии)	
	ROC-анализ	Точный критерий Фишера
<i>VEGFR1</i>	0,0001	0,0009
<i>FGFR2</i>	0,0029	0,0074
<i>NRP1</i>	0,0159	0,0168
<i>VEGFR2</i>	0,405	–

Экспрессия 3 генов – *VEGFR1*, *FGFR2* и *NRP1* – связана с метастазированием опухоли РЖ (см. таблицу). Такая связь остается значимой и при применении поправки FDR на множественность сравнений. Экспрессия гена *VEGFR2* не ассоциирована с ДРЖ.

Дополнительно ассоциация 3 указанных генов с ДРЖ была проверена с помощью точного критерия Фишера с использованием пороговых значений экспрессии, определенных при ROC-анализе.

Полученные данные свидетельствуют о схожести результатов, полученных двумя статистическими методами.

Значение отношения шансов (ОШ) оказалось наибольшим для гена *FGFR2*: ОШ 175,00; 95 % доверительный интервал (ДИ) 8,972–3413,271, что говорит о максимальном среди 3 изученных генов различии между ДРЖ и РЖ на более ранних стадиях. Для гена *VEGFR1* ОШ 4,622; 95 % ДИ 1,240–17,227. Наихудший среди 3 генов результат получен для гена *NRP1*: ОШ 2,667; 95 % ДИ 0,597–11,915. Значение нижней границы 95 % ДИ < 1 для значения ОШ ставит под сомнение пригодность использования экспрессии этого гена в качестве маркера метастазирования.

Ген *FGFR2* (2-й рецептор фактора роста фибробластов) связан с пролиферацией опухолевых клеток и неблагоприятным прогнозом развития РЖ [5]. Пациенты с повышенной экспрессией *FGFR2* в аденокарциноме желудка имеют более низкую выживаемость. Этот ген рассматривается в качестве таргетной мишени. На модели ксенотрансплантата РЖ с амплификацией *FGFR2* ингибирование этого рецептора дает существенный эффект [6]. Препараты, разработанные против *FGFR2*, в настоящее время проходят клинические испытания (NCT02318329).

В нашей работе частота повышенной экспрессии *FGFR2* составила 5 % при ДРЖ, в то время как при локализованном РЖ она достигает 53 %. Такое значение практически совпадает с определенной иммуногистохимическим методом частотой повышенной экспрессии *FGFR2* при РЖ – 51 % [7]. При этом полученная нами частота повышенной экспрессии *FGFR2* при ДРЖ близка к частоте его амплификации среди больных ДРЖ, в том числе подвергавшихся системной терапии [8].

Как следует из полученных результатов, разрабатываемый таргетный препарат против *FGFR2*, скорее всего, при ДРЖ будет иметь ограниченную 5–10 % частоту эффективного действия. В то же время при локализованном РЖ такой препарат может быть

эффективным примерно в половине случаев. С учетом связи повышенной экспрессии *FGFR2* с прогрессией опухоли [7] и найденной нами связи с метастазированием его применение на ранних стадиях РЖ может способствовать предотвращению перехода опухоли в метастатическую стадию.

Ген *VEGFR1* является одним из ключевых факторов, регулирующих ангиогенез. Значение уровня его экспрессии для развития метастазов было продемонстрировано для некоторых типов рака. Так, повышенный уровень экспрессии гена *VEGFR1* приводит к увеличению риска метастазирования рака шейки матки [9] и увеличению степени злокачественности клеток меланомы [10]. Повышенная экспрессия найдена при метастатической меланоме [11]. Активация *VEGFR1* способна влиять на вероятность метастазирования при колоректальном раке [12].

Однако при РЖ значение уровня экспрессии гена *VEGFR1* в опухоли для ее метастазирования ранее не было определено. Как найдено в нашей работе, экспрессия *VEGFR1* с высокой значимостью (см. таблицу) ассоциирована с метастазированием РЖ. Возможно, такая связь обусловлена особенностями структуры белка этого гена, приводящими к запуску процессов миграции клеток [13].

NRP1 – трансмембранный гликопротеин, принимающий участие в VEGF-опосредованном ангиогенезе. Он выступает в качестве многофункционального корцептора, связываясь и модулируя активность различных лигандов и рецепторов, включая *VEGFR1*. Как корцептор, *NRP1* способен принимать участие в метастазировании клеток рака [14].

В соответствии с полученными нами результатами экспрессия *NRP1* ассоциирована с метастазированием РЖ, хотя и с пограничным уровнем значимости. Учитывая возможное взаимодействие *VEGFR1* с *NRP1*, потенциально способное усилить действие *VEGFR1*, была проведена оценка ассоциации с метастазированием случаев совместно повышенной экспрессии генов *VEGFR1* и *NRP1*. При таком подходе – ОШ 5,778; 95 % ДИ 1,393–23,909, $p = 0,0147$, т. е. ОШ по отношению к таковому для экспрессии гена *VEGFR1* возрастает примерно на 24 %. Увеличивается и нижняя граница ДИ. Если исходить из предположения взаимодействия *VEGFR1* и *NRP1*, полученные результаты свидетельствуют о небольшом вкладе такого взаимодействия в развитие метастазирования РЖ по сравнению с влиянием экспрессии только *VEGFR1*.

Заключение

Таким образом, показана ассоциация с метастазированием экспрессии генов *VEGFR1*, *FGFR2* и *NRP1*. Частота повышенной экспрессии *FGFR2* составила 5 % при ДРЖ, в то время как при локализованном РЖ она достигает 53 %. Как следует из полученных результатов, разрабатываемый таргетный препарат против *FGFR2*, скорее всего, при ДРЖ будет иметь ограниченную 5–10 % частоту эффективного действия. Его применение на ранних стадиях РЖ может способствовать предотвращению перехода опухоли в метастатическую стадию. Возможное взаимодействие *VEGFR1* и *NRP1*, в соответствии с полученными результатами, будет приводить к небольшому вкладу в метастазирование РЖ по сравнению с влиянием экспрессии только *VEGFR1*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Sitarz R., Skierucha M., Mielko J. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res* 2018;10:239–48. PMID: 29445300. DOI: 10.2147/CMAR.S149619.
- Smyth E.C., Cunningham D. Targeted therapy for gastric cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2012;13(3):377–89. DOI: 10.1007/s11864-012-0192-6.
- Prud'homme G. J. and Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012;3(9):921–39.
- Li L., Jiang X., Zhang Q. et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional coreceptors. *J Experimental & Clinical Cancer Research* 2016;35:16. PMID: 26795388. DOI: 10.1186/s13046-016-0291-5.
- Su X., Zhan P., Gavine P.R. et al. *FGFR2* amplification has prognostic significance in gastric cancer: results from a large international multicentre study. *Br J Cancer* 2014;110(4):967–75. PMID: 24457912. DOI: 10.1038/bjc.2013.802.
- Liang Xie, Xinying Su, Lin Zhang et al. *FGFR2* Gene Amplification in Gastric Cancer Predicts Sensitivity to the Selective *FGFR* Inhibitor AZD4547 2572. *Clin Cancer Res* 2013;19:2572–83. PMID: 23493349. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3898.
- Murase H., Inokuchi M., Takagi Y. et al. Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer. *Mol Clin Oncol* 2014;2(4):509–17. PMID: 24940486. DOI: 10.3892/mco.2014.293.
- Shoji H., Yamada Y., Okita N. et al. Amplification of *FGFR2* Gene in Patients with Advanced Gastric Cancer Receiving Chemotherapy: Prevalence and Prognostic Significance. *Anticancer Res* 2015;35(9):5055–61. PMID: 26254407.
- Dang Y.-Z., Zhang Y., Li J.-P. et al. High *VEGFR1/2* expression levels are predictors of poor survival in patients with cervical cancer. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(1):e5772. PMID: 28072723. DOI: 10.1097/MD.0000000000005772.
- Тырси́на Е.Г., Никулицкий С.И., Иншаков А.Н., Рябая О.О. *VEGF-R1* как потенциальная молекулярная мишень противоопухолевой терапии.

Доклады академии наук

2018;478(2):236–39.

DOI: 10.7868/S086956521802024X.

[Tyrina E.G., Nikulickij S.I.,

Inshakov A.N., Ryabaya O.O.

VEGFR1 as a potential molecular target

of anticancer therapy. Doklady akademii

nauk = Reports of the Academy

of Sciences 2018;478(2):236–39.

(In Russ.)].

11. Mehnert J.M., McCarthy M. M., Aziz S.A. et al. VEGF, VEGFR1, and VEGFR2 expression in melanoma.

Journal of Clinical Oncology

2007;25 (18, suppl):8520. DOI: 10.1200/

jco.2007.25.18_suppl.8520.

12. Jayasinghe C., Simiantonaki N., Kirkpatrick C.J. Cell type- and tumor zone-specific expression of pVEGFR-1 and its ligands influence colon cancer metastasis. BMC Cancer 2015;15:104. PMID: 25880726.

DOI: 10.1186/s12885-015-1130-3.

13. Weddell J.C., Chen S., Imoukhuede P.I. VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLC γ and PI3K

pathways. NPJ Systems Biology and

Applications 2018;4:1.

PMID: 29263797.

DOI: 10.1038/s41540-017-0037-9.

14. Tse B.W. C., Volpert M., Rattner E. et al. Neuropilin-1 is upregulated in the adaptive response of prostate tumors to androgen-targeted therapies and is prognostic of metastatic progression and patient mortality. Oncogene 2017;36(24):3417–27. PMID: 28092670. DOI: 10.1038/onc.2016.482.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ф.М. Кипкеева/F.M. Kipkeeva <https://orcid.org/0000-0003-4778-9726>

Т.А. Музаффарова/T.A. Muzaffarova <https://orcid.org/0000-0002-2345-2056>

М.П. Никулин/M.P. Nikulin <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

П.В. Апанович/P.V. Apanovich <https://orcid.org/0000-0001-6576-5512>

Т.А. Богущ/T.A. Bogush <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

С.Н. Неред/S.N. Nered <https://orcid.org/0000-0002-5403-2396>

М.Н. Нариманов/M.N. Narimanov <https://orcid.org/0000-0003-1806-8401>

И.С. Стилиди/I.S. Stilidi <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>

А.В. Карпухин/A.V. Karpukhin <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ И КОЭКСПРЕССИИ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ α И β В ТКАНИ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКИХ

Т. А. Богуш¹, О. М. Рябинина¹, М. И. Папулина², Е. А. Богуш¹,
А. Н. Гришанина¹, А. В. Карпухин³, Б. Е. Полоцкий¹, М. М. Давыдов¹

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

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова»;
Россия, 119991 Москва, Ломоносовский пр-т, 27, корп. 1;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Татьяна Анатольевна Богуш labmedchem@mail.ru

Цель исследования — количественная оценка уровня экспрессии и коэкспрессии эстрогеновых рецепторов разных типов (ЭРа и ЭРβ) в ткани опухолей большой когорты больных немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ).

Материалы и методы. Исследованы хирургические образцы НМРЛ (167) иммунофлуоресцентным методом, сопряженным с проточной цитометрией. Оценен уровень экспрессии маркеров, который рассчитывали как количество специфически флуоресцирующих клеток в процентах по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами).

Результаты. Экспрессия ЭРа и ЭРβ выявлена в 100 % исследованных образцов НМРЛ, при этом отмечена значительная вариабельность показателей и в большинстве случаев — превышение уровня экспрессии ЭРβ в сравнении с ЭРа — в 1,5–2,0 раза и более. В целом по группе медиана показателя для ЭРа составила 19 %, а для ЭРβ — 43 %. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена оказался равным 0,364 ($p < 0,001$), а коэффициент корреляции Пирсона — 0,401 ($p < 0,001$), что указывает на наличие статистически значимой прямой слабой взаимосвязи между показателями уровня экспрессии ЭРβ и ЭРа.

Заключение. ЭРβ могут являться основной мишенью антиэстрогенов и ориентиром для отбора пациентов с НМРЛ для проведения гормональной терапии.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого, эстрогеновые рецепторы α и β , проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-111-114

LEVEL OF ESTROGEN RECEPTOR α AND β EXPRESSION AND COEXPRESSION IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER TISSUE

T.A. Bogush¹, O.M. Ryabinina¹, M.I. Papulina², E.A. Bogush¹, A.N. Grishanina¹,
A.V. Karpukhin³, B.E. Polotsky¹, M.M. Davydov¹

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

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 bldg., 27 Lomonosovsky pr-t, Moscow 119991, Russia;

³Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechie St., Moscow 115478, Russia

Objectives. Quantitative assessment of the expression and co-expression levels of estrogen receptors of different types (ER α and ER β) in malignant tissues of large cohort of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

Materials and methods. Measurement of ER α and ER β expression levels was carried out on 167 malignant tissue samples by immunofluorescence flow cytometric method. Level of the ER α and ER β expression was calculated as a ratio of specifically fluorescent cells (%) compared to the control (incubated with the secondary antibody only).

Results. The expression of ER α and ER β was detected in all the NSCLC samples investigated. High variability in the level of the marker expression was revealed and it was shown 1,5–2,0-fold higher ER β expression in the most tumors than that for ER α . The Spearman rank correlation coefficient of 0,364 ($p < 0,001$) and the Pearson correlation coefficient of 0,401 ($p < 0,001$) indicate statistically significant weak positive correlation between the levels of expression of ER β and ER α .

Conclusion. The level of expression of ER β as a main subtype of ER in NSCLC tissue could prove useful for selecting patients for antiestrogen therapy.

Key words: non-small cell lung cancer, estrogen receptors α and β , flow cytofluorimetry

Введение

Эстрогеновые рецепторы (ЭР) являются важнейшей клеточной мишенью, воздействуя на которую можно не только контролировать процессы канцерогенеза, но и подавлять рост опухолевых клеток. Блестящим подтверждением этого служит результат многолетнего (с начала 1970 годов) применения тамоксифена у больных раком молочной железы с положительным статусом ЭР опухоли. Препарат эффективен в адьювантном (послеоперационном) режиме и позволяет значительно улучшить отдаленные результаты хирургического лечения, снижая риск рецидива заболевания и смертность больных.

В последние годы ЭР, а значит и мишени антиэстрогенов, обнаружены в клетках различных злокачественных новообразований (немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака предстательной железы, рака пищевода, колоректального рака, рака яичников, рака эндометрия и др.) [1–5]. Это дает основания полагать, что антиэстрогеновая гормонотерапия в случае положительного статуса ЭР различных опухолей будет давать результаты, сходные с результатами лечения рака молочной железы. Однако вопрос об антиэстрогеновой терапии других опухолей до сих пор лишь обсуждается в научных публикациях [6].

В клетках человека присутствуют 2 изоформы ЭР: альфа (ЭР α) и бета (ЭР β). Их соотношение, а также клеточное и тканевое распределение подвержено широкой вариабельности, но в любом случае экспрессия как ЭР α , так и ЭР β ассоциирована с ответом на антиэстрогеновую терапию. Стимуляция пролиферации клеток НМРЛ под воздействием эстрогенов, так же как и ингибирование пролиферации при воздействии антиэстрогенов, реализуется только в клетках с экспрессией разных типов ЭР. В целом ситуация аналогична раку молочной железы, однако количественные показатели экспрессии и коэкспрессии в ткани НМРЛ ЭР разных типов по-прежнему остаются неизученными. Принимая во внимание, что именно эта молекулярная характеристика опухоли является важнейшим аргументом в обоснованности развития гормональной терапии любого злокачественного новообразования, **целью** настоящего исследования явилась оценка уровня экспрессии ЭР α и ЭР β в ткани опухолей большой когорты больных НМРЛ. Для получения строго количественных показателей экспрессии маркеров работа проведена иммунофлуоресцентным методом, сопряженным с точной цитометрией.

Материалы и методы

Проведен анализ показателей экспрессии ЭР α и ЭР β в хирургических биопсийных образцах опухолей 167 больных НМРЛ (139 мужчин и 28 женщины). Использована ранее разработанная и запатентован-

ная методика строго количественной характеристики молекулярных белковых маркеров солидных опухолей [3]. Для иммунофлуоресцентного анализа экспрессии ЭР α использовали первичные кроличьи антитела (клон SP1, Abcam), для ЭР β – мышьиные (клон 14C8, Abcam), а также вторичные козы антитела, конъюгированные с красителем DyLight650 (ab98510 и ab98729 соответственно). Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 488 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight650 проводили в канале FL-6. Использовали средний показатель скорости при подсчете анализируемых клеток; число анализируемых событий – 5000. Количество окрашенных клеток рассчитывали в программе FlowJo 10.0 с помощью метода Колмогорова–Смирнова.

Уровень экспрессии ЭР α и ЭР β рассчитывали как количество специфически флуоресцирующих клеток в % по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами).

Результаты и обсуждение

При анализе данных о больных НМРЛ, образцы опухолей которых были включены в исследование, выявлены следующие закономерности. Среди прооперированных пациентов женщины составили 17 %, мужчины – 83 %. Возраст мужчин колебался от 35 до 82 лет (средний возраст 61 год), возраст женщин – от 37 до 73 (средний возраст 58 лет).

В общей группе больных обоих полов плоскоклеточный рак диагностирован в 55 % случаев, аденокарцинома – в 42 %. Процент курящих пациентов преобладал над числом пациентов, которые не имели такой привычки, и составил не менее 62 %. Данных о статусе курения 15 % больных не найдено.

Несмотря на сопоставимое число пациентов в группах с разным гистологическим типом опухоли, разница в группах разных полов очевидна: у женщин частота аденокарциномы составила 93 %, частота плоскоклеточного рака – 7 %. У пациентов мужского пола почти в 2 раза чаще, чем аденокарцинома, выявлялся плоскоклеточный рак, частота встречаемости составила 64 % против 31,5 %. Стоит отметить, что не менее 73 % пациентов мужского пола являлись курильщиками, причем многие пациенты имели стаж курения более 20 лет; 90 % женщин не имели такой привычки.

Показатели уровня экспрессии ЭР α и ЭР β в общей группе пациентов представлены в таблице.

Иммунофлуоресцентный анализ опухолей выявил экспрессию ЭР α и ЭР β во всех исследованных образцах. Однако, учитывая тот факт, что несмотря

Показатели уровня экспрессии ЭР α и ЭР β в ткани НМРЛ

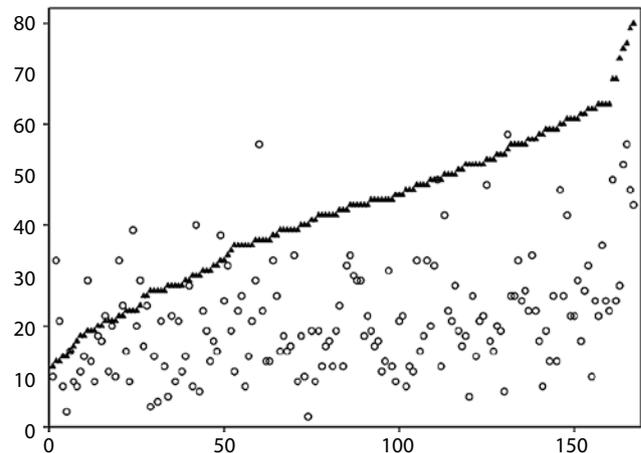
Подтип ЭР	Показатели уровня экспрессии маркеров, %		p^{***}
	Среднее значение (M \pm SD)*	Медиана [Q1; Q3]**	
ЭР α	21,4 \pm 11,2	19,0 [13,0; 27,0]	< 0,001
ЭР β	42,1 \pm 15,3	43,0 [30,0; 53,0]	

*M \pm SD – среднее арифметическое значение \pm стандартное отклонение. ** Me [Q1; Q3] – медиана [нижний квартиль, верхний квартиль]. *** p – достоверность различий между показателями уровня экспрессии ЭР α и ЭР β , рассчитанная методом t-критерия Стьюдента

на прецизионность, метод проточной цитофлуориметрии имеет определенную погрешность, образцы опухолевой ткани, в которых уровень экспрессии маркеров был ≤ 10 % окрашенных клеток, мы рассматривали как неэкспрессирующие маркеры. При этом ЭР β -позитивными оказались все исследованные опухоли, а ЭР α -позитивными – большинство (88,4 %). Уровень экспрессии ЭР α в опухолях разных больных варьировал от 11 до 58 % специфически окрашенных клеток, медиана показателя оказалась равной 19 %. Уровень экспрессии ЭР β в образцах колебался от 12 до 80 %, медиана составила 43 %. Средние значения показателей мало отличались от медианы (ЭР α : 21,4 % против 19,0 %, ЭР β : 42,1 % против 43 %). Таким образом, в среднем по группе уровень экспрессии ЭР β в образцах ткани НМРЛ приблизительно в 2 раза превышает уровень экспрессии ЭР α ($p < 0,001$).

На рисунке представлено распределение показателей коэкспрессии ЭР α и ЭР β в исследованной группе пациентов с НМРЛ. Образцы опухолей были ранжированы по возрастанию уровня экспрессии ЭР β – от минимального до максимального значения (на графике обозначены черными треугольниками). Круглые точки показывают значение уровня экспрессии ЭР α в том же образце опухоли. Видно, что в ткани большинства образцов уровень экспрессии ЭР β превышает уровень экспрессии ЭР α . Только в 8 % образцов (в 14 из 167 случаев) экспрессия ЭР α оказалась равной или незначительно превысила экспрессию ЭР β . Распределение точек на данном рисунке согласуется с отношением рассчитанных показателей медианы и среднего значения: в большинстве случаев показатель экспрессии ЭР β в 1,5 раза превысил показатель экспрессии ЭР α , а в 58 % случаев – в 2 раза и более. Видно также, что персонализированные различия были очень значительными и уровень экспрессии ЭР β более чем в 4 раза превышал показатель ЭР α .

На графике также очевидно отсутствие четкой корреляции между экспрессией ЭР β и ЭР α в ткани НМРЛ. Данный факт подтвержден результатом корреляционного анализа. Так как число наблюдений



Распределение показателей экспрессии ЭР α и ЭР β в исследованной группе больных НМРЛ. По оси абсцисс – номера образцов опухолей, которые ранжированы от минимального до максимального значения по уровню экспрессии ЭР β (%). По оси ординат – уровень экспрессии ЭР α и ЭР β (%). Черными треугольниками отмечены показатели уровня экспрессии ЭР β , круглыми точками – ЭР α в ткани опухоли того же больного

оказалось больше 100, в качестве показателей согласованности между значениями экспрессии ЭР β и ЭР α можно использовать как коэффициент корреляции Пирсона, так и коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена оказался равным 0,364 ($p < 0,001$), а коэффициент корреляции Пирсона – 0,401 ($p < 0,001$). Эти значения указывают на наличие статистически значимой прямой слабой взаимосвязи между показателями экспрессии ЭР β и ЭР α .

Заключение

Обсуждая полученные результаты, прежде всего необходимо отметить, что это первое исследование НМРЛ, проведенное на большом клиническом материале (проанализировано 167 хирургических образцов НМРЛ), в котором на основании строго количественного показателя охарактеризован уровень экспрессии и коэкспрессии ЭР разных типов – ЭР α и ЭР β . Показано, что ЭР β экспрессируются во всех исследованных образцах НМРЛ, а ЭР α -позитивными является большинство опухолей – 88,4 %. Тот факт, что в ткани НМРЛ в 100 % случаев выявляется экспрессия 1 или 2 мишеней антиэстрогенов, указывает на молекулярную обоснованность сформулированной выше гипотезы о возможной эффективности гормональной терапии у больных НМРЛ.

В связи с этим важно отметить, что уровень экспрессии в ткани НМРЛ ЭР β значительно выше, чем ЭР α . В целом по группе превышение медианы уровня экспрессии ЭР β против ЭР α составило 2,3 раза (43 % против 19 %), а различия между реальными показателями у конкретных больных были еще более значительными. Это свидетельствует о том, что ЭР β

могут являться основной мишенью антиэстрогенов и ориентиром для отбора пациентов с НМРЛ для проведения гормональной терапии.

Принимая во внимание полученные результаты, признавая ЭР патогенетически важным маркером

НМРЛ и допуская, что уровень экспрессии ЭРβ в опухоли $\geq 30\%$ может быть значимым для реализации эффекта антиэстрогенов, считаем, что претендентами на проведение гормональной терапии являются около 90 % больных НМРЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Богущ Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А. и др. Эстрогеновые рецепторы, антиэстрогены и немелкоклеточный рак легкого. Биохимия 2010;75(12): 1633–41. [Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A. et al. Estrogen receptors, antiestrogens and non-small cell lung cancer. *Biohimiya = Biochemistry* 2010;75(12):1633–41. (In Russ.)].
2. Богущ Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов α и β в солидных опухолях человека. Вестник Московского ун-та. Серия 2, Химия 2011;52(4):305–12. [Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A. et al. Quantitative immunofluorescence assessment using flow-cytometry the expression of estrogen receptor α and β in a solid human tumor. *Vestnik Moskovskogo universitetata. Seriya = Bulletin of Moscow University. Series 2, Chemistry* 2011;52(4):305–12. (In Russ.)].
3. Christoforou P., Christopoulos P.F., Koutsilieris M. The role of estrogen receptor β in prostate cancer. *Mol Med* 2014;20:427–34. PMID: 25032955. DOI: 10.2119/molmed.2014.00105.
4. Dong J., Jiang S.W., Niu Y. et al. Expression of estrogen receptor α and β in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2013;30(6):2771–6. PMID: 24101172. DOI: 10.3892/or.2013.2770.
5. Jia M., Dahlman-Wright K., Gustafsson J.-Å. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2015;29(4):557–68. PMID: 26303083. DOI: 10.1016/j.beem.2015.04.008.
6. Богущ Т.А., Дудко Е.А., Беме А.А. и др. Экспрессия эстрогеновых рецепторов в опухолях, отличных от рака молочной железы. Антибиотики и химиотерапия 2009;54(7–8): 41–9. [Bogush T.A., Dudko E.A., Beme A.A. et al. The expression of estrogen receptors in tumors other than breast cancer. *Antibiotiki i himioterapiya = Antibiotics and chemotherapy* 2009;54(7–8):41–9. (In Russ.)].

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

