



ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

2

TOM 18
2019

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

2 ^{ТОМ 18}
'19

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей

Тел.: +7 (499) 324-10-65,
+7 (499) 612-81-92;
факс +7 (499) 324-22-74

E-mail: biotherapy_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 Т.Н. Николаенко
Корректор М.С. Пахомова
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 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Российский биотерапевтический
журнал. 2019. Том 18. № 2. 1–80
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2019
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). 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, DSc (Moscow, Russia); **I.R. Nabiev**, PhD, DSc, Professor (Reims, France); **V.V. Novikov**, PhD, DSc, Professor (Nizhny Novgorod, Russia); **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); **N.S. Sergeeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.V. Stepanova**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **N.N. Tupitsin**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **I.Zh. Shubina**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **I.V. Ulasov**, PhD (Seattle, USA); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002 BY PROFESSOR A.YU. BARYSHNIKOV

2 VOL. 18
'19

FSBI “N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, 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 T.N. Nikolaenko
Proofreaders M.S. Pakhomova
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 № ФС 77-53039 dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2019. Volume 18. No 2. 1–80
© PH “ABV-Press”, 2019
Rospechat catalogue index: 81679
Printed at the Mediacolor LLC

1,000 copies
<https://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>
<http://bioterapevt.elpub.ru/jour/index>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- С.В. Чулкова, И.Г. Маркина, О.А. Чернышева, Н.В. Грищенко, А.С. Антипова,
К.С. Титов, Д.А. Рябчиков, А.В. Егорова, Д.Р. Насхлеташвили, Н.Н. Тупицын
Роль стволовых опухолевых клеток в развитии лекарственной резистентности меланомы 6
- Е.В. Блынская, К.В. Алексеев, Д.В. Юдина, В.К. Алексеев,
С.В. Тишков, В.В. Буева, С.В. Минаев, В.В. Аджиенко, А.А. Иванов
Перспективы применения смарт-полимеров в разработке систем
доставки активных фармацевтических субстанций (обзор) 15

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Е.А. Шестакова, Т.А. Бозуш
BRCA1 участвует в локализации РНК *XIST* на неактивной х-хромосоме 21
- А.Н. Грачев, Д.В. Самойлова, С.Н. Курочкин, О.В. Ковалева
Разработка нового моноклонального антитела к хитиназоподобному белку YKL-39
для иммуногистохимии 27
- М.П. Киселева, В.С. Покровский, Л.М. Борисова, И.С. Голубева, Л.В. Эктова
Влияние химической структуры производных N-гликозидов
индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов на противоопухолевую активность 32
- Н.П. Акентьева, С.С. Шушанов
Изучение противоопухолевой активности синтетического
пептида *RYQLHPYR* на клетках рака предстательной железы 40
- Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский,
Н.А. Андронова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков
Терафтал снижает чувствительность опухолевых клеток к доксорубину *in vitro*,
но не влияет на его противоопухолевый эффект *in vivo* 51
- Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, О.А. Бочарова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, Ю.Н. Соловьев
Влияние мультифитоадаптогена на лейкоцитарную инфильтрацию
гепатокарцином мышей 60
- И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская,
Н.П. Ермакова, В.А. Чалей, А.Ю. Семушкина
Сравнительное патоморфологическое исследование отечественного
гидроксикарбамида и препарата сравнения гидреа 66
- Л.М. Федосеева, Ю.И. Чистова
Идентификация фенольных соединений сухого экстракта, полученного
из сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа 73

ЮБИЛЕЙ

- Олегу Николаевичу Чупахину – 85 лет 78

REVIEWS

- S.V. Chulkova, I.G. Markina, O.A. Chernysheva, N.V. Grishchenko, A.S. Antipova, K.C. Titov, D.A. Ryabchikov, A.V. Egorova, D.R. Naskhletashvili, N.N. Tupitsyn*
The role of tumor stem cells in the development of drug resistance of melanoma 6
- E.V. Blynskaya, K.V. Alekseyev, D.V. Yudina, V.K. Alexseev, S.V. Tishkov, V.V. Bueva, S.V. Minaev, V.V. Adzhienko, A.A. Ivanov*
Smart polymers in drug delivery: a perspective in pharmaceutical technology 15

ORIGINAL REPORTS

- E.A. Shestakova, T.A. Bogush*
BRCA1 participates in XIST RNA localization on inactive x chromosome 21
- A.N. Gratchev, D.V. Samoilova, S.N. Kurochkin, O.V. Kovaleva*
Development of a novel monoclonal antibody against chitinase-like protein YKL-39 applicable for immunohistochemistry 27
- M.P. Kiseleva, V.S. Pokrovsky, L.M. Borisova, I.S. Golubeva, L.V. Ektova*
N-glycosidesindolo[2,3,-a]pyrrolo[3,4,-c]carbazole derivatives chemical structure influence on antitumor activity 32
- N.P. Akentieva, S.S. Shushanov*
Study of antitumor activity of synthetic peptide ryqlhpyr on the prostate cancer cells 40
- T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokof'yeva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov*
Teraphtal decreased the sensitivity tumor cells to doxorubicine *in vitro* but does not affect its antitumor effect *in vivo*. 51
- R.V. Karpova, E.V. Bocharov, O.A. Bocharova, I.V. Kazeev, V.G. Kucheryanu, Yu.N. Soloviev*
The influence of multiphytoadaptogen on leukocyte infiltration in mice hepatocarcinomas 60
- I.B. Merkulova, T.V. Abramova, O.I. Konyaeva, N. Yu. Kulbachevskaya, N.P. Ermakova, V.A. Chaley, A.Yu. Semushkina*
Comparative pathomorphological research of hydroxycarbamide and hydrea 66
- L.M. Fedoseeva, Yu.I. Chistova*
Identification of phenolic compounds of dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea 73

JUBILEE

- Oleg Nikolaevich Chupakhin is 85 years old** 78

РОЛЬ СТВОЛОВЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В РАЗВИТИИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕЛАНОМЫ

С.В. Чулкова^{1,2}, И.Г. Маркина¹, О.А. Чернышева¹, Н.В. Грищенко¹, А.С. Антипова¹, К.С. Титов³,
Д.А. Рябчиков¹, А.В. Егорова², Д.Р. Насхлеташвили¹, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

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

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Несмотря на то, что меланома кожи относится к опухолям наружных локализаций, она является лидером по онкологической смертности во многих странах мира. Раннее метастазирование меланомы даже при начальных стадиях опухолевого процесса свидетельствует о высоком злокачественном потенциале опухоли. Более того, метастатическая меланома нередко устойчива к режимам лекарственной терапии, что является существенной проблемой на сегодняшний день. Агрессивность течения меланомы, ее устойчивость к противоопухолевым препаратам связывают с наличием популяции опухолевых стволовых клеток, для которых характерны нарушения регуляции сигнальных путей и aberrantные фенотипы. Формированию опухолевых стволовых клеток способствует их микроокружение. Поверхностные маркеры, экспрессируемые опухолевыми стволовыми клетками, включают в себя белки-транспортёры – медиаторы лекарственной резистентности. Изучение микроокружения, активности экспрессируемых антигенных детерминант позволяет понять процессы формирования резистентности и разработать стратегии ее преодоления. В статье приводится анализ современных данных литературы о значимости опухолевых стволовых клеток в развитии лекарственной резистентности меланомы.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки, меланома, лекарственная резистентность, CD271, ABCB5

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-6-14

THE ROLE OF TUMOR STEM CELLS IN THE DEVELOPMENT OF DRUG RESISTANCE OF MELANOMA

S.V. Chulkova^{1,2}, I.G. Markina¹, O.A. Chernysheva¹, N.V. Grishchenko¹, A.S. Antipova¹, K.C. Titov³,
D.A. Ryabchikov¹, A.V. Egorova², D.R. Naskhletashvili¹, N.N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of Russia;
1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia;

³A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia

Despite the fact that melanoma is a tumor of visual localization, mortality from skin melanoma remains one of the leading causes of mortality worldwide. Early metastasis of melanoma, even during the initial stages of the tumor process, indicates a high malignant potential of the tumor. Moreover, metastatic melanoma is resistant to current chemotherapy regimens, which is a significant problem today. Progression, resistance to drug therapy of skin melanoma is associated with a population of tumor stem cells, which are characterized by dysregulation of signaling pathways and aberrant phenotypes. The formation of tumor stem cells contributes to their microenvironment. Surface markers expressed by tumor stem cells include transporter proteins that mediate chemoresistance. The study of the microenvironment, the activity of the expressed antigenic determinants makes it possible to understand the processes of chemoresistance formation and to discover (develop) strategies for its overcoming. The article provides an analysis of the literature data on the significance of tumor stem cells in the development of drug resistance of melanoma.

Key words: tumor stem cells, melanoma, drug resistance, CD271, ABCB5

Введение

Меланома кожи – агрессивная злокачественная неэпителиальная опухоль с высоким потенциалом метастазирования. Несмотря на то, что выживаемость пациентов с диагнозом «меланома» значитель-

но улучшилась за последние десятилетия, современные эпидемиологические исследования четко демонстрируют рост заболеваемости [1]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения, частота возникновения меланомы в течение ближайших 10 лет

вырастет на 25 %, что позволяет рассматривать этот факт как общемировую тенденцию [2].

Своевременная диагностика меланомы кожи на ранних стадиях и радикальное хирургическое удаление первичной опухоли могут служить залогом успешного лечения меланомы. Тем не менее даже при современном уровне развития медицины каждый 3-й случай меланомы заканчивается летальным исходом. Это обусловлено выраженной инвазивной способностью опухолевых клеток и, как следствие, высокой частотой прогрессирования, что является одной из основных проблем, с которой сталкивается онколог при лечении больных меланомой. Так, для пациентов с «тонкой» меланомой (толщина по Бреслоу <1 мм), на долю которых приходится около 70 % новых случаев, риск диссеминации составляет 25 % [3]. Несмотря на совершенствование адъювантной терапии меланомы, приблизительно у 75 % больных, относящихся к группе высокого (стадии ПС, ПШВ и ППС) риска прогрессирования, метастазы развиваются в первые 2 года [4].

Лечение метастатической меланомы является особенно сложной задачей, поскольку пациенты имеют высокую склонность к рецидивам и часто становятся резистентными к используемому терапевтическому агенту [5]. Несмотря на разработку и широкое внедрение в практическое здравоохранение таргетной и иммуноонкологической терапии, показавшей несомненное клиническое преимущество по сравнению со стандартными химиотерапевтическими режимами, 5-летняя выживаемость пациентов с метастазами составляет не более 16 % [6], а 10-летний рубеж переживают не более 10 % больных пациентов [7]. Устойчивость меланомы к лекарственной и лучевой терапии – основным методам лечения опухолей остается серьезной проблемой для клиницистов [8, 9].

Все больше появляется доказательств того, что минорная популяция опухолевых стволовых клеток (ОСК) является причиной развития резистентности меланомы к системной лекарственной терапии. ОСК характеризуются экспрессией определенных поверхностных маркеров резистентности, а также антиапоптотических молекул, вместе с тем для них свойственна относительная устойчивость к окислительным процессам и повреждениям ДНК.

В связи с этим изучение фенотипа ОСК, сигнальных путей, микросреды – неотъемлемая ступень к пониманию процессов формирования лекарственной резистентности меланомы кожи. Таким образом, глобальной целью перед мировым научным сообществом на сегодняшний день является разработка лечебных стратегий по элиминации популяции резистентных ОСК для достижения полного контроля над заболеванием, которое остается одной из ведущих причин смертности во всем мире [10, 11].

Опухолевые стволовые клетки

Хотя на протяжении десятилетий было известно, что опухоли не являются однородными, недавнее исследование секвенирования следующего поколения показало, что злокачественные образования имеют гораздо более высокую степень генетической внутриопухолевой гетерогенности, чем считалось ранее, и фенотипическое разнообразие этих субпопуляций может способствовать опухоли быстро адаптироваться и переживать химиотерапевтическое лечение [12].

Экспериментальные данные в онкологии последних нескольких лет подтверждают и углубляют хорошо известное положение о том, что злокачественные опухоли представляют собой гетерогенную популяцию клеток с различными биологическими свойствами [13–16]. Гетерогенность опухоли обусловлена мутациями, которые возникают в новых клонах опухолевых клеток, и зависит от ее микроокружения.

Существуют 2 доминирующие концепции для объяснения опухолевой гетерогенности: 1) теория ОСК, или иерархическая модель и 2) стохастическая модель (рис. 1) [17]. Стохастическая модель утверждает, что все клетки в опухоли обладают сходным онкогенным и самообновляющимся потенциалом и что гетерогенность является результатом процесса клонального отбора, при котором отдельные опухолевые клетки приобретают генетические или эпигенетические изменения. Эти изменения часто обусловлены микроокружением опухоли и являются результатом внешних факторов, таких как гипоксический стресс, иммунная атака, метаболический стресс или лекарственное/токсическое воздействие, которые придают фенотипические различия опухолевым клеткам и предоставляют им преимущество или недостаток в выживании [18].

Иерархическая модель, в отличие от стохастической, предполагает, что рост и прогрессирование многих видов рака обусловлены небольшими субпопуляциями клеток, которые называют опухолевыми стволовыми. ОСК обладают способностями к самообновлению и дифференцировке, а также к стимулированию роста и метастазирования опухолей, тогда как большинство опухолевых клеток имеет ограниченный пролиферативный потенциал [19–21]. По сравнению с доминирующим клоном опухолевых клеток и нормальными стволовыми клетками (СК) ОСК имеют нарушение регуляции сигнальных путей и aberrantные фенотипы. Несмотря на то что ОСК обладают определенными функциональными свойствами (неограниченное число делений и постоянное самовоспроизведение), они обычно идентифицируются на основании экспрессии специфических маркеров клеточной поверхности, что позволяет проводить их выделение из популяции опухолевых клеток [22].

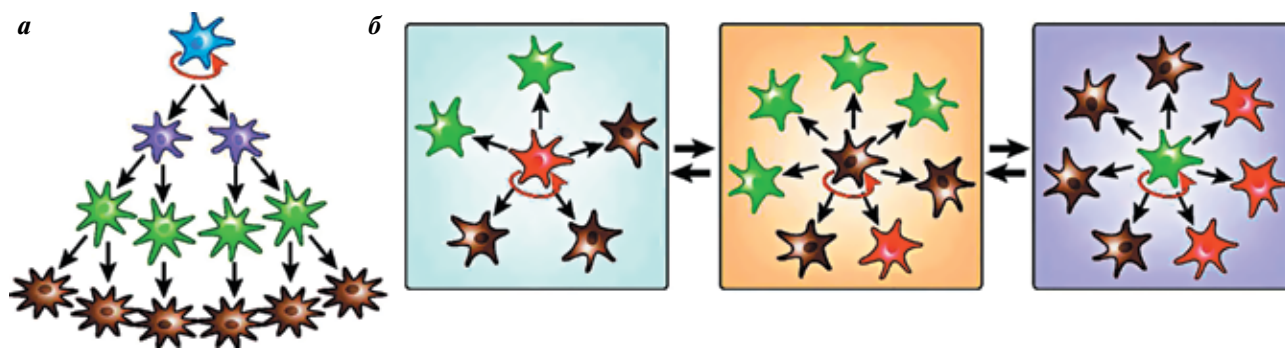


Рис. 1. Модели опухолевых стволовых клеток: а – иерархическая; б – динамическая, управляемая ТМЕ модель (адаптировано из [17])

Fig. 1. Model of tumor stem cells: a – hierarchical; б – dynamic, TME-driven model (adapted from [17])

Фенотип клеток меланомы и микроокружение

Физиологические СК меланоцитов характеризуются фенотипом Pax³⁺, Sox10[–] и Mitf [23]. Баланс между самообновлением и дифференцировкой СК меланоцитов, располагающихся в определенном месте волосяного фолликула, покоем и пролиферацией дополнительно регулируется сигнальными молекулами Notch и/или Wnt (рис. 2). Нарушение этих регуляторных сигналов приводит к ошибкам в способности СК меланоцитов поддерживать свои пулы СК или обеспечивать пигментированное потомство [24].

Считается, что гомеостаз этих ограниченных по происхождению СК меланоцитов поддерживается посредством взаимодействий с физиологической средой, в основном состоящей из E-кадгерин-экспрессирующих кератиноцитов. На СК также влияют эпителиальные СК, белки внеклеточного матрикса и ряд секретируемых факторов, которые способствуют или ограничивают их мультипотентность или самообновление. Таким образом, среда предотвращает истощение СК, одновременно защищая организм от их избыточной пролиферации. СК, в свою очередь, способны влиять на стромальное окружение, используя его для своего развития.

Фенотип меланомы описан как пластический и мультипотентный, аналогичный во многих отношениях фенотипу эмбриональных СК [25]. Поверхностные маркеры, которые экспрессируются стволовыми клетками меланомы (СКМ), включают ABCB5, CD133, 271, CD20. Кроме того, Nodal или BMP4 могут секретироваться популяциями СКМ. Различные изменения в микроокружении могут способствовать формированию СКМ и последующему СКМ-управляемому меланомогенезу.

Клетки злокачественного микроокружения (в числе которых мезенхимальные СК) продуцируют большое количество пролиферативных факторов роста, включая bFGF, HIF, IGF-1, TGF- β и VEGF. Последние стимулируют пролиферацию СКМ [26].

Факторы роста продуцируются N-кадгерин-экспрессирующими эндотелиальными клетками, фибро-

бластами. СКМ могут активно изменять окружающую среду с помощью секретируемых факторов (Nodal или BMP), поддерживая тем самым нишу, благоприятную для возникновения и роста опухоли [27]. CD166, CXCR4 или NEDD9 могут играть роль в инвазии, миграции и метастазировании клеток меланомы [28].

Для ОСК характерна aberrantная активация сигнальных путей, что приводит к нарушению баланса между самообновлением и дифференцировкой ОСК и, как следствие – неконтролируемой пролиферации клеток [29]. Молекулы Nodal и меланотрансферрин ассоциированы с онкогенным потенциалом меланомы и ростом опухоли [27]. В ходе меланомогенеза возможно слияние СКМ с более дифференцированными, включая нормальные типы, клетками [30]. Это позволяет ОСК имитировать нормальный фенотип и функции СК. Пластичность СКМ таким образом маскирует популяции от иммунного надзора. Вместе с тем относительный покой, нарушение функции апоптоза, выраженная экспрессия ABCB5 и других медиаторов способствуют устойчивости СКМ к терапии.

Лекарственная резистентность и опухолевые стволовые клетки

Исследователи сообщают, что субпопуляции СКМ могут быть причиной резистентности данной опухоли к лекарственной терапии и инициировать рост опухоли через продолжительное время после полной клинической ремиссии [14, 31, 32]. Субпопуляции СК отличаются выраженной экспрессией антиапоптотических белков и высокой активностью медиаторов химиорезистентности. Установлено, что гиперэкспрессия CD133 популяцией СКМ связана с прогрессированием заболевания на фоне стандартной системной лекарственной терапии, в то время как ингибирование CD133 приводит к торможению опухолевого роста и процессов метастазирования [33]. E. Monzani и соавт. обнаружили, что СКМ с фенотипом, характеризующимся позитивностью CD133,

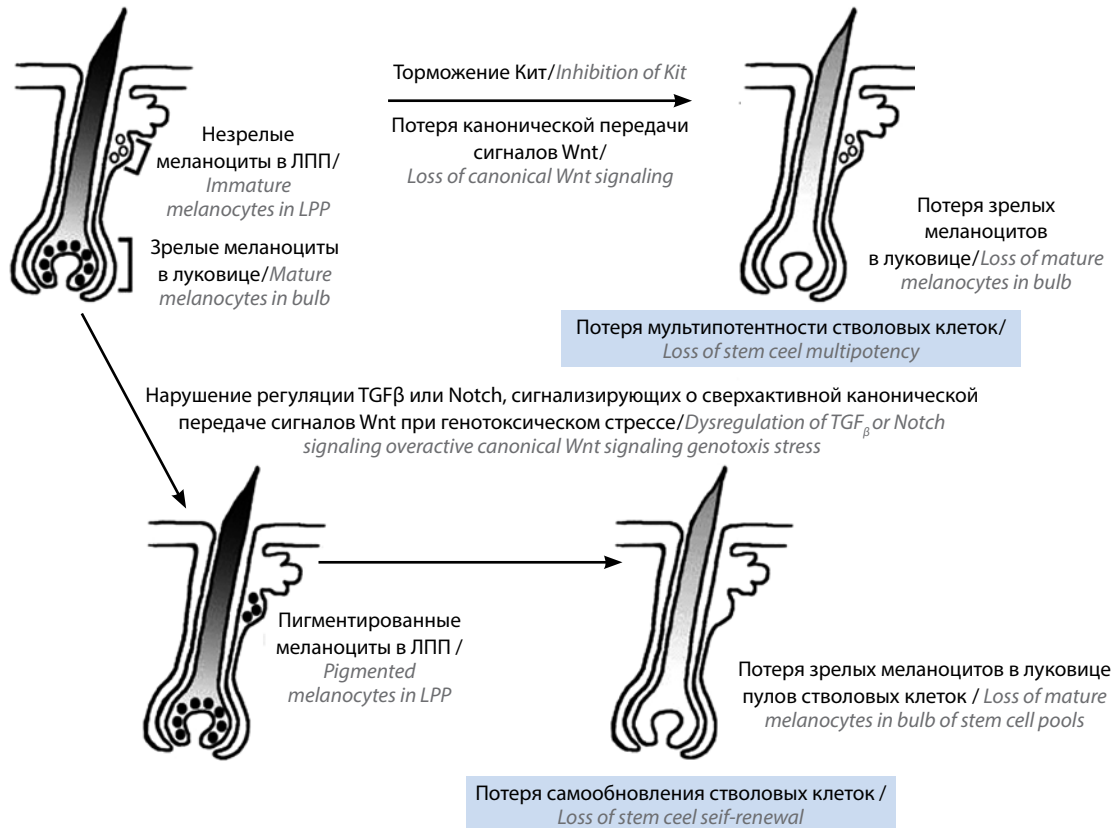


Рис. 2. Роль передачи сигналов Wnt, TGFβ, Notch в нарушении гомеостаза СК меланоцитов. Адаптировано из [23]

Fig. 2. The role of Wnt, TGFβ, Notch signaling in impaired homeostasis of SC melanocytes. Adapted from [23]

выраженно экспрессировали ABCG2. N.Y. Frank и соавт. продемонстрировали, что при меланоме хе-морезистентность к доксорубину обусловлена повышенной экспрессией СКМ транспортера ABCB5. G. Rappa и соавт. предложили рассматривать популяцию СКМ CD133+ в качестве потенциальной мишени для таргетной терапии при метастатической меланоме [34]. В аналогичной роли рассматриваются СКМ, экспрессирующие CD20, поскольку использование анти-CD20-антител у больных меланомой кожи, резистентных к нескольким видам системной лекарственной терапии, приводило к длительным ремиссиям [35, 36].

Установлено, что высокие уровни экспрессии маркера CD271 СКМ у пациентов коррелируют с высоким метастатическим потенциалом опухоли и худшим прогнозом [37, 38]. G. Restivo и соавт. в исследовании показали, что CD271 является ключевым эффектором в переключении фенотипа клеток меланомы [39]. Согласно модели «переключения фенотипов» агрессивный характер клеток меланомы обусловлен их внутренним потенциалом для динамического перехода от высокопролиферативного/низкоинвазивного к низкому пролиферативному/высокоинвазивному состоянию [28, 40, 41]. CD271 играет двоякую

роль в этом процессе, уменьшая распространение, одновременно способствуя инвазивности опухоли. Динамическая модификация экспрессии CD271 позволяет опухолевым клеткам пролиферировать при низких уровнях экспрессии CD271 [22]. Торможение опухолевого роста происходит при выраженной экспрессии данного маркера. Возобновление пролиферации ОСК на удаленном участке возможно после уменьшения экспрессии CD271. Механически расщепленный внутриклеточный домен CD271 контролирует пролиферацию, тогда как взаимодействие CD271 с рецептором нейротрофина Trk-A модулирует клеточную адгезию и инвазивность [39].

Приобретение инвазивного поведения клеток сопряжено также с процессом эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), при котором наблюдается ослабление межклеточной адгезии ввиду утраты или снижения экспрессии клетками молекул E-кадгерина. Последнее является одним из механизмов, запускающих процессы метастазирования, формирования преметастатических ниш [26]. С учетом научных данных в отношении популяции СКМ, экспрессирующих CD271, интересными представляются результаты исследования A. Lehraiki и соавт., которые выявили, что блокирование маркера CD271

приводило не только к уменьшению выживаемости клеток меланомы, но и к повышенной чувствительности к терапии BRAF-ингибиторами. Безусловно, этот факт указывает на то, что популяции СКМ, экспрессирующие CD271, устойчивы к лекарственной терапии [42]. Кроме того, к эффекту противоопухолевых препаратов резистентны популяции ОСК меланомы, имеющие выраженную экспрессию медиатора химиорезистентности ABCB5 [31].

Следует отметить, что в основе более высокой выживаемости популяции резистентных ОСК меланомы при длительном на них воздействии химиотерапевтических препаратов могут лежать разные механизмы лекарственной устойчивости. Одним из важнейших механизмов химиорезистентности является активность транспортных белков семейства ABC-1,2,5. Известно, что транспортные белки семейства ABC (белки-транспортеры) экспрессируются популяциями ОСК и выводят из клеток организма токсические соединения. Гены, кодирующие ABC-белки, содержатся во всех живых клетках. ABCB5 – белок, который коэкспрессируется в перекрывающейся, но не идентичной структуре с CD133 в клеточной линии меланомы G3361 и образцах первичной опухоли меланомы, а также субпопуляцией клеток, экспрессирующих маркер CD271 [31]. ABCB5 входит в подсемейство В, как и ABCB1, и гомологичен ему на 73 %. Он выбрасывает родамин-123 и доксорубин из клеток [31, 43], влияет на электрический потенциал клеточной мембраны и способствует слиянию клеток. ABCB5 экспрессируется также СК гепатом и лекарственно-устойчивыми клетками колоректального рака [43, 44]. ABCB2 – белок, который вовлечен в контроль клеточного цикла СК/клеток-предшественников сердечной мышцы [45]. Это позволяет предположить, что ABC-транспортеры, возможно, участвуют в регуляции «стволового фенотипа» клеток, поддерживая их популяцию [46].

В целом ряде клинических исследований по изучению роли транспортного белка ABCB5 ученые установили, что гиперэкспрессия ОСК меланомы транспортера ABCB5 строго коррелирует с опухолевой прогрессией, развитием рецидивов и лекарственной резистентности [43, 47–50]. Кроме того, выраженная экспрессия медиатора ассоциирована с клоногенетическим потенциалом клеток меланомы *in vitro* [51–53].

Без сомнения, полученные данные не остались без внимания, и учеными были предприняты попытки по разработке лекарственных препаратов, способных блокировать экспрессию транспортных белков семейства ABC. Хотя ABCB5 широко изучался при различных злокачественных опухолях человека, лишь немногие исследовали транспортер ABCB5 при мышинной меланоме. Так, китайские исследова-

тели в ходе поиска путей решения преодоления лекарственной резистентности ОСК меланомы получили весьма обнадеживающие результаты. Блокирование активности транспортера ABCB5 приводило к торможению опухолевого роста *in vivo* и восстановлению чувствительности клеток меланомы B16F10 к химиотерапевтическим препаратам *in vitro* [11]. В этом исследовании X. Zhang и соавт. использовали специально разработанное антитело VNP20009, безопасность которого доказана в I фазе клинических испытаний. Его вводили мышам совместно с циклофосфамидом. Результатом такого комбинированного лечения было снижение экспрессии транспортера ABCB5, которое восстанавливало чувствительность к химиотерапевтическим препаратам, вело к уменьшению роста опухоли и увеличению выживаемости на первичной модели мышей B16F10.

Американские ученые получили также весьма любопытные данные в ходе исследования потенциального таргетного препарата – фенилэтилового эфира кофейной кислоты (CAPE), представляющего собой биологически активную жидкость, противоопухолевая активность которой установлена при многих видах злокачественных опухолей. CAPE индуцировал как апоптоз, так и экспрессию E2F1 в CD133-негативных субпопуляциях СКМ, однако этот эффект не наблюдался в субпопуляциях CD133+. Отмечено, что устойчивость клеток СКМ, экспрессирующих CD133+, ассоциирована с выраженной экспрессией медиатора лекарственной устойчивости ABCB5. В эксперименте нокдаун генов, кодирующих белки-транспортеры ABCB5, приводил к повышению чувствительности СКМ субпопуляции CD133+ к CAPE. CAPE-индуцированный апоптоз опосредуется белком E2F1, поскольку нокдаун гена, кодирующего E2F1, приводил к подавлению апоптоза. Кроме того, в результате индукции экспрессии E2F1 повышалась экспрессия проапоптотических белков (Bax, Noxa и Puma) и снижалась экспрессия антиапоптотического белка Mcl-1. В ходе исследования учеными установлено усиление активации регулирующей сигнал апоптоза киназы (ASK1), c-Jun N-терминальной киназы и p38, а также (связывающих активность ДНК) факторов транскрипции AP-1 и p53. Таким образом, авторы показали, что E2A1 преодолевает химиорезистентность СКМ субпопуляции CD133+ посредством механизма, запускающего митохондриальную дисрегуляцию и ER-стресс-зависимые пути [54].

Важной причиной развития лекарственной устойчивости меланомы к традиционным видам терапии является дисрегуляция сигнальных путей Notch, Hedgehog, Wnt. Баланс между самообновлением и дифференцировкой, покоем и пролиферацией СК обеспечивается сигнальными молекулами Notch, Wnt. Ранее было установлено, что продукт

гена *Numb* действует как ингибитор путей Notch, Hedgehog. Конститутивная активация Notch1 путем эктопической экспрессии внутриклеточного домена (NIC) Notch1 позволяет клеточным линиям первичной меланомы пролиферировать *in vitro* независимо от факторов роста и расти более агрессивно с метастатической активностью *in vivo*. Важно отметить, что передача сигналов Notch может быть опосредована путем активации путей β -катенина или митоген-активируемой протеинкиназы/фосфатидилинозитол-3-киназы-Akt. Это представляет особый интерес, поскольку передача сигналов Notch участвует в поддержании популяции СК в нескольких типах тканей [55]. В своих исследованиях М. Moriyama и соавт. подчеркнули ключевую роль aberrантной активации сигнального пути Notch в поддержании выживания клеток-предшественников меланоцитов, меланобластов и СК меланоцитов [55, 56]. Кроме того, они установили, что гиперэкспрессия рецепторов Notch и их лигандов (Jagged-1, Jagged-2 и Delta) коррелировала с ростом и прогрессированием меланомы *in vivo*.

Итак, Notch является транспортным рецептором, осуществляющим передачу регуляторных воздействий при непосредственном контакте с клетками. При его участии осуществляется регуляция клеточной пролиферации, апоптоза, процессов метастазирования [46]. Notch-сигнальный путь задействован в процессах формирования метастатических ниш, дифференцировки клеток, в том числе в процессах ЭМП, при котором клетки приобретают инвазивное поведение. ЭМП характеризуется ослаблением межклеточной адгезии, которая происходит в результате гипоекспрессии E-кадгерина или полной его утраты [57]. С процессом ЭМП также тесно связана экспрессия ABC-транспортёров. В экспериментальных исследованиях установлено, что ЭМП в неинвазивных культурах клеток рака молочной железы повышает степень экспрессии ABC-транспортёров и способность клеток к миграции и инвазии [46]. Таким образом, оказывается, что развитие лекарственной устойчивости сопряжено с процессом ЭМП, приобретением ОСК инвазивных свойств, а также накоплением в популяции СК.

Многие исследования с целью преодоления лекарственной резистентности преследуют задачу снижения экспрессии указанных транспортёров. Так, Honokiol (HNK), бифенольное природное соединение, снижает экспрессию различных маркеров СК, таких как CD271, CD166, JARID1B, в том числе ABCB5, при меланоме. Кроме того, HNK также значительно ослабляет свойства ОСК посредством ингибирования передачи сигналов Notch-2. G. Kaushik и соавт. изучили влияние HNK на передачу сигналов Notch клетками меланомы [58]. В клетках существуют 4 разных рецептора Notch, приводящих при расщеп-

лении серией ферментативных реакций к высвобождению внутриклеточного домена Notch, который затем перемещается в ядро и вызывает экспрессию целевых генов, регулирующих баланс между пролиферацией, клеточной смертью и дифференцировкой. Вестерн-блоттинг показал, что в клетках, обработанных HNK, наблюдается значительное снижение экспрессии расщепленного Notch-2. Авторы сделали вывод, что HNK является мощным ингибитором клеток меланомы, частично посредством нацеливания на СКМ путем подавления передачи сигналов Notch-2.

Заключение

Указанные данные свидетельствуют о том, что небольшие популяции клеток меланомы способствуют формированию лекарственной устойчивости. По сравнению с другими клетками доминирующего опухолевого клона они обладают способностями к самообновлению и дифференцировке и известны как ОСК. Следует подчеркнуть, что ОСК отличаются выраженным метастатическим потенциалом и способствуют прогрессированию меланомы, что подтверждено многочисленными исследованиями.

Поверхностные маркеры, которые экспрессируются СКМ, включают транспортные белки семейства ABC – ABCB5, гиперэкспрессия которых способствует устойчивости ОСК меланомы к традиционной лекарственной терапии. Кроме того, в процессе развития химиорезистентности немаловажную роль играет дисрегуляция сигнальных путей Notch, Hedgehog, Wnt, обеспечивающих баланс между самообновлением и дифференцировкой, покоем и пролиферацией ОСК. Недавние исследования выявили, что взаимодействие между сигнальными путями Notch и Wnt/ β -катенин обеспечивает бесконтрольное самообновление ОСК. Вместе с тем изменения микроокружения могут способствовать формированию СКМ и последующему СКМ-управляемому меланомогенезу. Не следует забывать, что относительный покой, нарушение функции апоптоза, выраженная экспрессия ABCB5 и других медиаторов способствуют устойчивости СКМ к терапии. В свою очередь, ОСК, влияя на окружающую среду с помощью секретируемых факторов (Nodal или BMP), поддерживают тем самым нишу, благоприятную для возникновения и роста опухоли.

Таким образом, имеющиеся достижения в изучении ОСК меланомы показывают высокую динамичность и сложность этой популяции клеток. Чтобы разработать эффективные терапевтические средства, направленные на ОСК, мы должны лучше понять биологию этих клеток и роль, которую играют микроокружение, стрессовые факторы и соматическая эволюция. Создание точных методов анализа ОСК меланомы является приоритетным направлением

дальнейших исследований, окончательной целью которых остается разработка стратегий селективного ингибирования ОСК в результате воздействия на мембранные маркеры и сигнальные молекулы,

прерывания сигнальных путей и изменения состава и функции микроокружения, что в конечном итоге может обеспечить дальнейший необходимый прорыв в лечении меланомы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Karimkhani C., Green A.C., Nijsten T. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease study 2015. *Br J Dermatol* 2017;177(1):134–40. DOI: 10.1111/bjd.15510.
- Jain D., Singh T., Kumar N., Daga M.K. Metastatic malignant melanoma in bone marrow with occult primary site – a case report with review of literature. *Diagn Pathol* 2007;2:38. DOI: 10.1186/1746-1596-2-38.
- Hieken T.J., Grotz T.E., Comfere N.I. et al. the effect of the AJCC 7th edition change in T1 melanoma substaging on national utilization and outcomes of sentinel lymph node biopsy for thin melanoma. *Melanoma Res* 2015;25(2):157–63. DOI: 10.1097/CMR.000000000000143.
- Balch C.M., Soong S.J., Gershenwald J.E. et al. Prognostic Factors Analysis of 17,600 Melanoma Patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer Melanoma Staging System. *J Clin Oncol* 2001;19(16):3622–34. DOI: 10.1200/JCO.2001.19.16.3622.
- Holderfield M., Deuker M.M., McCormick F., McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 2014;14(7):455–67. DOI: 10.1038/nrc3760.
- American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2015. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2015.html>
- Trotter S.C., Sroa N., Winkelmann R.R. et al. A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. *J Clin Aesthet Dermatol* 2013;6(9):18–26.
- Biddle A., Mackenzie I.C. Cancer stem cells and EMT in carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 2012. DOI:10.1007/s10555-012-9345-0.
- El-Khattouti A., Selimovic D., Haikel Y. et al. Identification and analysis of CD133(+) melanoma stem-like cells conferring resistance to taxol: An insight into the mechanisms of their resistance and response. *Cancer Lett* 2014;343:123–33. DOI: 10.1016/j.canlet.2013.09.024.
- Титов К.С., Барышникова М.А., Казаков А.В. и др. Прогностическое значение стволовых клеток опухоли и экспрессии ALK у пациентов с первичной меланомой кожи. *Практическая онкология* 2019;20(1):72–9. DOI: 10.31917/2001072. [Titov K.S., Baryshnikova M.A., Kazakov A.M. Prognostic significance of stem cells tumors and ALK expression in patients with primary skin melanoma. *Prakticheskaya oncologiya = Practical oncology* 2019;20(1): 72–9. (In Russ.)].
- Zhang X., Cheng X., La Y. et al. Salmonella VNP20009-mediated RNA interference of ABCB5 moderated chemoresistance of melanoma stem cell and suppressed tumor growth more potently. *Oncotarget* 2016;7(12):14940–50. DOI: 10.18632/oncotarget.7496.
- Klein W.M., Wu B.P., Zhao S. et al. Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2007;20(1):102–7. DOI: 10.1038/modpathol.3800720.
- Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3983–8. DOI: 10.1073/pnas.0530291100.
- Fang D., Nguyen T.K., Lishear K. et al. A tumorigenic subpopulation with stem cell property in melanomas. *Cancer Res* 2005;65(20):9228–37. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1343.
- Ricci-Vitiani L., Lombardi D.G., Pilozzi E. et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445(7123):111–5. DOI: 10.1038/nature05384.
- Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D. et al. Identification of human brain tumour initiating cell. *Nature* 2004;432(7015):396–401. DOI: 10.1038/nature03128.
- Bissell M.J., Hines W.C. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 2011;17(3):320–9. DOI: 10.1038/nm.2328.
- M. Fukunaga-Kalabis, A. Roesch, M. Herlyn. From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011. DOI: 10.1038/jid.2011.159
- Чулкова С.В. Биомаркеры стволовых клеток рака желудка. *Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии* 2018;10:11–8. DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02. [Chulkova S.V. Biomarkers of gastric cancer stem cells. *Voprosy biologicheskoy meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii = Questions of biological medical and pharmaceutical chemistry* 2018;10:11–8. (In Russ.)].
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Wang Z., Ouyang G. Periostin: a bridge between cancer stem cells and their metastatic niche. *Cells Stem Cells* 2012;10(2):111–2. DOI: 10.1016/j.stem.2012.01.002.
- Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии* 2018;4:100–6. [Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and prognosis of melanoma. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of X-ray Radiology* 2018;4:100–6. (In Russ.)].
- Nishikawa S., Osawa M. Generating quiescent stem cells. *Pigment Cell Res* 2007;20:263–70. DOI:10.1111/j.1600-0749.2007.00388.x.
- Lang D., Mascarenhas J.B., Shea C.R. Melanocytes, melanocyte stem cells, and melanoma stem cells. *Clin Dermatol* 2013;31(2):166. DOI: 10.1016/j.clindermatol.2012.08.014.
- Strizzi L., Hardy K.M., Kirsammer G.T. et al. Embryonic signaling in melanoma: potential for diagnosis and therapy. *Lab Invest* 2011;91(6):819–24. DOI: 10.1038/labinvest.2011.63.
- Alessio A.L., Biagioni F., Bianchini S. et al. Inhibition of uPAR-TGF β crosstalk blocks MSC-dependent EMT in melanoma cells. *J Mol Med* 2015;93(7):783–94. DOI: 10.1007/s00109-015-1266-2.
- Topczewska J.M., Postovit L.M., Margaryan N.V. et al. Embryonic and tumorigenic pathways converge via Nodal signaling: role in melanoma aggressiveness. *Nat Med* 2006;12:925–32. DOI: 10.1038/nm1448.

28. Schlegel N.C., von Planta A., Widmer D.S. et al. PI3K signalling is required for a TGFβ-induced epithelial-mesenchymal-like transition (EMT-like) in human melanoma cells. *Exp Dermatol* 2015; 24(1):22–8. DOI: 10.1111/exd.12580.
29. Hendrix M.J., Seftor E.A., Hess A.R., Seftor R.E. Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: Lessons from melanoma. *Nature Rev Cancer* 2003; 3(6):411–21. DOI: 10.1038/nrc1092.
30. Schatton T., Frank M.H. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008;21(1):39–55. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2007.00427.
31. Frank N.Y., Margaryan A., Huang Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2005;65(10):4320–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3327.
32. Monzani E., Facchetti F., Galmozzi E. et al. Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumorigenic potential. *Eur J Cancer* 2007;43(5):935–46. DOI: 10.1016/j.ejca.2007.01.017.
33. Lai C.Y., Schwartz B.E., Shu M.Y. CD133+ melanoma subpopulations contribute to perivascular niche morphogenesis and tumorigenicity through vasculogenic mimicry. *Cancer Res* 2012;72(19):5111–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0624.
34. Rappa G., Fodstad O., Lorico A. The stem cell-associated antigen CD133 (Prominin-1) is a molecular therapeutic target for metastatic melanoma. *Stem Cells* 2008;26(12):3008–17. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0601.
35. Schlaak M., Schmidt P., Bangard C. et al. Regression of metastatic melanoma in a patient by antibody targeting of cancer stem cells. *Oncotarget* 2012;3(1):22–30. DOI: 10.18632/oncotarget.437.
36. Pinc A., Somasundaram R., Wagner C. et al. Targeting CD20 in Melanoma Patients at High Risk of Disease Recurrence. *Mol Ther* 2012;20(5):1056–62. DOI: 10.1038/mt.2012.27.
37. Boiko A.D., Razorenova O.V., van de Rijn M. et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 2010;466(7302):133–7. DOI: 10.1038/nature09161.
38. Civenni G., Walter A., Kobert N. et al. Human CD271-positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Res* 2011;71(8):3098–09. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3997.
39. Restivo G., Diener J., Cheng P.F. et al. Publisher correction: the low affinity neurotrophin receptor CD271 regulates phenotype switching in melanoma. *Nat Commun* 2018;9(1):314. DOI: 10.1038/s41467-018-02850-8.
40. Hoek K.S., Eichhoff O.M., Schlegel N.C. et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res* 2008;68(3):650–6. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2491.
41. Kemper K., de Goeje P.L., Peeper D.S., van Amerongen R. Phenotype switching: tumor cell plasticity as a resistance mechanism and target for therapy. *Cancer Res* 2014;74(21):5937–41. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1174.
42. Lehraiki A., Cerezo M., Rouaud F. et al. Increased CD271 expression by the NF-κB pathway promotes melanoma cell survival and drives acquired resistance to BRAF inhibitor vemurafenib. *Cell Discov* 2015;1:15030. DOI: 10.1038/celldisc.2015.30.
43. Schatton T., Murphy G.F., Frank N.Y. et al. Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 2008;451(7176):345–9. DOI: 10.1038/nature06489.
44. Cheung S.T., Cheung P.F., Cheung C.K. et al. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette ABCB5 regulate liver cancer chemoresistance. *Gastroenterology* 2011;140(3):344–55. DOI: 10.1053/j.gastro.2010.07.049.
45. Sereti K.I., Oikonomopoulos A., Unno K. et al. ATP-binding cassette G-subfamily transporter 2 regulates cell cycle progression and asymmetric division in mouse cardiac side population progenitor cells. *Circ Res* 2013;112(1):27–34. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300010.
46. Красильников М.А., Зборовская И.Б. Молекулярный канцерогенез. М.: АБВ-пресс, 2016. С.148. [Krasilnikov M.A., Zborovskaya I.B. Molecular carcinogenesis. M.: ABCpress, 2016. P.148. (In Russ.)].
47. Chartrain M., Rioud J., Stennevin A. et al. Melanoma chemotherapy leads to the selection of ABCB5-expressing cells. *PLOS One* 2012;7(5):36762. DOI: 10.1371/journal.pone.0036762.
48. Ma J., Frank M.H. Isolation of Circulating Melanoma Cells. *Methods Mol Biol* 2015. 26415609. DOI: 0.1007/7651_2015_300.
49. Suzuki N., Tanaka M., Shirafuji Y. et al. Assessment of melanoma-initiating cell markers and conventional parameters in sentinel lymph nodes of malignant melanoma. *Acta Med Okayama* 2015;69:17–27. DOI: 10.18926/AMO/53118.
50. Bertolotto C., Lesueur F., Giuliano S. et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature* 2016;531(7592):126. DOI: 10.1038/nature16158.
51. Keshet G.I., Goldstein I., Itzhaki O. et al. MDR1 expression identifies human melanoma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:930–6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.02.022.
52. Touil Y., Zuliani T., Wolowczuk I. et al. the PI3K/AKT signaling pathway controls the quiescence of the low-Rhodamine123-retention cell compartment enriched for melanoma stem cell activity. *Stem Cells* 2013;31(4):641–51. DOI: 10.1002/stem.1333.
53. Czyz M., Koprowska K., Sztiller-Sikorska M. Parthenolide reduces the frequency of ABCB5-positive cells and clonogenic capacity of melanoma cells from anchorage independent melanospheres. *Cancer Biol Ther* 2013;14:135–45. DOI: 10.4161/cbt.22952.
54. El-Khattouti A., Sheehan N.T., Monico J. et al. CD133+ melanoma subpopulation acquired resistance to caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis is attributed to the elevated expression of ABCB5: significance for melanoma treatment. *Cancer Lett* 2015;357(1):83–104. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.10.043.
55. Грищенко Н.В. Гемопоэтические стволовые клетки. *Интернаука* 2018;11(15):93–100. [Grishchenko N.V. Hematopoietic stem cells. *Internauka = International science* 2018;11(15):93–100. (In Russ.)].
56. Moriyama M., Osawa M., Mak S.S. et al. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol* 2006;173:333–9. DOI: 1083/jcb.200509084.
57. Титов К.С., Оганесян А.П., Ротин Д.Л. и др. Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы. Роль в патогенезе и подходы к терапии. *Злокачественные опухоли* 2016;2:22–7. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-2-22-27. [Titov K.S., Oganesyana A.P., Rotin D.L. et al. Tumor stem cells in breast cancer. The role in the pathogenesis and approaches to therapy. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant tumors* 2016;2:22–27 (In Russ.)].
58. Kaushik G., Venugopal A., Ramamoorthy P. et al. Honokiol inhibits melanoma stem cells by targeting notch signaling. *Mol Carcinog* 2015;54(12):1710–21. DOI: 10.1002/mc.22242.

Вклад авторов

С. В. Чулкова, И. Г. Маркина: написание текста статьи;
А. С. Антипова: получение данных для анализа;
О. А. Чернышева, Н. В. Грищенко, Д. А. Рябчиков, А. В. Егорова: обзор публикаций по теме статьи;
К. С. Титов: разработка плана, дизайна статьи;
Д. Р. Насхлеташвили: перевод, оформление статьи;
Н. Н. Тупицын: анализ рукописи.

Author's contributions

S. V. Chulkova, I. G. Markina: article writing;
A. S. Antipova: obtaining data for analysis;
O. A. Chernyshova, N. V. Grishchenko, D. A. Ryabchikov, A. V. Egorova: reviewing of publications of the article's theme;
K. S. Titov: developing of the plan and design of the article;
D. R. Naskhletashvili: translation and design of the article;
N. N. Tupitsyn: manuscript analysis.

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>
Д. А. Рябчиков/D. A. Ryabchikov: <https://orcid.org/0000-0003-2670-236>
К. С. Титов/K. S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 03.03.2019. Принята в печать: 23.04.2019.
Article received: 03.03.2019. Accepted for publication: 23.04.2019.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ СМАРТ-ПОЛИМЕРОВ В РАЗРАБОТКЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ (ОБЗОР)

Е. В. Блынская¹, К. В. Алексеев^{1,2}, Д. В. Юдина¹, В. К. Алексеев¹, С. В. Тишков¹, В. В. Бueva¹,
С. В. Минаев¹, В. В. Аджиенко¹, А. А. Иванов¹

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;
²ЧУОО ВО «Московский медицинский университет «РЕАВИЗ»; Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатырская, 2, стр. 2

Контакты: Дарья Валентиновна Юдина una_1093@mail.ru

Вещества полимерной природы находят широкое применение практически в любой сфере нашей жизни. Широкий спектр свойств полимеров уже давно является источником поиска решений многочисленных задач и проблем, встающих перед исследователями-разработчиками новых лекарственных средств. Результатом рационального применения их свойств являются разработки твердых и мягких лекарственных форм с модифицированным высвобождением активных фармацевтических субстанций. Статья представляет собой обзор новой группы свойств так называемых смарт-полимеров (от англ. smart – «умный») и результатов исследований, направленных на использование их в целях решения актуальных проблем фармацевтической технологии.

Ключевые слова: смарт-полимеры, фолдамеры, свойство памяти формы, эффект оригами, умные системы доставки

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-15-20

SMART POLYMERS IN DRUG DELIVERY: A PERSPECTIVE IN PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

E. V. Blynskaya¹, K. V. Alekseyev^{1,2}, D. V. Yudina¹, V. K. Alexseev¹, S. V. Tishkov¹, V. V. Bueva¹, S. V. Minaev¹,
V. V. Adzhienko¹, A. A. Ivanov¹

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

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

Polymers have already been recognized as promising materials in many areas of life including pharmaceutical technology. A wide range of polymer properties such as providing controlled release of APIs, enhancing permeation and protection of APIs from mucosal enzymes is now successfully using worldwide in producing soft and solid dosage forms. It is now recognized that a significant portion of the polymer research ongoing in the world is related with a new group of polymer properties such as «shape memory system» and «self-folding». This review focuses on «smart» – polymers properties that could be a promising tool in developing smart delivery systems.

Key words: smart-polymers, foldamers, self-folding, origami, smart drug delivery systems

Введение

Вещества полимерной структуры давно привлекают внимание исследователей фармацевтической сферы. Уникальность полимеров зависит от совокупности их качеств и свойств, к наиболее значимым из которых относят происхождение (природное/синтетическое), молекулярную массу, определяемую количеством мономерных звеньев и характером связей между ними, указывающим на их пространственную структуру. Известны работы, рассматривающие перспективность применения полимеров и сополимеров в качестве модификаторов высвобождения лекарственных средств [1], компонентов рецептур твердых лекарственных форм для перорального применения, улучшающих растворимость трудно раство-

римых активных фармацевтических субстанций (АФС) [2], и носителей, обеспечивающих таргетный транспорт АФС [3, 4].

За последние 20 лет накопилось достаточно сведений о группе так называемых смарт-полимеров, обладающих свойством самопроизвольно приобретать нужную пространственную конфигурацию (self-folding) за счет памяти формы (shape-memory). Такие полимеры открывают множество возможностей применения в разных отраслях, в том числе в сфере разработки лекарственных средств, а именно таргетных систем доставки АФС, особенно востребованных в онкотерапии [5].

Вопросу применения смарт-полимеров с каждым годом посвящается все больше международных

конгрессов и конференций. Так, например, в рамках Первой научно-технической конференции «Материалы с заданными свойствами на переходе к новому технологическому укладу: химические технологии» (7 июня 2018 г., Москва, Россия) была поднята тема актуализации тенденции применения смарт-полимеров производных органических кислот для создания лекарственных средств. Одним из крупнейших съездов, посвященных перспективам применения смарт-материалов в различных отраслях, в том числе в фармацевтической сфере, планируется 5-й ежегодный Международный конгресс (BIT's 5th Annual World Congress of Smart Materials) (2019 г., Рим, Италия).

Свойства фолдамеров: понятия “shape-memory” и “self-folding”

Свойством памяти формы (shape-memory) обладают полимеры, способные к сохранению или возвращению исходной формы при воздействии факторов извне. На молекулярном уровне эффект памяти объясняется укладкой цепей полимера, которая может происходить как за счет сшивок химическими связями (например, ковалентными), так и за счет их пространственной ориентации. Пространственно ориентированные участки обычно имеют линейную структуру с чередованием жестких (линии) и подвижных (квадраты) участков (рис. 1).

Жесткие участки определяют постоянную форму полимера, тогда как за формирование временных структур отвечают подвижные сегменты [6]. В то же время наличие большого количества ковалентных сшивок в полимере ухудшает свойство памяти формы [7].

Для разработки систем доставки АФС наиболее часто применяют полимеры с эффектом памяти, формирующимся под воздействием перепадов температур, так называемой термопластики. Термомеханический цикл термопластики представлен на рис. 2.

Свойство самопроизвольного формообразования (self-folding) подразумевает способность полимера приобретать необходимую форму без механических стимулов извне или под воздействием определенных факторов, к которым относятся свет, температура, pH среды, присутствие магнитного поля или растворителей [8, 9]. Полимеры, обладающие способностью произвольного формообразования за счет эффекта памяти формы, называются «фолдамеры» (foldamers).

Фолдамеры перспективны для получения пленок. Так, Л. Ионов и соавт. представили результаты эксперимента по получению 2-слойного пленочного покрытия на основе сополимеров полиметилметакрилата и поли-N-изопропилакриламида, которое может быть использовано для инкапсулирования

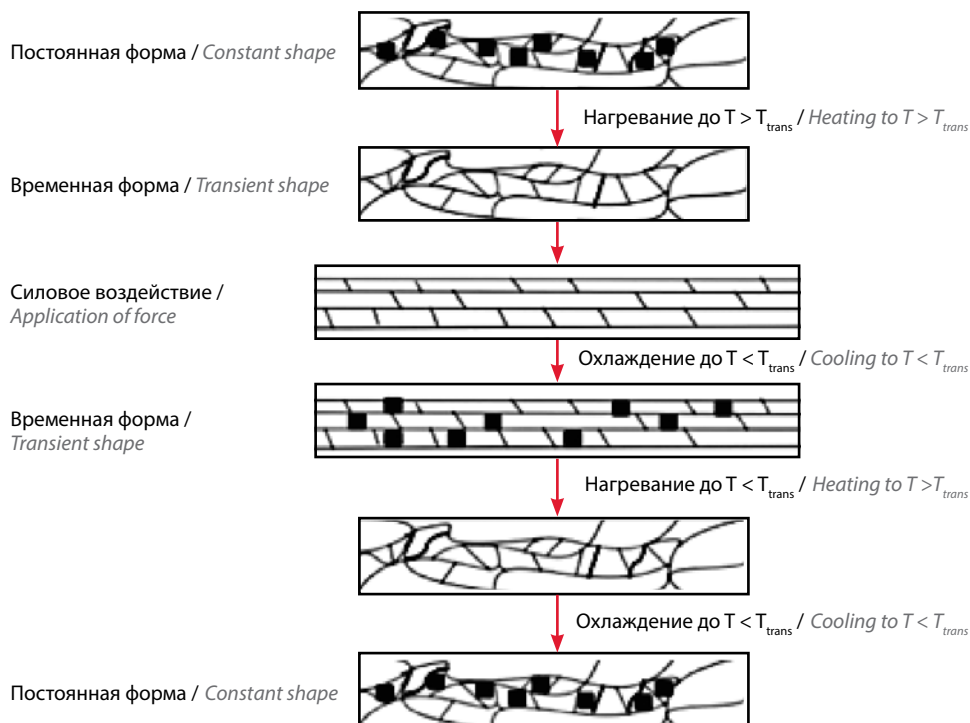


Рис. 1. Схематическое описание цикла изменений формы полимера

Fig. 1. Schematic description of changes in polymer shape

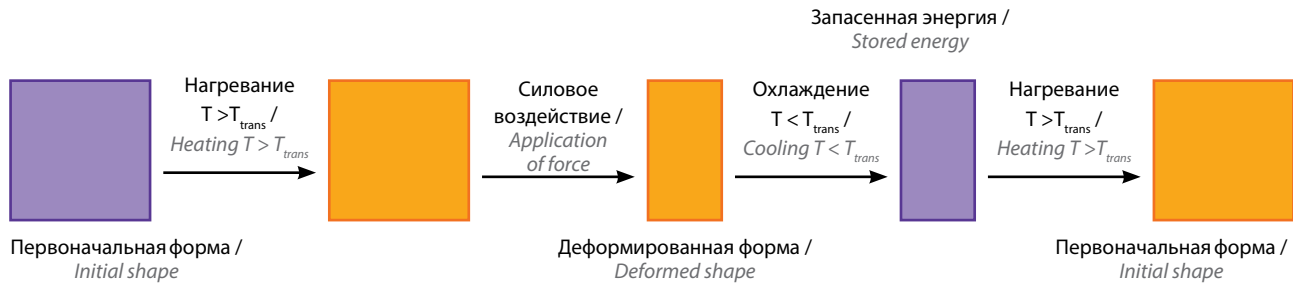


Рис. 2. Термомеханический цикл. Исходную структуру полимера нагревают выше температуры фазового перехода (T_{trans}) (температуры плавления (T_{melt}) или температуры стеклования (T_g)) до размягчения материала и подвергают механическому воздействию с целью сохранения образовавшейся формы; при последующем цикле нагревания наблюдается восстановление исходной формы полимера

Fig. 2. Thermomechanical cycle. The initial polymer structure is heated above T_{trans} of phase transition (T_{melt} for melting or T_g for vitrification) until the material is soft. Force is applied and during cooling (below T_{trans} of phase transition) the force is removed to preserve the obtained shape; in the next heating cycle, the polymer restores its shape

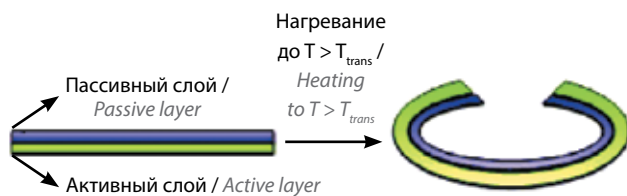


Рис. 3. Процесс самопроизвольного формообразования термочувствительной двухслойной полимерной пленки

Fig. 3. Process of spontaneous shaping of thermosensitive bilayer polymer film

маслянистых наполнителей. Активный слой представлен термореактивным полимером, способным к набуханию, а в качестве пассивного слоя подбирают любой полимер, обладающий гидрофобными свойствами для защиты активного слоя [10]. Таким образом, активация процесса формообразования происходит в присутствии влаги, запускающей процесс набухания (рис. 3).

Обнаружено, что фолдамеры, будучи использованными для получения пероральных систем доставки, усиливают мукоадгезивные свойства таких систем, способствуют защите АФС от разрушающих воздействий среды желудочно-кишечного тракта и таргетной доставке АФС. Найдены сведения о разработанной системе доставки, состоящей из 3 слоев: подложки, набухающего полимерного слоя и слоя с мукоадгезивными свойствами, непосредственно связанного с АФС. Набухающий слой получен из сшитой полиметакриловой кислоты, обладающей рН-зависимой набухающей способностью. В качестве подложки использовали полигидроксиэтилметакрилат, выполняющий барьерную функцию при прохождении через кишечник [11].

Известны работы, посвященные исследованию системы доставки с модифицированным высвобождением АФС на основе полимеров с перечисленными ранее свойствами. Так, выявлена способность олиго-ε-капролактона пролонгировать действие тео-

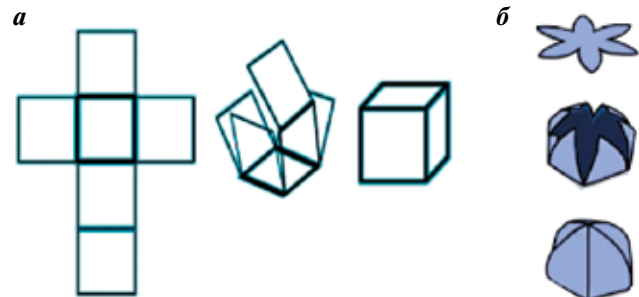


Рис. 4. Наглядная демонстрация принципа эффекта оригами смарт-полимера: а – кубическая форма; б – вариации форм

Fig. 4. Visual illustration of the origami effect for the smart polymer: а – cubic shape; б – shape variations

филлина на протяжении месяца (фосфатно-солевой буфер, 37 °С) [12]. Эффект объясняется наличием поперечных швов в структуре молекулы олиго-ε-капролактона [13].

Эффект оригами

Свойство самопроизвольного формообразования за счет памяти формы в совокупности позволяют получать 3D-формы наноразмерных диапазонов на основе смарт-полимеров («эффект оригами») (рис. 4).

Образующиеся полимерные контейнеры могут являться резервуаром для инкапсулирования в них АФС. Моделирование резервуарных частиц может включать варьирование размерами, толщиной и формами частиц, а также модификацию их поверхности (рис. 5) [14].

Для получения самособирающихся полимерных контейнеров для инкапсулирования АФС один или несколько слоев полимера наносят на микро- или наноразмерную пленкообразную подложку. Также пленка может быть получена методом погружения или центрифугирования в расплавленном полимере с целью контроля толщины образующейся пленки, поскольку от этого параметра зависят прочность

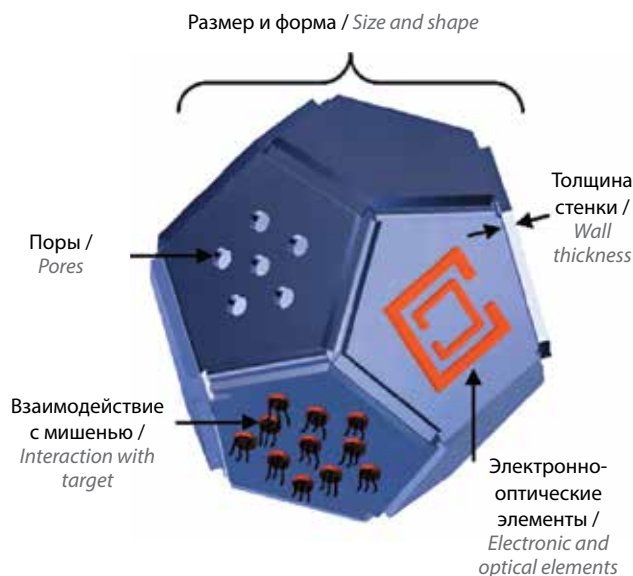


Рис. 5. Моделирование резервуарных частиц на основе смарт-полимеров
Fig. 5. Modeling of reservoir particles based on smart polymers

полимерного контейнера и диффузия АФС через пленку. Возможно добавление еще одного, защитного, слоя между подложной и полимерной пленкой, который растворяется при контакте с жидкими средами и активирует процесс сборки полимерного контейнера. Защитный слой может быть выполнен из кремния/кремния диоксида, металлов (медь, хром или алюминий), водорастворимых полимеров (поливиниловый спирт, полиакриловая кислота). В таблице представлена информация о некоторых самособирающихся полимерных системах.

Перечисленные результаты исследований послужили предпосылкой к выделению новой группы систем доставки АФС, называемой в зарубежной научной литературе SDDS (Smart Drug Delivery Systems – «умные системы доставки»), которые позиционируются как усовершенствованная разновидность таргетной доставки АФС (targeted drug delivery). Выделяют следующие критерии отнесения системы доставки к SDDS:

Самособирающиеся полимерные системы Self-assembling polymer systems

Механизм сборки Mechanism of assembly	Полимеры Polymers	Активатор Activator	Биодеградируемость Biodegradability	Обратимость Reversibility	Ссылка на исследование Link to study
Изменение параметров среды (полимерный бислой) Changes in environmental parameters (polymer bilayer)	Хитозан, ПЭГ-МА, ПЭГ-ДМА, П4ВП, ПМАК, ПКЛ, ПСИ, ПС, ПП, ПИПАМ, ПЭГ-ДА, ПГЭМА Chitosan, PEGMA, PEGDMA, P4VP, PMMC, PCL, PSI, P4VP, PPy, PNIPA, PEG-DA, PGEMA	Вода, pH, значение ионной силы, электрическое поле, t °C Water, pH, ionic strength, electrical field, t °C	Да (некоторые из перечисленных) Yes (for some of the listed chemicals)	Да Yes	[15–21]
Полимерный монослой Polymer monolayer	SU-8	Вода, ацетон Water, acetone	Нет No	Да Yes	[22]
Поверхностное натяжение (сборка за счет испарения воды/жидкого полимера) Surface tension (assembly by water/liquid polymer evaporation)	Полидиметилсилоксан, SU-8/ПКЛ Polydimethylsiloxane, SU-8/PCL	Испарение воды, t °C Water evaporation, t °C	Биодеградируемые «шарнирные» цепи Biodegradable “hinged” chains	Нет No	[23–26]

Примечание. ПЭГ МА – полиэтиленгликоля метакрилат; ПЭГ-ДМА – полиэтиленгликоля диметакрилат; ПМАК – полиметилметакриловая кислота; ПКЛ – поликапролактон; ПСИ – полисукцинимид; ПС – полистирол; П4ВП – поли(4-винилпиридин); ПП – полипиррол; ПИПАМ – полиизопропилакриламид; ПЭГ ДА – полиэтиленгликоля диакрилат; ПГЭМА – полигидроксиэтилметакрилат; SU-8 – полимер со светочувствительными свойствами.

Note. PEGMA stands for polyethylene glycol methacrylate; PEGDMA – polyethylene glycol dimethacrylate; PMMC – polymethylmethacrylate; PCL – polycaprolactone; PSI – polysuccinimide; PS – polystyrol; P4VP – poly(4-vinylpyridine); PPy – polypyrrole; PNIPA – poly(N-isopropylacrylamide); PEGDA – polyethylene glycol diacrylate; PGEMA – polyhydroxyethylmethacrylate.

- доставка к целевому органу-мишени;
- способность загрузки и транспортировки эффективных доз АФС к фармакологической мишени;
- устойчивость и сохранение активности АФС при контакте с биологическими жидкостями организма;
- нивелирование/ослабление побочных эффектов за счет связывания только с целевым сайтом мишени;
- абсорбция посредством прямого взаимодействия с клеточной мембраной.

Помимо обеспечения названных функциональных особенностей SDDS, полимер-носитель должен легко подвергаться биодegradации и полному выведению из организма.

Выводы

Таким образом, смарт-полимеры, обладающие способностью самопроизвольного фолдинга за счет

эффекта памяти формы, показывают себя перспективными носителями АФС при решении таких ключевых проблем в сфере разработки лекарственных средств, как:

- 1) стабильность АФС (актуально: пептидной или белковой природы);
- 2) биодоступность лекарственных средств (может быть связана с плохой растворимостью и всасываемостью АФС или неудовлетворительными фармакокинетическими параметрами из-за короткого периода полужизни $T_{1/2}$, иными причинами);
- 3) модификация кинетики высвобождения АФС из лекарственных форм;
- 4) таргетная доставка лекарственного препарата (позволяет снизить риск возникновения побочных эффектов).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Алексеев К.В., Бlynская Е.В., Тихонова Н.В. и др. Полимеры в технологии создания лекарственных форм с модифицированным высвобождением. Российский химический журнал 2010;6:87–93. [Alekseev K.V., Blynskaya E.V., Tihonova N.V. et al. Polymers in modified-release drug delivery technology. Rossiysky khimichesky zhurnal = Russian Journal of General Chemistry 2010;6:87–93 (In Russ.)].
2. Юдина Д.В., Бlynская Е.В., Алексеев К.В., Марахова А.И. Использование полимеров для улучшения растворимости фармацевтических субстанций в твердых лекарственных формах. Известия Академии наук. Серия химическая 2018;5:787–91. [Yudina D.V., Blynskaya E.V., Alekseev K.V., Marahova A.I. Polymers for the enhancement of solubility of pharmaceutical substances in solid drug formulations. Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya = Bulletin of the Russian Academy of Sciences. Division of Chemical Sciences 2018;5:787–91. (In Russ.)].
3. Бlynская Е.В., Алексеев К.В., Аляутдин Р.Н. Перспективы развития фармацевтической нанотехнологии. Российский химический журнал 2010;6:38–44. [Blynskaya E.V., Alekseev K.V., Alyautdin R.N. Prospects for the development of pharmaceutical nanotechnology. Rossiysky khimichesky zhurnal = Russian Journal of General Chemistry 2010;6:38–44. (In Russ.)].
4. Алексеев К.В., Аляутдин Р.Н., Бlynская Е.В. и др. Основные направления в технологии получения наночастиц лекарственных веществ. Вестник новых медицинских технологий 2009;2(16):142–5. [Alekseev K.V., Alyautdin R.N., Blynskaya E.V. et al. The basic directions in technology of reception of nanocarriers of medical substances. Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies 2009;2(16):142–5. (In Russ.)].
5. Тазина Е.В., Костин К.В., Оборотова Н.А. Особенности инкапсулирования лекарственных препаратов в липосомы (обзор). Химико-фармацевтический журнал 2011;8(45):30–40. [Tazina E.V., Kostin K.V., Oborotova N.A. Specific Features of drug encapsulation in liposomes (a review). Khimiko-farmatsefticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal 2011;8(45):30–40 (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0023-1134-2011-45-8-30-40.
6. Sokolowski W., Metcalfe A., Hayashi S. et al. Medical applications of shape memory polymers. Biomed Mater 2007;2(1):23–7. DOI: 10.1088/1748-6041/2/1/S04.
7. Razzaq M.R., Anhalt M., Frorman L. et al. Mechanical spectroscopy of magnetite filled polyurethane shape memory polymers. Mat Sci and A-STRUCT 2007;471:57–62. DOI: 10.1016/j.msea.2007.03.059.
8. Guan J., He H., Hansford D.J. et al. Self-Folding of Three-Dimensional Hydrogel Microstructures. J Phys Chem B 2005;109(49):23134–7. DOI: 10.1021/jp054341g.
9. Fernandes R., Gracias D.H. Self-folding polymeric containers for encapsulation and delivery of drugs. Adv Drug Deliv Rev 2012;6:1579–89. DOI: 10.1016/j.addr.2012.02.012.
10. Ionov L., Zakharenko S., Stoychev G. et al. Soft Microorigami: self-Folding polymer films. Soft Matter 2011;7:6786–91. DOI: 10.1039/C1SM05476G.
11. He H., Guan J., Lee J.L. An oral delivery device based on self-folding hydrogels. J Control Release 2006;110(2):339–46. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.10.017.
12. Nagahama K., Ueda Y., Ouchi T., Ohya Y. Biodegradable shape-memory polymers exhibiting sharp thermal transitions and controlled drug release. Biomacromolecules 2009;10:1789–94. DOI: 10.1021/bm9002078.
13. Serrano M.C., Carbajal L., Ameer A.G. Novel Biodegradable Shape-Memory Elastomers with Drug-Release Capabilities. Advanced Materials 2011;23:2211–5. DOI: 10.1002/adma.201004566.
14. Fernandes R., Gracias D.H. Self-folding polymeric containers for encapsulation and delivery of drugs. Adv Drug Deliv Rev 2012;64(14):1579–89. DOI: 10.1016/j.addr.2012.02.012.
15. He H.Y., Guan J.J., Lee J.L. An oral delivery device based on self-folding hydrogels. J Control Release 2006;110:339–46. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.10.017.
16. James H.P., John R., Alex A. Smart polymers for the controlled delivery of drugs – a concise overview. Acta Pharm Sin B 2014;4(2):120–7. DOI: 10.1016/j.apsb.2014.02.005.
17. Smela E., Inganas O., Lundstrom I. Controlled Folding of Micrometer-Size

- Structures. *Sci* 1995;268(5218):735–8.
DOI: 10.1126/science.268.5218.1735.
18. Luchnikov V., Sydorenko O., Stamm M. Self-Rolled Polymer and Composite Polymer/Metal Micro- and Nanotubes with Patterned Inner Walls. *Adv Mater* 2005;17:1177–82.
DOI: 10.1002/adma.200401836.
19. Lakkadwala S., Nguyen S., Nesamony J. et al. *Smart Polymers in Drug Delivery. Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery*. Springer International Publishing Switzerland 2015;169–99.
DOI: 10.1007/978-3-319-20206-8_7.
20. Shim T.S., Kim S.H., Heo C.J. et al. Controlled origami folding of hydrogel bilayers with sustained reversibility for robust microcarriers. *Angew Chem Int Ed Engl* 2012;51(6):1420–3.
DOI: 10.1002/ange.201106723.
21. Hunter A.C., Moghimib S.M. Smart polymers in drug delivery: a biological perspective *Polym Chem* 2017;8:41–51.
DOI: 10.1039/C6PY00676K.
22. Jamal M., Zarafshar A.M., Gracias D.H. Differentially photo-crosslinked polymers enable self-assembling microfluidics. *Nat Commun* 2011;2:527.
DOI: 10.1038/ncomms1531.
23. Azam A., Lafin K.E., Jamal M. et al. Self-folding micropatterned polymeric containers. *Biomed Microdevices* 2011;13:51–8.
DOI: 10.1007/s10544-010-9470-x.
24. Py C., Reverdy P., Doppler L. et al. Capillary Origami: Spontaneous Wrapping of a Droplet with an Elastic Sheet. *Phys Rev Lett* 2007;98:156103.
DOI: 10.1103/PhysRevLett.98.156103.
25. Cho J.H., Azam A., Gracias D.H. Three dimensional nanofabrication using surface forces. *Langmuir* 2010;26(21):16534–9.
DOI: 10.1021/la1013889.
26. Py C., Reverdy P., Doppler L. et al. Capillarity induced folding of elastic sheets. *Eur Phys J Special Topics* 2009;166:67–1.
DOI: 10.1140/epjst/e2009-00880-4.

Вклад авторов

Е.В. Блынская, С.В. Минаев: обоснование актуальности раскрываемой темы, разработка структуры статьи на основе подобранного материала по теме;

К.В. Алексеев: обоснование актуальности раскрываемой темы, разработка структуры статьи на основе подобранного материала по теме, подбор иллюстративного материала к тексту статьи;

Д.В. Юдина: подбор литературы по теме статьи, работа над адекватностью перевода подобранных материалов, написание текста рукописи;

С.В. Тишков, В.В. Буева: подбор литературы по теме статьи, работа над адекватностью перевода подобранных материалов;

В.В. Аджиенко, А.А. Иванов: подбор литературы по теме статьи.

Authors' contributions

E.V. Blynskaya, S.V. Minaev: justification of relevance of the discussed subject, design of the article structure based on the selected materials on the subject;

K.V. Alekseyev: justification of relevance of the discussed subject, design of the article structure based on the selected materials on the subject, selection of illustrative material;

D.V. Yudina: selection of literature on the subject, insuring the adequacy of translation of the selected materials, manuscript preparation;

S.V. Tishkov, V.V. Bueva: selection of literature on the subject, insuring the adequacy of translation of the selected materials;

V.V. Adzhienko, A.A. Ivanov: selection of literature on the subject.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.В. Юдина/D.V. Yudina: <https://orcid.org/0000-0002-1313-4855>

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.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 05.07.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 05.07.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.

BRCA1 УЧАСТВУЕТ В ЛОКАЛИЗАЦИИ РНК XIST НА НЕАКТИВНОЙ X-ХРОМОСОМЕ

Е.А. Шестакова, Т.А. Богущ

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Елена Анатольевна Шестакова elenaanshestakova@mail.ru

Введение. Инактивированная X-хромосома (Xi) ассоциирована с некодирующей РНК XIST, с целым рядом белков и содержит многочисленные эпигенетические модификации хроматина, что приводит к ингибированию экспрессии большинства генов на этой хромосоме. В последние годы были получены данные, свидетельствующие о том, что супрессор опухолей BRCA1 также взаимодействует с Xi.

Цель исследования – выявить колокализацию BRCA1 и РНК XIST и детально проанализировать пространственную организацию BRCA1 и РНК XIST на Xi с помощью конфокальной микроскопии с высоким пространственным разрешением и контрастом.

Материалы и методы. Объектом исследования служили диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии IMR90hTERT. Для локализации BRCA1 и РНК XIST на Xi использовали метод флуоресцентной гибридизации *in situ*, сопряженный с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток, и конфокальную микроскопию. Для локализации BRCA1 и белков гетерохроматина-1 использовали метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток и традиционную флуоресцентную микроскопию.

Результаты. Впервые исследования, проведенные с использованием конфокальной микроскопии, продемонстрировали на более высоком уровне разрешения, чем было представлено в предыдущих работах, колокализацию BRCA1 с зоной РНК XIST на Xi, выявленную с зондами к РНК XIST. С помощью BrdU выявлена также локализация BRCA1 с реплицирующимися участками Xi и аутосомами в поздней S-фазе клеточного цикла. В целом приведенные данные позволяют предположить участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi, обусловленном влиянием BRCA1 на ассоциацию РНК XIST с Xi. Помимо этого, впервые с использованием конфокальной микроскопии выявлена колокализация BRCA1 с реплицирующимися Xi и аутосомами, идентифицированными с использованием BrdU, в поздней S-фазе клеточного цикла, что указывает на возможное участие этого белка в репликации перичентромерных повторов хромосом. В поддержку этой гипотезы также свидетельствуют данные о колокализации BRCA1 с белком гетерохроматина-1 α , присутствующим в перичентромерных участках всех хромосом.

Заключение. Полученные данные указывают на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi в результате регуляции ассоциации некодирующей ингибирующей РНК XIST с Xi, а также в репликации гетерохроматиновых участков хромосом.

Ключевые слова: BRCA1, РНК XIST, инактивированная X-хромосома (Xi), колокализация, конфокальная микроскопия

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-21-26

BRCA1 PARTICIPATES IN XIST RNA LOCALIZATION ON INACTIVE X CHROMOSOME

E.A. Shestakova, T.A. Bogush

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. Inactive X chromosome (Xi) is associated with noncoding XIST RNA, series of proteins and contains multiple epigenetic modifications that altogether determine a silence of the most of X-linked genes. Recently the data were obtained that tumor suppressor BRCA1 is also associated with Xi.

The purpose of this study was to reveal the colocalization of BRCA1 and XIST RNA and precise spatial organization on Xi with the high resolution of confocal microscopy.

Materials and methods. The object of the study is IMR90hTERT diploid immortalized fibroblast cell line. For BRCA1 and XIST RNA colocalization analysis on Xi the method of fluorescent hybridization *in situ* associated with immunofluorescent cell staining (immunoFISH) and confocal microscopy were used. For BRCA1 and heterochromatin protein-1 colocalization study the method of double immunofluorescent staining and common fluorescent microscopy were applied.

Results. The study using confocal fluorescent microscopy with higher resolution has demonstrated at first the colocalization of BRCA1 with XIST RNA region of Xi revealed with XIST RNA probes and with replicating Xi and autosomes revealed with BrdU in late S-phase of cell cycle. Altogether, the data obtained suggest the involvement of BRCA1 in the inhibition of gene expression on Xi due to the regulation of XIST RNA association with Xi. Moreover, according to the results of confocal microscopy, BRCA1 also colocalizes with replicating Xi and autosomes revealed with BrdU in late S-phase of cell cycle. This indicates a possible involvement of this protein in the replication of pericentromeric repeats in cellular chromosomes. Colocalization of BRCA1 with heterochromatin protein-1 α presented in pericentromeric regions of all chromosomes supports this suggestion.

Conclusions. Altogether, the data obtained in this study suggest the involvement of BRCA1 in the inhibition of gene expression on Xi due to the association with noncoding inhibiting XIST RNA and in replication of heterochromatin regions.

Key words: BRCA1, XIST RNA, inactive X chromosome (Xi), colocalization, confocal microscopy

Введение

Инактивация одной из двух X-хромосом (Xi) в эмбриональном развитии самок млекопитающих приводит к дозовой компенсации генов и представляет собой яркий пример эпигенетической регуляции экспрессии генов, затрагивающей одновременно всю хромосому [1–3]. Формирование транскрипционно неактивной Xi включает ее инициацию и необратимую инактивацию. На стадии инициации наблюдаются ассоциация РНК XIST с хроматином, ингибирование транскрипции и запаздывание репликации Xi. В ходе необратимой инактивации происходит ассоциация белков группы Polysomb, модификация гистонов H3 и H4, ассоциация гистона MacroH2A, метилирование CpG островков в ДНК [3].

В полностью инактивированной Xi различают 2 неперекрывающихся области [4]. Одна из областей ассоциирована с РНК XIST, гистонами MacroH2A и H3, трижды метилированным по остатку лизина 27, в то время как другая область ассоциирована с белком гетерохроматина-1 (heterochromatin protein-1, HP1) и гистонами H3, трижды метилированным по остатку лизина 9, гистонами H3, трижды метилированным по остатку лизина 20. Активация транскрипции РНК XIST также сопровождается модификациями нуклеосомных гистонов.

В 2005 г. В.Р. Chadwick и Т.Ф. Lane обнаружили, что BRCA1 частично колокализуется с инактивированной Xi в поздней S-фазе клеточного цикла [5], что предполагает участие BRCA1 также и в репликации Xi. На основании того, что BRCA1 колокализуется с хромоцентрами, G.J. Pageau и J.B. Lawrence предположили участие BRCA1 в репликации перичентромерного гетерохроматина [6].

В наших работах было показано, что BRCA1 участвует в ассоциации некодирующей инактивирующей РНК XIST с Xi. Однако иммунофлуоресцентный анализ проводили с использованием традиционной флуоресцентной микроскопии, не позволяющей получить микрофотографии с высоким разрешением [7, 8].

Некодирующая РНК XIST играет важную роль в эпигенетической регуляции генов, и BRCA1 участвует в этих процессах. Следует также отметить, что экспрессия самого BRCA1 также регулируется на эпигенетическом уровне [9, 10].

В данном исследовании мы применили высоко-разрешающую конфокальную микроскопию. Это позволило детально изучить пространственную организацию и колокализацию BRCA1 и РНК XIST

на Xi и предположить участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов, локализованных на Xi.

Цель исследования – определение пространственной локализации BRCA1 и РНК XIST на Xi с помощью высокоразрешающей конфокальной микроскопии.

Материалы и методы

Культуры клеток. Диплоидные иммортализованные фибробласты линии IMR90hTERT, созданные путем интеграции hTERT в геном клеток IMR90 в результате ретровирусной трансдукции, культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей антибиотики, L-глутамин, несущественные аминокислоты и 10 % эмбриональную телячью сыворотку. Клеточный цикл блокировали путем инкубации клеток с 0,5 мМ мимозина в течение 17 ч, далее клетки отмывали от мимозина и фиксировали через 18 ч для последующего анализа с использованием метода флуоресцентной гибридизации *in situ*, сопряженной с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток, или двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток и конфокальной микроскопии.

Флуоресцентная гибридизация *in situ*, сопряженная с иммунофлуоресцентным окрашиванием клеток. Флуоресцентная гибридизация *in situ*, сопряженная с иммунофлуоресценцией, была выполнена, как описано в работе [11], с небольшими модификациями. Клетки фиксировали 1 % параформальдегидом в фосфатном буфере 20 мин, затем в метаноле при -20°C 10 мин, пермеабилizировали раствором 0,1 % Тритона X-100 в фосфатном буфере 5 мин и инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами к BRCA1 (sc6954, Santa Cruz Biotechnology, 1 : 4000) в течение 45 мин при комнатной температуре и вторичными флуоресцентно-мечеными козьими антителами против иммуноглобулинов G мыши (FITC goat anti-mouse IgG, Molecular Probes) в течение 45 мин при комнатной температуре. После иммунофлуоресцентного окрашивания клетки еще раз фиксировали в 4 % растворе параформальдегида в фосфатном буфере 3 мин, пермеабилizировали раствором 0,1 % Тритона X-100 в фосфатном буфере 3 мин, обрабатывали раствором 0,1 М Tris-HCl, pH 7,02 мин и дважды в растворе $2 \times \text{SSC}$ по 2 мин. Далее клетки дегидратировали в 70, 80, 90 и 100 % этаноле при 4°C по 2 мин, высушивали и проводили гибридизацию *in situ*. Клетки гибридизовали с 10 нг

плазмидного зонда для РНК *XIST*. Плазмиду метили Spectrum Red (Amersham Pharmacia) с помощью стандартных протоколов ник-трансляции. Пробу в растворе, содержащем 75 % формамид, 10 % декстран сульфат, $2 \times \text{SSC}$, 2,5 мг одноцепочечной ДНК из спермы лосося (Boehringer), 50 мкл, денатурировали при 95 °C 5 мин. Покровные стекла с клетками помещали на предметные, на которые наносили каплю раствора с денатурированной меченой плазмидной ДНК. Гибридизацию проводили на стеклах в течение 5 мин при 80 °C (денатурация клеточной ДНК), а затем в течение ночи при 37 °C. После этого покровные стекла с клетками промывали в $2 \times \text{SSC}$ 30 мин при 37 °C, в $1 \times \text{SSC}$ – 30 мин при комнатной температуре, в $0,5 \times \text{SSC}$ – 30 мин при комнатной температуре и помещали на стекла с нанесенной каплей мовиола (Mounting media) для последующего изучения с использованием конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание клеток. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к BRCA1 (Millipore) и моноклональными антителами к HP1 α , HP1 β или HP1 γ (Euromedex) в течение 45 мин при комнатной температуре. Далее клетки инкубировали со вторичными козыими флуоресцентно-мечеными антителами против иммуноглобулинов G кролика или мыши (Rhodamine-Red goat anti-rabbit или FITC goat anti-mouse IgG, Molecular Probes) в течение 45 мин при комнатной температуре.

Конфокальная микроскопия. Микрофотографии клеток получены с использованием конфокального микроскопа Zeiss, LSM510 Meta и программного обеспечения LSM510 software.

Результаты и обсуждение

Пространственная организация BRCA1 и РНК *XIST* на Xi, выявленная с использованием конфокальной микроскопии

Известно, что BRCA1 локализуется вместе с Xi в основном в средней/поздней S-фазе клеточного цикла. Поэтому для конфокальной микроскопии мы использовали синхронизированные с помощью мимозина диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии IMR90hTERT, созданные путем интеграции hTERT в геном клеток IMR90 в результате ретровирусной трансдукции.

Клеточная культура, синхронизированная с использованием 0,5 мМ мимозина в течение 17 ч и далее в его отсутствие инкубированная в течение 18 ч, содержала по данным окрашивания йодидом пропидия и проточной цитофлуориметрии 17 % клеток в фазе G₁, 61 % клеток в фазе G₂ и 22 % клеток в фазе S. Таким образом, с помощью конфокальной

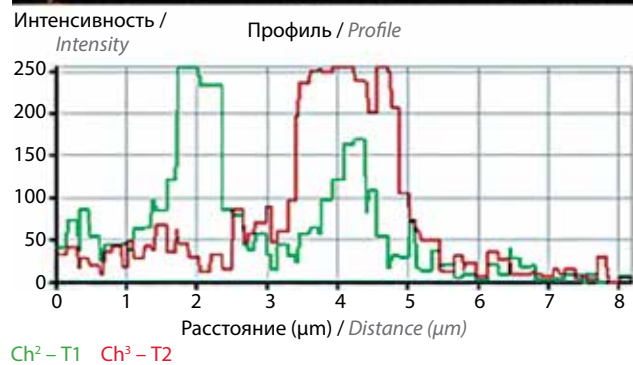
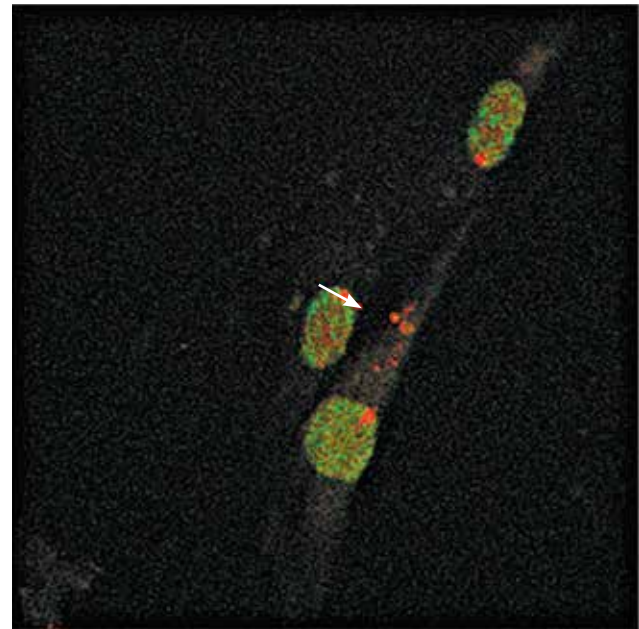


Рис. 1. Колокализация BRCA1 и РНК *XIST* в поздней S-фазе клеточного цикла. Результаты конфокальной микроскопии диплоидных иммортализованных фибробластов линии IMR90hTERT, зафиксированных через 18 ч после остановки инкубации с мимозином, блокирующим клеточный цикл. Количественное распределение клеток в различных фазах клеточного цикла, полученное с помощью проточной цитофлуориметрии: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-FITC и *XIST*-Spectrum Red

Fig. 1. BRCA1 and *XIST* RNA colocalization in the late S-phase of the cell cycle. Results of confocal microscopy of IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts fixed 18 hours after the end of incubation with mimosine blocking the cell cycle. Quantitative distribution of the cells in different phases of the cell cycle obtained using flow cytometry: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Labeled BRCA1-FITC and *XIST*-Spectrum Red were used for fluorescent microscopy

микроскопии мы анализировали популяцию клеток IMR90hTERT в поздней фазе S клеточного цикла.

На рис. 1 показано, что в поздней S-фазе клеточного цикла белок-супрессор BRCA1 частично локализуется вместе с Xi, выявленной с помощью метода РНК-FISH, зондов для РНК *XIST*, антител к BRCA1 и высокоразрешающей конфокальной микроскопии. Вверху рис. 1 приведена микрофотография оптического среза через ядра 3 клеток, полученная на конфокальном микроскопе. Через зону Xi, четко выявляемую

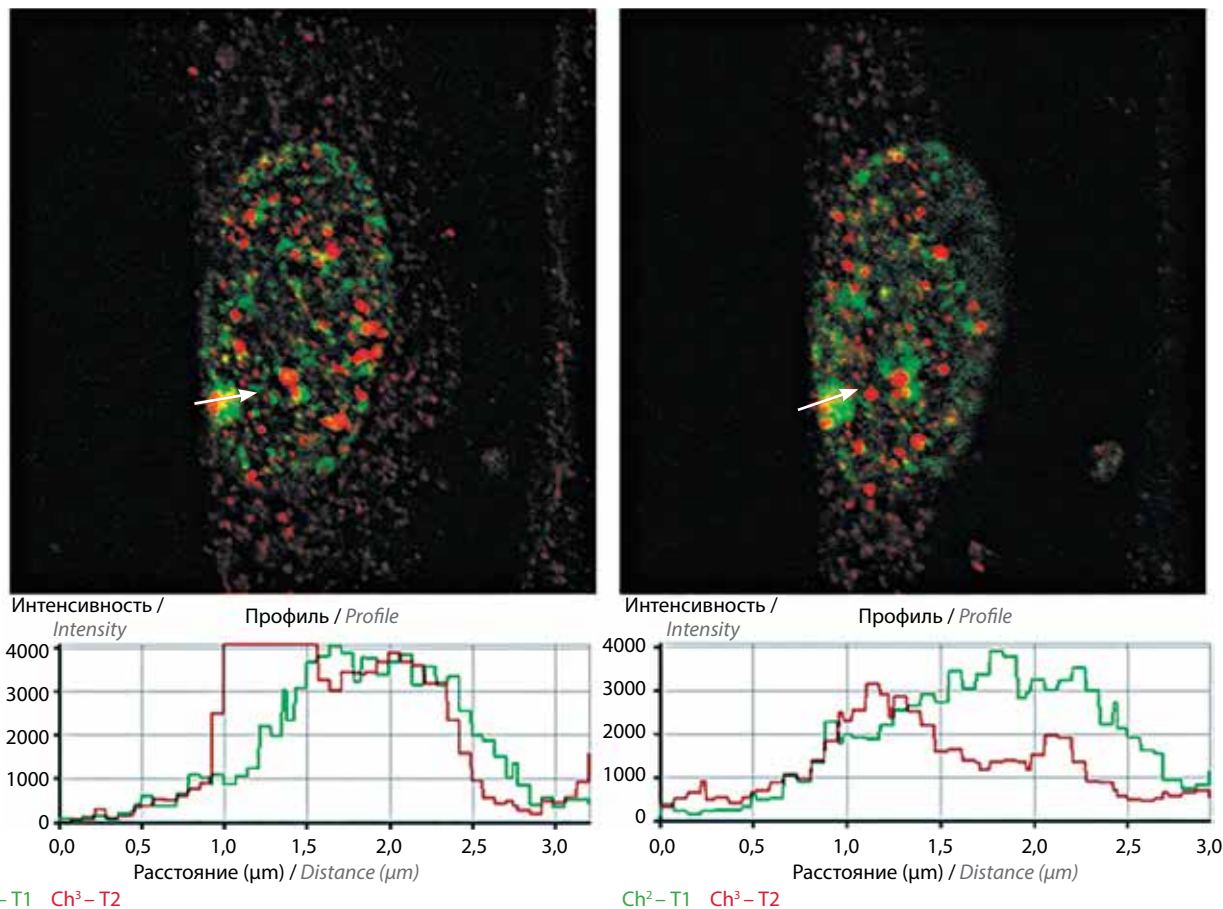


Рис. 2. Колокализация BRCA1 и Xi, выявленной с помощью BrdU, в поздней S-фазе клеточного цикла. Результаты конфокальной микроскопии диплоидных иммортализованных фибробластов линии IMR90hTERT, зафиксированных через 18 ч после остановки инкубации с мимозином. Количественное распределение клеток в различных фазах клеточного цикла, полученное с помощью проточной цитофлуориметрии: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC

Fig. 2. BRCA1 and Xi colocalization detected using BrdU in the late S-phase of the cell cycle. Results of confocal microscopy of IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts fixed 18 hours after the end of incubation with mimosine blocking the cell cycle. Quantitative distribution of the cells in different phases of the cell cycle obtained using flow cytometry: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Labeled BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC were used for fluorescent microscopy

зондами к РНК XIST (красная область), проведена стрелка белого цвета. На графике внизу рисунка представлен профиль интенсивности флуоресценции вдоль указанной стрелки белого цвета. Красная кривая соответствует сигналу Spectrum Red для РНК XIST и зеленая – сигналу FITC для BRCA1. Вдоль стрелки, проведенной через Xi, видны зоны выраженной колокализации сигналов BRCA1 и РНК XIST, умеренной колокализации этих сигналов и участки, где такие сигналы отсутствуют, что говорит о частичной колокализации BRCA1 и РНК XIST на Xi.

Аналогичные результаты были получены с применением BrdU для мечения Xi в поздней S-фазе клеточного цикла. На рис. 2 представлены 2 оптических среза через ядро одной и той же клетки. Обнаружено, что в поздней S-фазе клеточного цикла BRCA1 частично колокализуется с Xi, выявленной

с использованием мечения клеток BrdU, антител к BRCA1 и BrdU, и высокоразрешающей конфокальной микроскопии. Вверху рис. 2 приведены микрофотографии оптических срезов через ядро одной и той же клетки, полученные с помощью конфокальной микроскопии. На каждом из срезов через зону Xi, четко выявляемую антителами к BrdU (зеленая плотная область), проведена стрелка белого цвета. На графиках в нижней части рис. 2 представлены профили интенсивности флуоресценции вдоль этих стрелок. Зеленая кривая соответствует сигналу FITC для BrdU на Xi, а красная – сигналу Rhodamine-Red для BRCA1. Видно, что вдоль стрелки, проведенной через Xi, присутствуют зоны выраженной колокализации сигналов BRCA1 и BrdU, умеренной колокализации этих сигналов и участки без указанных сигналов, что также указывает на частичную колокализацию BRCA1 и Xi.

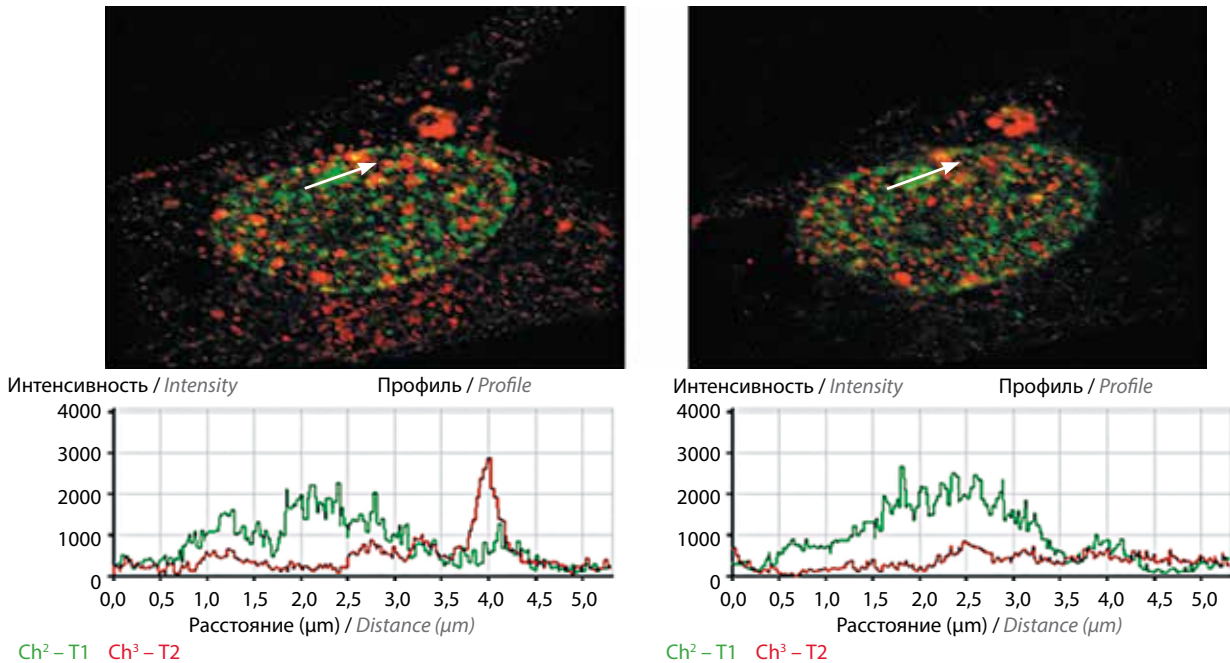


Рис. 3. Колокализация BRCA1, Xi и других локусов, выявленных с помощью BrdU, в поздней S-фазе клеточного цикла. Результаты конфокальной микроскопии диплоидных иммортализованных фибробластов линии IMR90hTERT, зафиксированных через 18 ч после остановки инкубации с мимозином. Количественное распределение клеток в различных фазах клеточного цикла, полученное с помощью проточной цитофлуориметрии: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC

Fig. 3. BRCA1, Xi and other loci colocalization detected using BrdU in the late S-phase of the cell cycle. Results of confocal microscopy of IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts fixed 18 hours after the end of incubation with mimosine blocking the cell cycle. Quantitative distribution of the cells in different phases of the cell cycle obtained using flow cytometry: G₁: 17 %, G₂: 61 %, S: 22 %. Labeled BRCA1-Rhodamine-Red, BrdU-FITC were used for fluorescent microscopy

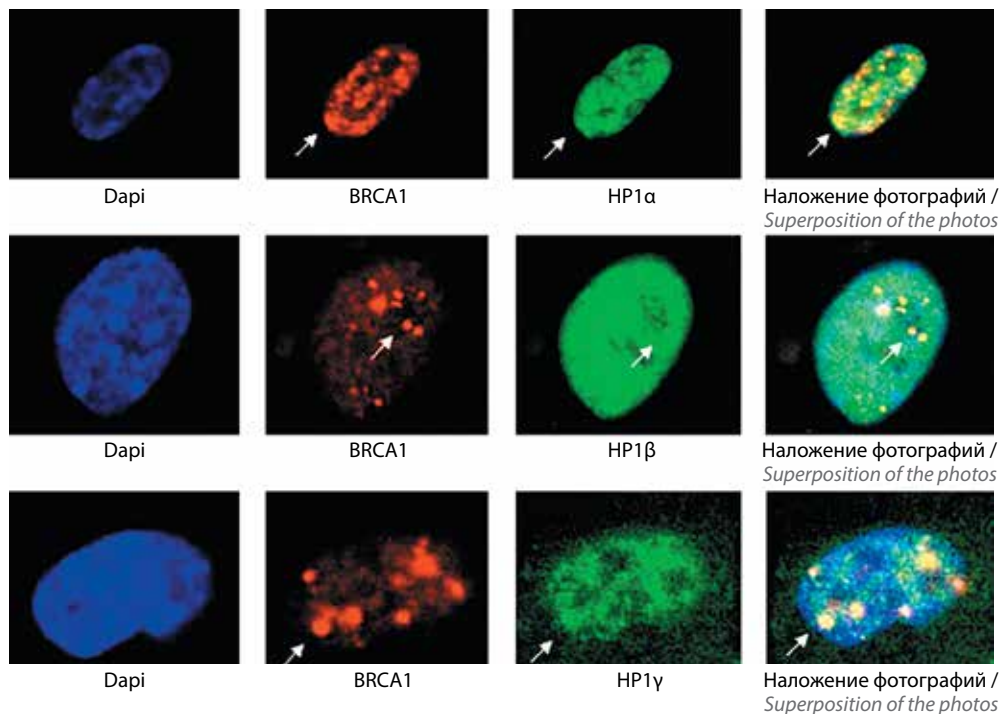


Рис. 4. BRCA1 колокализуется с белком гетерохроматина-1. Диплоидные иммортализованные фибробласты линии IMR90hTERT проанализированы с помощью метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания и обычной флуоресцентной микроскопии. Для флуоресцентной микроскопии использованы меченые BRCA1-Rhodamine-Red, HP1α-FITC, HP1β-FITC, HP1γ-FITC

Fig. 4. BRCA1 is colocalized with heterochromatin protein 1. IMR90hTERT cell line of immortalized diploid fibroblasts was analyzed using double immunofluorescent staining and fluorescent microscopy. Labeled BRCA1-Rhodamine-Red, HP1α-FITC, HP1β-FITC, HP1γ-FITC were used for fluorescent microscopy

Роль BRCA1 в поддержании структуры гетерохроматина

В данной части исследования также использовались синхронизованные с помощью мимозина диплоидные иммортализованные фибробласты человека линии IMR90hTERT, созданные путем интеграции hTERT в геном клеток IMR90 в результате ретровирусной трансдукции, и метод конфокальной микроскопии. Синхронизация культуры описана в предыдущем разделе.

Следует отметить, что иногда наблюдалась колокализация BRCA1 с небольшими локусами BrdU в поздней S-фазе клеточного цикла. Это указывает на участие BRCA1 не только в ассоциации РНК XIST с Xi, но и в репликации перичентромерных повторяющихся последовательностей гетерохроматина на Xi и/или на других хромосомах (рис. 3).

Более того, как показано на рис. 4, BRCA1 колокализуется со всеми тремя изоформами белка HP1: HP1 α , HP1 β и HP1 γ в линии диплоидных иммортализованных фибробластов IMR90hTERT. При этом наиболее полно BRCA1 колокализован с изоформой HP1 α . Эти данные указывают на возможное участие BRCA1 в репликации перичентромерных повторяющихся последовательностей гетерохроматина, с которыми ассоциированы белки семейства HP1.

Заключение

В целом данные, полученные с использованием высокоразрешающей конфокальной микроскопии, указывают на участие BRCA1 в ингибировании экспрессии генов на Xi, в частности, на влияние BRCA1 на ассоциацию РНК XIST с Xi, а также на репликацию гетерохроматиновых участков хромосом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Jegu T., Aeby E., Lee J.T. The X chromosome in space. *Nat Rev Genet* 2017;18(6): 377–89. DOI: 10.1038/nrg.2017.17.
- Yang L., Froberg J., Lee J.T. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. *Trends Biochem Sci* 2014;39(1):35–43. DOI: 10.1016/j.tibs.2013.10.002.
- Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(3):247–55. DOI: 10.1016/j.ceb.2004.03.005.
- Chadwick B.P., Willard H.F. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(50):17450–5. DOI: 10.1073/pnas.0408021101.
- Chadwick B.P., Lane T.F. BRCA1 associates with the inactive X chromosome in late S-phase, coupled with transient H2AX phosphorylation. *Chromosoma* 2005;114(6):432–9. DOI: 10.1007/s00412-005-0029-1.
- Pageau G.J., Lawrence J.B. BRCA1 foci in normal S-phase nuclei are linked to interphase centromeres and replication of pericentric heterochromatin. *J Cell Biol* 2006;175(5):693–701. DOI: 10.1083/jcb.200602055.
- Ganesan S.C., Silver D.P., Greenberg R.A. et al. BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. *Cell* 2002;111(3):393–405.
- Silver D.P., Dimitrov S.D., Feunteun J. et al. Further evidence for BRCA1 communication with the inactive X chromosome. *Cell* 2007;128(5):991–1002. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.025.
- Shestakova E.A. Epigenetic regulation of BRCA1 expression and its role in breast cancer stem cell development. *Turk J Biol* 2016;40(5):981–9. DOI: 10.3906/biy-1507-145.
- Богуш Т.А., Шестакова Е.А., Вихлянцева Н.О. и др. Эпигенетические механизмы регуляции BRCA1. *Онкогинекология* 2017;23(2):4–11. [Bogush T.A., Shestakova E.A., Vikhlyantseva N.O. et al. Epigenetic mechanisms of BRCA1 regulation. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2017;23(2):4–11. (In Russ.)].
- Robert-Forcel I., Junera H.R., Geraud G. et al. Three-dimensional organization of the ribosomal genes and Ag-NOR proteins during interphase and mitosis in PtK1 cells studied by confocal microscopy. *Chromosoma* 1993;102(3):146–57.

Благодарность

Авторы выражают особую благодарность профессору Дэвиду М. Ливингстону (Pr.D. M. Livingston) за финансирование и общее руководство данным исследованием, выполненным в Онкологическом институте им. Дана-Фарбера (Бостон, США).

Acknowledgements

The authors are very grateful to Professor David M. Livingston for financial support and general guidance during this study performed at the Dana Farber Cancer Institute (Boston, USA).

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.А. Шестакова/E.A. Shestakova: <https://orcid.org/0000-0002-0158-4605>

Т.А. Богуш/T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Представленное исследование поддержано грантами Национального института онкологических исследований (США), Фонда по исследованиям в области рака молочной железы (США), Института по биомедицинским исследованиям (США), выданными проф. Дэвиду М. Ливингстону (Pr.D. M. Livingston).

Funding. This study was supported by grants from the National Cancer Institute (USA), Breast Cancer Research Foundation (USA), Novartis Institute for Biomedical Research (USA) issued to Professor David M. Livingston.

Статья поступила: 12.10.2018. **Принята в печать:** 12.04.2019.

Article received: 12.10.2018. **Accepted for publication:** 12.04.2019.

РАЗРАБОТКА НОВОГО МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К ХИТИНАЗОПОДОБНОМУ БЕЛКУ YKL-39 ДЛЯ ИММУНОГИСТОХИМИИ

А.Н. Грачев¹, Д.В. Самойлова¹, С.Н. Курочкин², О.В. Ковалева¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ООО «ПраймБиоМед»; Россия, 117246 Москва, Научный пр-д, 20, стр. 3

Контакты: Алексей Николаевич Грачев alexei.gratchev@gmail.com

Введение. Хитиназоподобные белки у млекопитающих образуются в зоне воспаления и опухолевого роста. Отдельные представители семейства хитиназоподобных белков изучаются как потенциальные биомаркеры опухолей (глиомы, рака предстательной железы и яичников). Одним из охарактеризованных белков данного класса является YKL-39. Известный также как хитиназа-3-подобный белок 2, YKL-39 представляет собой секреторный белок хондроцитов, принадлежащий к семейству гликозил-гидролазы 18. Его самая высокая экспрессия наблюдается в хондроцитах, синовиоцитах, легких и сердце, а также в макрофагах.

Цель исследования — получение антител к человеческому YKL-39, применимых в широком спектре методов.

Материалы и методы. Используя рекомбинантный полноразмерный человеческий YKL-39 в качестве антигена, методом гибридомной технологии мы получили мышинные моноклональные антитела 1B2G4, которые специфически связываются с YKL-39 в иммуноферментном анализе.

Результаты и заключение. Полученные антитела были успешно протестированы с использованием методов иммуноблоттинга, иммуноцитохимии, иммунофлуоресценции и иммуногистохимии с использованием парафиновых срезов. Установлено, что антитела связываются с полноразмерным белком YKL-39 и не взаимодействуют с другими хитиназоподобными белками.

Ключевые слова: моноклональные антитела, хитиназоподобные белки, иммуногистохимический метод

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-27-31

DEVELOPMENT OF A NOVEL MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST CHITINASE-LIKE PROTEIN YKL-39 APPLICABLE FOR IMMUNOHISTOCHEMISTRY

A. N. Gratchev¹, D. V. Samoilova¹, S. N. Kurochkin², O. V. Kovaleva¹

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

²PrimeBioMed; Build. 20, 3 Nauchnij Proezd, Moscow 117246, Russia

Introduction. Mammalian chitinase-like proteins are produced in the areas of inflammation and in tumors. Some members of chitinase-like proteins family are studied as potential biomarkers of tumors (glioma, prostate and ovary). YKL-39 also known as chitinase-3-like 2 (CHI3L2) is a secreted protein produced by chondrocytes. Its high expression is also found in synoviocytes, lung heart and macrophages.

The aim of this study was the development of highly specific monoclonal antibodies against human YKL-39.

Materials and methods. Using recombinant full-length human YKL-39 as immunogen using hybridoma technology we have generated monoclonal antibody 1B2G4, that specifically binds YKL-39 in ELISA.

Results and conclusion. Obtained antibody was successfully tested in Western blot, immunocytochemistry, immunofluorescence and immunohistochemistry on FFPE sections. It was shown that the antibody binds the full-length YKL-39 protein and does not interact with other chitinase-like proteins.

Key words: monoclonal antibody, chitinase-like protein, immunohistochemistry

Введение

Проблема точной диагностики онкологических заболеваний сохраняет актуальность на протяжении нескольких десятилетий. В качестве маркеров для

диагностики используются белки, нуклеиновые кислоты, везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, а также сами опухолевые клетки. Стандартные иммуноцитохимические и иммуногистохимические

методы анализа с использованием антител к известным белкам-маркерам опухоли позволяют классифицировать тип новообразований, оценить степень их злокачественности и определить стратегию терапии.

Хитиназоподобные белки (ХПБ) у млекопитающих часто образуются в зоне воспаления и опухолевого роста. В последнее время отдельные представители семейства изучаются как потенциальные биомаркеры различных заболеваний человека, в том числе солидных опухолей (глиомы, рака предстательной железы и яичников). Одним из охарактеризованных белков данного класса является YKL-39. Известный также как хитиназа-3-подобный белок 2 (CHI3L2), YKL-39 представляет собой секреторный белок хондроцитов, принадлежащий к семейству гликозил-гидролазы 18. Его самая высокая экспрессия наблюдается в хондроцитах, синовиоцитах, в легких и сердце, а также в макрофагах. В последних экспрессия YKL-39 стимулируется трансформирующим фактором роста бета [1]. На сегодняшний день YKL-39 может считаться маркером остеоартрита и обнаруживается в синовиальной жидкости и сыворотке крови пациентов [2–4]. Повышенный уровень экспрессии гена YKL-39 выявлен у пациентов с болезнью Альцгеймера и в глиобластомах [5]. Какую функцию выполняет данный белок в глиобластомах на данный момент, неизвестно, однако предполагают, что он может отвечать за пролиферативную способность клеток и ремоделирование внеклеточного матрикса [6]. Также показано, что YKL-39 является проангиогенным фактором и хемоаттрактантом для моноцитов, способствующим метастазированию. У пациентов с раком молочной железы повышенный уровень экспрессии YKL-39 после неoadъювантной химиотерапии указывает на высокий риск метастазирования и плохой ответ на терапию [7]. За счет того, что данный белок секретуем, на него возлагают надежды как на потенциальный маркер, пригодный для ранней диагностики. Существуют данные, доказывающие, что внесение ХПБ в панель маркеров различных тестов приводит к повышению их чувствительности и специфичности.

Цель исследования – разработка нового моноклонального антитела, обладающего специфичностью к белку YKL-39 человека, которое может быть использовано в иммунодиагностике и прогностической оценке течения опухолевых заболеваний у человека.

Материалы и методы

Культивирование клеток

В исследовании была использована клеточная линия глиобластомы человека LN229. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе (при 37 °С, в атмосфере 5 % CO₂). В качестве среды для культивирова-

ния применяли DMEM с добавлением 0,294 мг/мл L-глутамин и 10 % фетальной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина.

Получение экспрессирующих векторов

Для получения бактериального штамма, экспрессирующего рекомбинантный белок YKL-39, его кодирующая последовательность была клонирована в вектор pET45b (+). Кодирующая последовательность YKL-39 человека была амплифицирована на матрице комплементарной ДНК, полученной из матричной РНК клеток линии глиобластомы LN229 с использованием ген-специфических праймеров YKL-39 F3006 XhoI 5'-ACT TCT CGA GAC CAT GGG AGC AAC CAC C и YKL-39 R3006 HindIII 5'-TAG AAA GCT TCA AGG AGC CAA GGC TTC, со встроенными сайтами эндонуклеаз рестрикции XhoI и HindIII соответственно. Амплифицированные фрагменты ДНК очищали и клонировали в вектор pET45b (+) между сайтами XhoI и HindIII. В результате была получена плазида pET45b-YKL39, несущая кодирующую последовательность гена YKL-39 человека. Отсутствие мутаций в полученной последовательности проверяли при помощи секвенирования.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка

Для экспрессии рекомбинантного белка YKL-39 использовали бактерии *E. coli* штамма BL21DE3. Бактерии, трансформированные плазмидой pET45b-YKL-39, стимулировали IPTG в конечной концентрации 1 мМ в течение 3 ч при 37 °С. Полученные бактерии лизировали с помощью ультразвука, и полученные лизаты использовали для выделения белка.

На I стадии полученные тельца включения экстрагировали 5 М мочевиной в PBST в течение 1 ч при комнатной температуре. На II стадии для лизиса тельца включения был использован буфер следующего состава: 0,5 М аргинина, 6 М мочевины, 20 мМ Трис, рН 10,0, 50 мМ дитиотреитола, 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 10 мМ глицина. Лизис осуществляли в течение 12 ч при +4 °С. Полученный лизат центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин и температуре +4 °С. Рефолдинг белков проводили путем перевода гель-фильтрацией на колонке «Сефадекс G-25» в буфер следующего состава: 0,5 М NaCl, 4 М мочевины, 0,5 М аргинина, 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 10 мМ цистеамина, 2 мМ имидазола, PBST – до 50 мл с последующей инкубацией в течение 12–36 ч при +4 °С. Дальнейшую очистку белков производили металл-хелатной хроматографией (IMAC) на колонке IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare, 17-0921-08). Белок наносили на колонку IMAC Sepharose 6 FastFlow, уравновешенную буфером. Колонку промывали ступенчатым

градиентом концентрации имидазола. Эффективная элюция белка YKL-39 с минимальными примесями происходит при 75 мМ имидазола. Полученный в результате процедуры очистки белок YKL-39 был использован в качестве антигена для иммунизации мышей.

Получение моноклонального антитела

Первичная иммунизация мышей Balb/c (самок 18 г) проводилась путем введения около 30 мкг антигена (рекомбинантный белок YKL-39) с полным адьювантом Фрейнда (1 : 1) в лапы и холку. Бустирование антигеном с неполным адьювантом Фрейнда проводили через 2 нед после первичной иммунизации. Гибридизацию (слияние) спленоцитов мышей с клеточной линией Sp 2/0 делали через 3 дня (на 4-й день) после бустирования с помощью PEG 1500. В среду для посадки гибридом (RPMI-1640 с 15 % Fetal CloneI) добавляли нейтрализующие антитела в соответствии с рекомендациями производителя. Полученные гибридомы были рассажены на три 96-луночных планшета по 150 мкл суспензии в лунку и оставлены на 10 дней, после чего были протестированы методом иммуноферментного анализа.

Иммуноферментный анализ

Рекомбинантный YKL-39 адсорбировали на поверхности лунок 96-луночного планшета в концентрации 5 мкг/мл в течение ночи при +4 °С. Далее лунки промывали 3 раза буфером PBS и блокировали 5 % раствором BSA в PBS в течение 2 ч при 37 °С. Далее планшеты инкубировали с моноклональными антителами. После 3-кратной отмывки раствором PBST проводили инкубацию с пероксидазным конъюгатом антител против мыши (HRPanti-mouse IgG) в разведении 1 : 10000 в течение 1 ч при 37 °С. После 3-кратной отмывки раствором PBST в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата тетраметилбензидина и инкубировали до развития окраски в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в лунку по 25 мкл 10 % раствора серной кислоты. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 450 нм.

Иммуноблоттинг

Клеточные лизаты получали из субконфлюентного монослоя клеток с использованием буфера RIPA, содержащего смесь ингибиторов протеаз ($\times 10$ protease cocktail inhibitor, Roche, Швейцария). Концентрацию полученных лизатов определяли методом Бредфорда, на гель наносили 50 мкг белка. Белки разделяли в SDS-полиакриламидном геле, после чего перемещали на нитроцеллюлозную мембрану методом мокрого переноса по стандартному протоколу (прибор Mini Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories Inc., США). Мембрану инкубировали в 5 % растворе

обезжиренного молока (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в течение 1 ч. Затем ее инкубировали в течение 12 ч со соответствующими первичными антителами при +4 °С с последующей стандартной отмывкой, после чего мембрану инкубировали 1–1,5 ч при комнатной температуре с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После стандартной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемиллюминесцентной реакции ECL. Указанную реакцию регистрировали на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

Иммуноцитохимия и иммуноцитофлуоресценция

Культуру LN229 выращивали на покровных стеклах до достижения 30 % конфлюентности. Клетки фиксировали в течение 15 мин в 3,7 % параформальдегида с последующей промывкой в PBS («ПанЭко», Россия). После фиксации и промывок клетки инкубировали с антителом к YKL-39 в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем с козьими антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуорохромом Alexa-488 (Jackson ImmunoResearch, США), или полимерной пероксидазой хрена («ПраймБиоМед», Россия) 40 или 15 мин соответственно при комнатной температуре. Для визуализации окрашивания в нефлуоресцентном методе добавляли субстрат 3,3-диаминобензидин хромоген на 5–10 мин («ПраймБиоМед», Россия). Препараты заключали в среду на водной основе и оценивали результаты при помощи микроскопа Olympus BX-53 (Cheminst, Германия), сопряженного с камерой Infinity 2 (Lumenera, США).

Иммуногистохимический анализ

Иммуногистохимическое исследование проводили на операционном материале, фиксированном 10 % нейтральным формалином, забуференным фосфатными солями, в течение 24 ч. После гистологической проводки материал заливали в парафин и затем готовили срезы толщиной 2–4 мкм. Срезы монтировали на специальные высокоадгезивные стекла (SuperFrost Plus, ApexLab) и высушивали в течение 18 ч при 37 °С.

Срезы депарафинизировали ксилолом, регидрировали в спиртах с объемной долей изопропанола 100 (I, II), 70 и 50 % по 5 мин в каждом и промывали в дистиллированной воде. Блокировку эндогенной пероксидазы проводили в 3 % растворе перекиси водорода в течение 10 мин. Срезы инкубировали с антителами к YKL-39, а затем с антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с полимерной пероксидазой хрена. Окрашивание проявляли при помощи субстрата 3,3-диаминобензидин

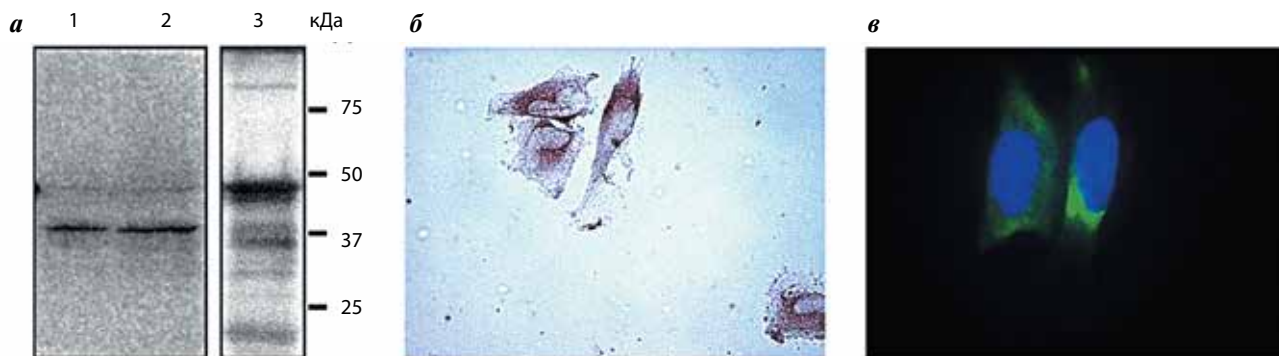


Рис. 1. Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток LN229 (1, 2) и рекомбинантного белка YKL-39 (3). В качестве первых антител были использованы антитела anti-YKL-39 клон 1B2G4 (a). Иммуноцитохимический (б) и иммунофлуоресцентный анализы (в) YKL-39 в клетках LN229 при помощи антител anti-YKL-39 клон 1B2G4 ($\times 40$)

Fig. 1. Immunoblotting of total protein LN229 cell lysates (1, 2) and YKL-39 recombinant protein (3). The anti-YKL-39 clone 1B2G4 antibodies were used as first antibodies (a). Immunocytochemical (б) and immunofluorescent analyses (в) of YKL-39 in LN229 cells using anti-YKL-39 clone 1B2G4 antibodies ($\times 40$)

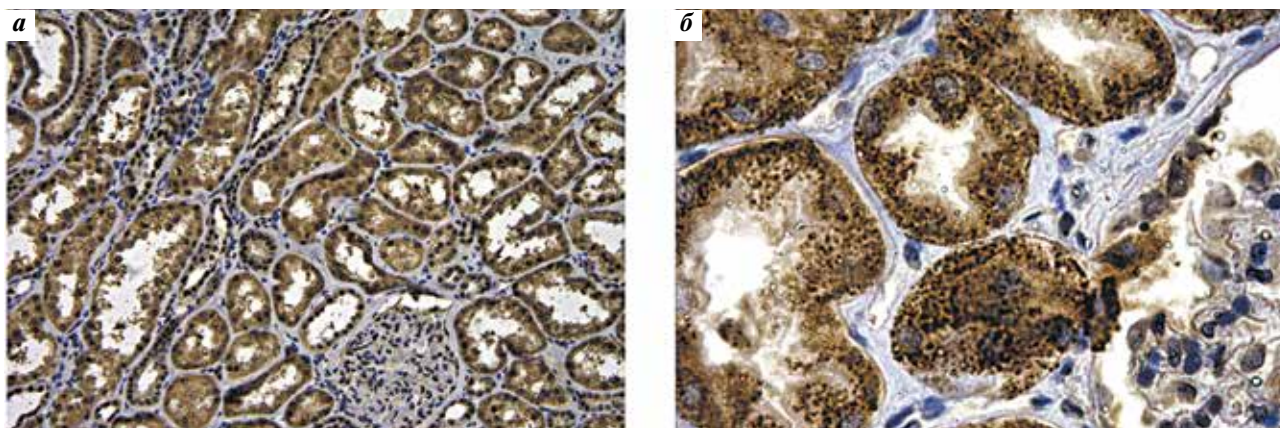


Рис. 2. Иммуногистохимический анализ YKL-39 в парафиновых срезах здоровой почки. Окрашивание проводили при помощи антител anti-YKL-39 клон 1B2G4. Специфическая гранулярная окраска цитоплазмы клеток канальцев на парафиновом срезе ткани, фиксированном формалином, свидетельствует о наличии клеток, экспрессирующих YKL-39. $\times 100$ (a) и $\times 400$ (б)

Fig. 2. Immunocytochemical analysis of YKL-39 in paraffin sections of a healthy kidney. The sample was stained with anti-YKL-39 clone 1B2G4 antibodies. Specific granular staining of the cytoplasm of the renal tubules fixed with formalin indicates presence of cells expressing YKL-39. $\times 100$ (a) and $\times 400$ (б)

хромогена в течение 5–10 мин. Результаты оценивали с помощью микроскопа Olympus VX-53 (Cheminst, Германия).

Результаты

Для разработки новых моноклональных антител к ХПБ YKL-39 в качестве иммуногена был использован полноразмерный рекомбинантный белок. В результате иммунизации был получен 21 клон гибридом, производящих антитела, связывающиеся с антигеном.

В результате дальнейшего клонирования и анализа кросс-реактивности с другими ХПБ был отобран 1 клон 1B2G4, взаимодействующий при иммуноферментном анализе с YKL-39 и не взаимодействующий с его ближайшими гомологами YKL-40 и SI-CLP (данные не показаны).

Для подтверждения специфичности антител дополнительно был проведен анализ белка YKL-39

методом иммуноблоттинга в тотальных лизатах клеток глиобластомы LN229, в качестве контроля был использован рекомбинантный белок, выделенный из *E. coli* (рис. 1a). Было показано, что в клеточных лизатах LN229 антитела 1B2G4 узнают 2 изоформы белка размерами 39 и 48 кДа (см. рис. 1a), что характерно для ХПБ [8, 9]. Далее полученные антитела 1B2G4 тестировали методом иммуноцитохимии и иммунофлуоресценции, после чего анализ клеток LN229 выявил окрашивание цитоплазматических гранул, характерных для секретируемых белков (рис. 1б, в).

Антитела к белку YKL-39, клон 1B2G4 тестировали методом иммуногистохимии на парафиновых срезах нормальной почки. Температурную демаскировку антигена проводили в цитратном буфере pH 6,0, окрашивание срезов – по стандартному протоколу. Полученные результаты представлены на рис. 2. Наблюдается четкая цитоплазматическая окраска

клеток эпителия почечных канальцев, характерная для окрашивания антителами к YKL-39 [10].

Заключение

Таким образом, антитела, продуцируемые гибридной YKL-39, клон 1B2G4 специфически работают

в иммуноферментном анализе, иммуноцитохимии, непрямой иммунофлуоресценции, иммуноблоттинге на тотальных лизатах клеточной линии LN229 и рекомбинантном белке, иммуногистохимии на тканях почки. Антитела связываются с полноразмерным белком YKL-39 и не взаимодействуют с другими ХПБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Gratchev A., Schmuttermaier C., Mamidi S. et al. Expression of Osteoarthritis Marker YKL-39 is Stimulated by Transforming Growth Factor Beta (TGF-beta) and IL-4 in Differentiating Macrophages. *Biomark Insights* 2008;3:39–44.
2. Hu B., Trinh K., Figueira W.F. et al. Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family. *J Biol Chem* 1996;271(32):19415–20.
3. Steck E., Breit S., Breusch S.J. et al. Enhanced expression of the human chitinase 3-like 2 gene (YKL-39) but not chitinase 3-like 1 gene (YKL-40) in osteoarthritic cartilage. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299(1):109–15.
4. Knorr T., Obermayr F., Bartnik E. et al. YKL-39(chitinase 3-like protein 2), but not YKL-40(chitinase 3-like protein 1), is up regulated in osteoarthritic chondrocytes. *Ann Rheum Dis* 2003;62(10):995–8.
5. Colton C.A., Mott R.T., Sharpe H. et al. Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation* 2006;3:27. DOI: 10.1186/1742-2094-3-27.
6. Miyatake K., Tsuji K., Yamaga M. et al. Human YKL39 (chitinase 3-like protein 2), an osteoarthritis-associated gene, enhances proliferation and type II collagen expression in ATDC5 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013;431(1):52–7. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.094.
7. Liu T., Larionova I., Litviakov N. et al. Tumor-associated macrophages in human breast cancer produce new monocyte attracting and pro-angiogenic factor YKL-39 indicative for increased metastasis after neoadjuvant chemotherapy. *Oncoimmunology* 2018;7(6):e1436922. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1436922.
8. Kzhyshkowska J., Mamidi S., Gratchev A. et al. Novel stabilin-1 interacting chitinase-like protein (SI-CLP) is up-regulated in alternatively activated macrophages and secreted via lysosomal pathway. *Blood* 2006;107(8):3221–8. DOI: 10.1182/blood-2005-07-2843.
9. Renkema G.H., Boot R.G., Au F.L. et al. Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages. *Eur J Biochem* 1998;251(1–2):504–9.
10. Uhlen M., Fagerberg L., Hallstrom B.M. et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015;347(6220):1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.

Вклад авторов

А.Н. Грачев: разработка дизайна и планирование работы, написание статьи;
Д.В. Самойлова, С.Н. Курочкин: получение данных;
О.В. Ковалева: получение и анализ данных, написание статьи.

Authors' contributions

A.N. Grachev: study design and planning, manuscript preparation;
D.V. Samoylova, S.N. Kurochkin: data accumulation;
O.V. Kovalyova: receipt and analysis and manuscript preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Н. Грачев/A.N. Grachev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>
О.В. Ковалева/O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>
Д.В. Самойлова/D.V. Samoilova: <https://orcid.org/0000-0001-5639-0835>
С.Н. Курочкин/S.N. Kurochkin: <https://orcid.org/0000-0002-8043-3871>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-01857), фонда развития Центра разработки и коммерциализации новых технологий «Сколково».

Financing. The study was performed with the support from the Russian Foundation for Basic Research (grant No. 17-04-01857), Foundation for Development of the New Technologies Development and Commercialization Center “Skolkovo”.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 24.10.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 24.10.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПРОИЗВОДНЫХ N-ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛО[2,3-А]ПИРРОЛО[3,4-С]-КАРБАЗОЛОВ НА ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ АКТИВНОСТЬ

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

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

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

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

Введение. В работе рассматривается перспектива рационального подхода к созданию новых противоопухолевых агентов на основе производных индолакарбазолов.

Цель исследования – в ходе анализа связи «структура – активность» провести сравнительное изучение 12 отечественных производных N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов.

Материалы и методы. Исследование влияния структуры на противоопухолевую активность 12 углеводосодержащих индолакарбазолов, синтезированных в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина, выполняли на солидных моделях перевиваемых опухолей мышей: эпидермоидной карциноме легкого Lewis и меланоме B16. Противоопухолевый эффект оценивали по критерию торможения роста карциномы легкого Lewis и меланомы B16.

Результаты. Разнообразие модификаций индолакарбазолов позволило выявить зависимость их противоопухолевых свойств как от структуры агликона, так и от гликозидного остатка. Замена атомов в верхнем гетероцикле по имидному азоту влияет на изменение противоопухолевой активности производных индолакарбазолов с различными и одинаковыми углеводными остатками. При сравнительном изучении 12 производных N-гликозидов индолакарбазолов на моделях карциномы легкого Lewis и меланомы B16 противоопухолевую активность проявили 8 производных.

Заключение. Сформулированные положения о модификационных особенностях в структуре производных индолакарбазолов могут быть использованы для создания более активных соединений с высокой избирательностью действия.

Ключевые слова: производные индолакарбазолов, химическая структура, противоопухолевая активность, перевиваемые опухоли мышей

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-32-39

N-GLYCOSIDESINDOLO[2,3,-A]PYRROLO[3,4,-C]CARBAZOLE DERIVATIVES CHEMICAL STRUCTURE INFLUENCE ON ANTITUMOR ACTIVITY

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

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

²Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

Introduction. The report considers the prospect of rational approach to the new anticancer agents creation based on indolocarbazole derivatives.

Objective. To conduct a comparative study of 12 domestic N-glycosides, indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole derivatives in the course of “structure – activity” bond analysis.

Materials and methods. The investigation of influence of 12 carbohydrate – containing indolocarbazoles, synthesized in N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center of the Ministry of Health of Russia, performed on models of solid transplantable mouse tumors: lung Lewis epidermoid carcinoma and B16 melanoma. The antitumor effect was assessed by Lewis epidermoid carcinoma and B16 melanoma tumor growth inhibition (TGI %) criterion.

Results. A variety of indolocarbazoles modifications allowed revealing the dependence of their antitumor properties on the structure of both, the aglycone and the glycoside residue. Imino-nitrogen interchange of atoms in upper heterocycle influences on indolocarbazole derivatives antitumor activity change. During a comparative study of 12 N-glycosides indolocarbazole derivatives on lung Lewis epidermoid carcinoma and B16 melanoma models, 8 derivatives showed antitumor activity.

Conclusion. The formulated concepts on the modification features in indolocarbazole derivatives structure can be used for more active compounds creation with greater action selectivity.

Key words: indolocarbazole derivatives, chemical structure, antitumor activity, transplantable mouse tumors

Введение

Исследование связи «структура — активность» открывает оптимальные пути для создания лекарственных препаратов высокой избирательности и эффективности среди продуктов синтеза природных аналогов или химической модификации их структур.

Химическая структура противоопухолевого цитотоксического вещества должна обеспечивать препарату, как правило, 3 основных свойства. Во-первых, он должен обладать благоприятной фармакокинетикой, то есть при введении в организм концентрироваться главным образом в тканях, пораженных опухолями. Во-вторых, препарат должен легко преодолевать мембранные барьеры и попадать внутрь опухолевых клеток. В-третьих, внутри опухолевых клеток или на их поверхности активное соединение должно поражать ключевые биохимические процессы, чтобы необратимо вызывать повреждение опухолевых клеток или торможение пролиферации. Кроме того, разработка новых противоопухолевых препаратов осуществляется как с целью усиления их специфической активности, так и для уменьшения токсического действия на нормальные ткани. Соотношение этих факторов обеспечивает избирательность противоопухолевого действия и определяет ценность цитостатика как противоопухолевого препарата [1, 2].

Уникальность структуры и биологические свойства соединений, относящихся к классу N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, стимулировали поиск и создание активных противоопухолевых агентов среди их синтетических аналогов и низкомолекулярных производных.

Индолокарбазолы состоят из 2 индольных групп, связанных с гетероциклической частью через бензол, и гликозида (пентозы или гексозы), соединенного с 1 или 2 индольными группами. В качестве функциональных, связанных с углеводородным радикалом групп, в гетероциклической части молекулы индолокарбазола могут выступать азотсодержащие или кислородсодержащие группы атомов. Интерес представляют гетероциклы, включающие фрагмент индоло[2,3-а]карбазола, присоединенный к малеймидному или лактонному остатку. N-гликозиды этого ряда соединений известны как высокоактивные вещества в отношении клеточных ферментов — протеинкиназ и топоизомераз [3–6].

В 1977 г. одним из первых в группе N-гликозидов индолокарбазолов, обладающих биологической активностью, был выделен стауроспорин, и установлено его строение (культура *Streptomyces staurosporeus*) [7]. Позже, в 1983 г., из актинобактерий *Nocardia aerocolonigenes* получен известный в ряду N-гликозидов индолокарбазолов противоопухолевый антибиотик ребеккамицин (рис. 1) [8].

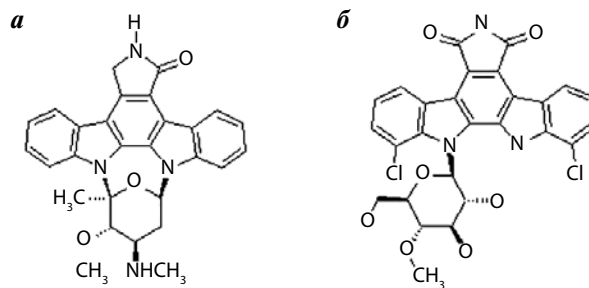


Рис. 1. Структурные формулы: а — стауроспорин; б — ребеккамицин
Fig. 1. Structural formulas: а — staurosporine and б — rebeccamycin

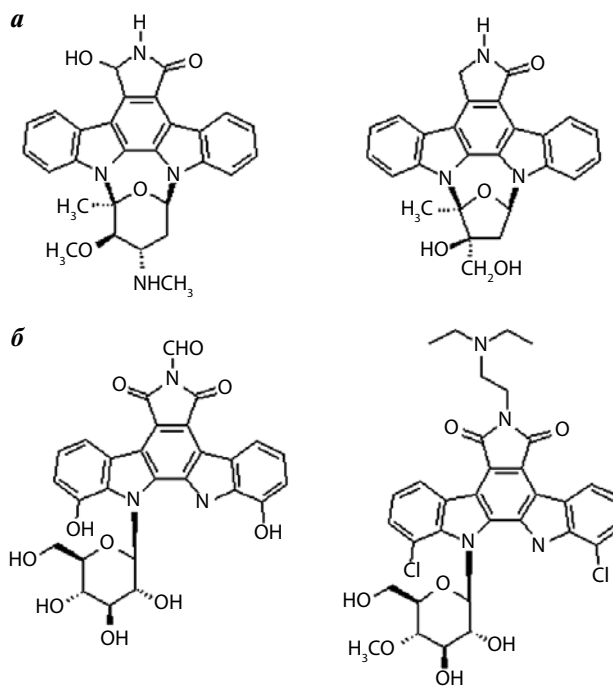


Рис. 2. Структурные формулы производных: а — стауроспорина (UCN-01, CEP-701); б — ребеккамицина (NB-506, NSC-655649)

Fig. 2. Structural formulas of: а — staurosporine derivatives (UCN-01, CEP-701); б — rebeccamycin derivatives (NB-506, NSC-655649)

Для повышения растворимости и увеличения активности исходные природные индолокарбазолы стауроспорин и ребеккамицин подвергали различным модификациям: а) присоединению заместителей к верхнему гетероциклу, замене атомов в верхнем гетероцикле или удалению гетероцикла; б) модификации плоского хромофора; в) модификации замены или удаления углеводной части [9–11].

Известно, что у представителей производных стауроспорина (UCN-01, CEP-701) гликозид связан с 2 индольными группами через атомы азота, в отличие от аналогов ребеккамицина (NB-506, NSC-655649), у которых сахар присоединяется только к 1 индолу (рис. 2). Гетероцикл стауроспорина соединен с лактонным кольцом, гетероцикл ребеккамицина — с имидным кольцом.

Принято считать, что верхний гетероцикл отвечает за связывание индолокарбазолов с киназами и топоизомеразами, плоский хромофор с ненасыщенными группами атомов позволяет встраиваться (интеркалировать) индолокарбазолам между основаниями молекулы ДНК, а углеводный остаток обеспечивает ковалентную связь с ДНК. Кроме того, модификации в строении углеводной части молекулы меняют не только сродство к ДНК, но и способность ингибировать ферменты метаболизма нуклеиновых кислот – топоизомеразы I и II [3, 10, 12]. Например, определенные модификационные изменения в структуре 6-N-амино-аналогов индолокарбазола NB-506 позволяют обеспечить лучшую противоопухолевую активность ингибиторов топоизомеразы I [13, 14]. При этом наличие гликозидного остатка у атома азота в индоле является ключевым элементом как для взаимодействия с ДНК, так и для ингибирования топоизомеразы I [5, 10].

Различные модификации природных и синтетических производных индолокарбазолов приводят к изменениям их физико-химических свойств и биологической активности, что важно для разработки соединений в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Очевидно, что на противоопухолевый эффект исследуемого соединения могут оказывать влияние как заместители в агликоне, так и природа гликозидного остатка. Это может быть связано с изменением спектра противоопухолевого действия либо разной степенью лечебного эффекта, неодинаковой биодоступностью соединений, что впоследствии повлияет на величину терапевтической дозы препарата. Таким образом, индолокарбазолы и их углеводосодержащие производные перспективны для дальнейшей оптимизации химической структуры.

В лаборатории химического синтеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина разработан оригинальный метод синтеза N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, позволяющий получать ряды аналогов, отличающихся структурой углеводного остатка и/или агликона. Метод обеспечивает стереоспецифичность гликозидной связи и использование легкоудаляемых защитных групп. В разработанном синтезе в качестве ключевых соединений выступают защищенные гликозиды индола, полученные «индолин-индольным» методом [15]. Последующее взаимодействие гликозидов с оксалилхлоридом и дальнейшая конденсация с индолилуксусной кислотой приводят к выделению N-гликозидов бис(индолил)фуран-2,5-диона, которые в результате фотохимического окисления образуют производные индоло[2,3-а]фурано[3,4-с]карбазола. Обработка последних водным аммиаком в диметилформамиде дает возможность получить незащищенные гликозиды

индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов с различными заместителями в агликоне, а также разными углеводными остатками для сопоставления биологических свойств модифицированных соединений и выявления среди них наиболее активных [16].

Цель исследования – изучить противоопухолевую активность 12 соединений в ряду N-гликозидов индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов и по результатам скрининга провести анализ связи «структура – активность».

Материалы и методы

Лабораторные животные. В работе использовали самцов и самок мышей линий C57Bl/6j, DBA/2 (доноры опухолевого материала) и гибридов 1-го поколения BDF1 (DBA/2 × C₅₇Bl/6j) в возрасте 1,5–2 мес с начальной массой 19–23 г. Мышей получали из разведения в отделе лабораторных животных НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Перед лечением грызунов распределяли по группам. В контрольной группе было 10–12 мышей, в опытных группах – по 6–8 животных.

Модели опухолевого роста. Исследования выполнены на солидных моделях опухолевого роста мышей: эпидермоидной карциноме легкого Lewis (LLC) и меланоме B16. В опытах использованы 2–10-й пассажи *in vivo*. Сольидные формы LLC и B16 перевивали лабораторным животным по стандартным методикам [17]. При перевивке инокуляция опухолевых клеток проводилась подкожно в правую подмышечную область каждой мыши BDF1 по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1 : 10 (5 × 10⁶ клеток). Лечение начинали через 48 ч после перевивки.

Исследуемые соединения. Используемые в работе соединения ЛХС нерастворимы в воде (рис. 3, табл. 1). Их растворяли в диметилсульфоксиде и разводили физиологическим раствором до 10 % концентрации диметилсульфоксида. Испытание проводили по схеме, применяемой для первичного исследования потенциальных противоопухолевых препаратов

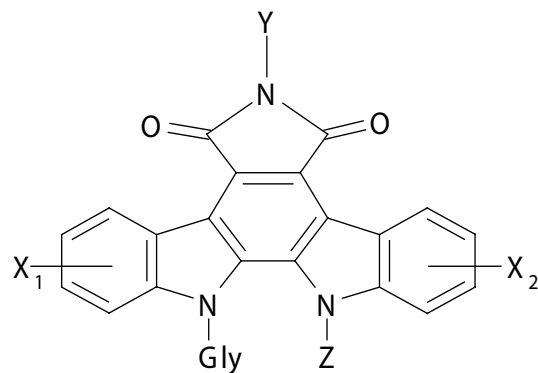


Рис. 3. Общая формула производных индолокарбазола
Fig. 3. General formula of indolocarbazole derivatives

Таблица 1. Представленные к изучению N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов

Table 1. N-glycosides of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazoles presented for the study

Название соединения Compound name	X, Y, Z	Gly – углеводный остаток Gly-carbohydrate residue	Шифр соединения Compound code
6-амино-12-(α -L-арабино-пиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 6-amino-12-(α -L-arabino-pyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - NH_2,$ $Z - H$	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1208 LCS-1208
6-[2-морфолиноэтил]-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 6-[2-morpholinethyl]-12-(α -L-arabinopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - CH_2CH_2N(CH_2)_4,$ $Z - H$	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1054 LCS-1054
13-метил-12-(α -L-арабинопиранозил)9-бром-индоло [2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 13-methyl-12-(α -L-arabino-pyranosil)9-bromo indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 - Br, X_2 - H,$ $Y - H,$ $Z - CH_3$	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1007 LCS-1007
12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 12-(α -L-arabinopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - H,$ $Z - H$	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1006 LCS-1006
6-(ацетилами́до)-12-(α -L-арабинопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 6-(acetylamido)-12-(α -L-arabinopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - NHCOCH_2CH_3,$ $Z - H$	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1254 LCS-1254
6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 6-(2-diethylaminoethyl)-12-(β -D-xylopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - CH_2CH_2N(C_2H_5)_2,$ $Z - H$	Ксилоза Xylose	ЛХС-1040 LCS-1040
13-метил-12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 13-methyl-12-(β -D-xylopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - H,$ $Z - CH_3$	Ксилоза Xylose	ЛХС-976 LCS-976
12-(β -D-ксилопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 12-(β -D-xylopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - H,$ $Z - H$	Ксилоза Xylose	ЛХС-983 LCS-983
6-(2-диэтиламиноэтил)-12-(β -D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 6-(2-diethylaminoethyl)-12-(β -D-galactopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - CH_2CH_2N(C_2H_5)_2,$ $Z - H$	Галактоза Galactose	ЛХС-1098 LCS-1098
12-(β -D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 12-(β -D-galactopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - H,$ $Z - H$	Галактоза Galactose	ЛХС-999 LCS-999
6-цианоэтиламино-12-(β -D-галактопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 6-cyanoethylamino-12-(β -D-galactopyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - NHCH_2CH_2CN,$ $Z - H$	Галактоза Galactose	ЛХС-1264 LCS-1264
12-(β -D-рибопиранозил)индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дион 12-(β -D-ribo-pyranosil)indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione	$X_1 = X_2 - H,$ $Y - H,$ $Z - H$	Рибоза Ribose	ЛХС-985 LCS-985

в широком диапазоне доз от 5 до 175 мг/кг в соответствующих концентрациях от 0,5 до 10 мг/мл при ежедневном внутривенном введении в течение 5 дней.

Оценка результатов. Противоопухолевый эффект соединений ЛХС оценивали по торможению роста опухолей и вычисляли по формуле:

$$TPO = (V_k - V_0) / V_k \times 100,$$

где TPO – торможение роста опухолей (%); V_k и V_0 – средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах, который для каждой солидной опухоли определялся как произведение размеров 3 перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей LLC и В16 проводили на разных сроках после окончания лечения [18].

Показатели эффективности изучаемых соединений определяли в сравнении с контрольными группами животных без лечения.

При сравнительном исследовании связи «структура – активность» эффективными считали дозы соединений ЛХС, вызывающие торможение роста опухолей на 50 % после окончания лечения.

Оценка результатов. Статистический анализ данных проводили с использованием компьютерной

программы STATISTICA 6.0. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований

Проведен анализ соединений ЛХС, одинаковых по структуре агликона и отличающихся углеводными (гликозидными) остатками, и соединений ЛХС, модифицированных по агликону, но с одинаковыми углеводными остатками.

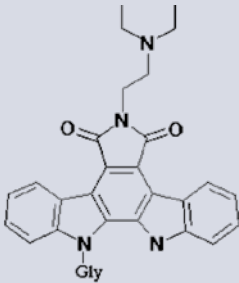
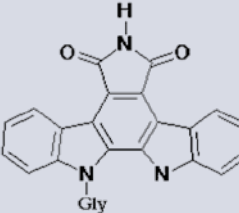
В табл. 2 представлены эффективные дозы соединений ЛХС, подавляющие рост LLC и В16 на 50 %. Результаты скрининга позволили оценить противоопухолевое действие соединений ЛХС и провести анализ связи «структура – активность».

На моделях LLC и В16 соединения галактопиранозил ЛХС-1098 и ксилопиранозил ЛХС-1040 с одинаковым агликоном (2-диэтиламиноэтильная группа по имидному азоту) продемонстрировали эффективность в одинаковых суммарных дозах 125 мг/кг.

Изменения в структуре агликона (NH-группа в верхнем гетероцикле) приводили к изменениям противоопухолевых свойств галактопиранозила ЛХС-999, который в дозе 500 мг/кг был активен только на модели LLC, а ксилопиранозил ЛХС-983

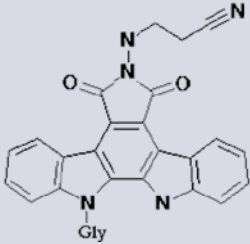
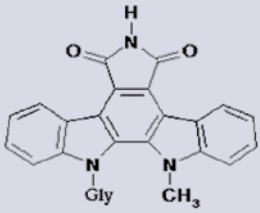
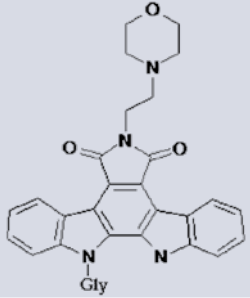
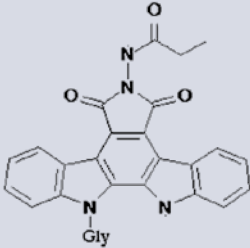
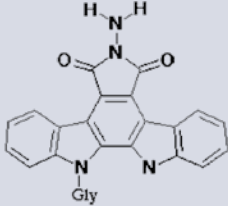
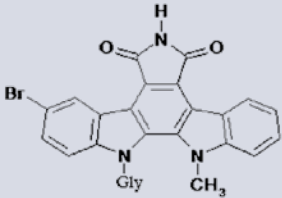
Таблица 2. Исследование связи «структура–активность» производных индолокарбазолов на солидных моделях опухолей мышей

Table 2. Association between structure and activity of indolocarbazole derivatives in solid murine tumors

Структура агликона Aglycone structure	Углеводный остаток, gly Carbohydrate residue, gly	Шифр соединения Compound code	Опухолевые модели мышей Model murine tumor	Суммарная доза*, мг/кг Total dose, mg/kg
	Галактоза Galactose	ЛХС-1098 LCS-1098	LLC	125
			В16	125
	Ксилоза Xylose	ЛХС-1040 LCS-1040	LLC	125
			В16	125
	Галактоза Galactose	ЛХС-999 LCS-999	LLC	500
			В16	б/эф** n/ef**
	Ксилоза Xylose	ЛХС-983 LCS-983	LLC	б/эф** n/ef**
			В16	50
	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1006 LCS-1006	LLC	300
			В16	300
Рибоза Ribose	ЛХС-985 LCS-985	LLC	125	
		В16	125	

Окончание табл. 2

End of table 2

Структура агликона Aglycone structure	Углеводный остаток, gly Carbohydrate residue, gly	Шифр соединения Compound code	Опухолевые модели мышей Model murine tumor	Суммарная доза*, мг/кг Total dose, mg/kg
	Галактоза Galactose	ЛХС-1264 LCS-1264	LLC	б/эф** n/ef**
			B16	250
	Ксилоза Xylose	ЛХС-976 LCS-976	LLC	125
			B16	125
		ЛХС-1054 LCS-1054	LLC	375
			B16	375
	Арабиноза Arabinose	ЛХС-1254 LCS-1254	LLC	б/эф** n/ef**
			B16	150
		ЛХС-1208 LCS-1208	LLC	125
			B16	125
		ЛХС-1007 LCS-1007	LLC	200
			B16	200

*Эффективная доза, подавляющая рост опухоли на 50 %, **б/эф – без терапевтического эффекта во всех исследуемых дозах.

*Effective dose reducing tumor growth by 50 %, **n/ef – no therapeutic effect in all studied doses.

в дозе 50 мг/кг проявил эффективность только в отношении В16.

При сравнении противоопухолевых свойств соединений ЛХС, имеющих одинаковый углеводный остаток (галактозу), но модифицированных по агликону галактопиранозилов ЛХС-1098 (с 2-диэтиламиноэтильной группой в агликоне), ЛХС-999 (с NH-группой в агликоне) и ЛХС-1264 (с цианоэтиламиногруппой в агликоне) активность на солидных моделях LLC и В16 показал только ЛХС-1098. Полученные результаты свидетельствуют о том, что модификации в структуре агликона ведут к изменениям противоопухолевых свойств рассмотренных соединений [10, 19].

Анализируя данные о противоопухолевом действии ксилопиранозилов ЛХС-1040, ЛХС-976 и ЛХС-983, которые также имеют одинаковый гликозидный остаток –ксилозу и отличаются структурой агликона, отмечено, что на эффективность лечения LLC и В16 влияет наличие 2-диэтиламиноэтильной группы у имидного азота в агликоне ЛХС-1040 и CH_3 -группы в индоле ЛХС-976. Отсутствие таковых групп в агликоне ЛХС-983 не приводило к противоопухолевому эффекту на LLC. Значит, на противоопухолевые свойства соединений, имеющих одинаковые гликозидные остатки, влияют заместители в агликоне.

Следующую группу, представленную к рассмотрению связи «структура – активность», составили производные индолюкарбазолов с одинаковым агликоном, но модифицированные по гликозидному остатку: галактопиранозил ЛХС-999, ксилопиранозил ЛХС-983, арабинопиранозил ЛХС-1006 и рибопиранозил ЛХС-985. Установлено, что противоопухолевый эффект соединений аналогичной структуры зависит от природы гликозидного остатка [10, 16]. Так, при исследовании противоопухолевого действия соединений на LLC и В16 активность показали ЛХС-1006 и ЛХС-985. Отсутствие терапевтического эффекта в отношении LLC наблюдали у ЛХС-983. Соединение ЛХС-999 было неэффективным на меланоме В16.

При изучении связи «структура–активность» было продолжено сравнение противоопухолевых свойств соединений ЛХС-1006, ЛХС-1054, ЛХС-1254, ЛХС-1208 и ЛХС-1007, содержащих в качестве гликозидного остатка арабинозу и отличающихся только структурой агликона. Воздействие на LLC и В16 показали все соединения, кроме ЛХС-1254 (с ацетиламидогруппой в агликоне), которое проявило активность только в отношении В16. Следовательно, противоопухолевые свойства индолюкарбазолов, имеющих одинаковый гликозидный остаток, зависят от различных заместителей в структуре их агликона.

Авторы многочисленных исследовательских работ установили, что верхний гетероцикл отвечает за связывание индолюкарбазолов с топоизомеразами, а углеводный остаток обеспечивает ковалентную связь

с ДНК. Также отмечено, что при модификации углеводной части молекулы меняется не только аффинность к ДНК, но и способность к ингибированию топоизомеразы I [3, 10, 12–14]. Это положение подтверждают результаты данного исследования. То есть, замена атомов в верхнем гетероцикле по имидному азоту влияет на изменение противоопухолевой активности производных индолюкарбазолов с различными и одинаковыми углеводными остатками. Так, арабинопиранозил ЛХС-1254 с ацетиламидогруппой в верхнем гетероцикле и ксилопиранозил ЛХС-983 с водородом у имидного азота проявили активность только в отношении В16. Галактопиранозилы ЛХС-999 с NH-группой в верхнем гетероцикле и ЛХС-1264 с цианоэтиламиногруппой оказались неэффективными на моделях В16 и LLC соответственно.

В ходе анализа связи «структура–активность» из рассмотренных 12 N-гликозидов индолю[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов активными на моделях LLC и В16 оказались 8 производных.

Заключение

Разнообразие модификаций индолюкарбазолов позволило выявить зависимость их противоопухолевых свойств от структуры и агликона, и гликозидного остатка. Однако для определения четкой взаимосвязи «структура–активность» необходимо проведение скрининга с большим количеством производных индолюкарбазолов, объединенных в определенные модификационные группы.

Результаты настоящего исследования показали, что модификации в структуре агликона приводят к изменениям противоопухолевых свойств индолюкарбазолов, а именно:

- замена атомов в верхнем гетероцикле оказывает влияние на противоопухолевую активность соединений ЛХС с разными гликозидными остатками;
- противоопухолевый эффект соединений ЛХС с одинаковым агликоном, но модифицированных по гликозидному остатку, зависит от природы гликозидного остатка;
- противоопухолевые свойства соединений ЛХС, имеющих одинаковый гликозидный остаток, зависят от различных заместителей в структуре агликона.

Экспериментально-практический материал, полученный в ходе анализа связи «структура – активность» индолюкарбазолов, открывает возможности рациональной разработки из этого класса соединений новых противоопухолевых агентов. Сформулированные положения о модификационных особенностях в структуре производных индолюкарбазолов могут быть использованы для создания более активных соединений с высокой избирательностью действия.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Онкология: справочник практического врача. Под ред. И.В. Поддубной. М.: МЕДпресс-информ., 2009. 768 с. [Oncology: Reference practitioner. Edn. I.V. Poddubnaya. M.: MEDpress-inform., 2009. 768 p. (In Russ.)].
2. Семенов А.А. Природные противоопухолевые соединения (структура и механизм действия). Новосибирск: Наука, 1979. 222 с. [Natural antitumor compounds (structure and mechanism of action). Novosibirsk: Nauka, 1979. 222 p. (In Russ.)].
3. Bailly C. Topoisomerase I poisons and suppressors as anticancer drugs. *Curr Med Chem* 2000;7(1):39–58.
4. Pereira E.R., Belin L., Sancelme M. et al. Structure-activity relationships in a series of substituted indolocarbazoles: topoisomerase I and protein kinase C inhibition and antitumoral and antimicrobial properties. *J Med Chem* 1996;39(22):4471–7.
5. Pindur U., Kim Y.S., Mehrabani F. Advances in indolo[2,3-a]carbazole chemistry: design synthesis of protein kinase C and topoisomerase I inhibitors. *Curr Med Chem* 1999;6(1):29–69.
6. Deslandes S., Chassaing S., Delfourme E. Marine pyrrolocarbazoles and analogues: synthesis and kinase inhibition. *Mar Drugs* 2009;7(4):754–86. DOI: 10.3390/md7040754.
7. Omura S., Ywai Y., Hirano A. et al. A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot* 1977;30(4):275–82.
8. Nettleton D.E., Doyle T.W., Krishnan B. et al. Isolation and structure of rebeccamycin – a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligena*. *Tetrahedron Lett* 1985;26:4011–4. DOI.org/10.1016/S0040-4039(00)89280-1.
9. Wada Y., Nagasaki H., Tokuda M. et al. Synthesis of N-protected staurosporinones. *J Org Chem* 2007;72(6): 2008–14. DOI: 10.1021/jo062184r.
10. Prudhomme M. Biological Targets of antitumor indolocarbazoles bearing a sugar moiety. *Curr Med Chem Anti-Cancer Agents* 2004;4(6):509–21.
11. Gescher A. Analogs of staurosporine: potential anticancer drugs? *Gen Pharmacol* 1998;31:721–8.
12. Zembower D.E., Zhang H., Lineswala J.P. et al. Indolocarbazole poisons of human topoisomerase I: regioisomeric analogues of ED-110. *Bioorg Med Chem* 1999;9:145–50.
13. Urasaki Y., Laco G., Takebayashi Y. et al. Use of camptothecin-resistant mammalian cell lines to evaluate the role of topoisomerase I in the antiproliferative activity of the indolocarbazole, NB-506 and its topoisomerase I binding site. *Cancer Res* 2001;61(2):504–8.
14. 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 Lett* 1999;9(9):1219–24.
15. Preobrazhenskaya M.N., Korbukh I.A. The synthesis and reactions of pyrrole, pyrazole, triazole, indole, indazole and benzotriazole nucleosides and nucleotides. In: *Chemistry of Nucleosides and Nucleotides*. Ch. 3. Ed. L.B. Townsend. New York, London: Plenum Press, 1993. Pp. 1–105.
16. Мельник С.Я. Синтез и изучение гликозидов, производных бисиндола и родственных индоло[2,3-а]карбазолов. Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышниковой Экспериментальная онкология на рубеже веков. М., 2003. С. 281–93. [Melnik S.Ya. Synthesis and study of glycosides, bisindole derivatives and related indolo[2,3-a]carbazoles. Ed. Davydov M.I., Baryshnikov A.Yu. Experimental oncology at the turn of the century. Moscow, 2003. P. 281–93 (In Russ.)].
17. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). М.: Медицина, 1980. 295 с. [Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. Z.P. Sofina, A.B. Syrkin (USSR), A. Goldin, A. Klein (USA), M.: Medicine, 1980:296 p. (In Russ.)].
18. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и К, 2012;39:642–57. [Treshchalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for preclinical study of the antitumor activity of drugs. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Ed. A.N. Mironov, N.D. Bunyatyan, A.N. Vasil'yev et al. M.: Grief and K, 2012;39:642–57 (In Russ.)].
19. Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Сравнение противоопухолевой активности производных индолокарбазола с углеводными остатками галактозой, арабинозой и заместителями по имидному атому азота. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(s1):23. [Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Ektova L.V. et al. Comparison of the antitumor activity of indolocarbazole derivatives with carbohydrate residues galactose, arabinose and substituents on the imide nitrogen atom. *Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2017;16(S):23 (In Russ.)].

ORCID авторов/ ORCID of authors

В.С. Покровский / V.S. Pokrovsky: <https://orcid.org/0000-0003-4006-9320>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 28.02.2019. **Принята в печать:** 12.04.2019.

Article received: 28.02.2019. **Accepted for publication:** 12.04.2019.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА RYQLHPYR НА КЛЕТКАХ РАКА ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Н. П. Акентьева^{1,2}, С. С. Шушанов³

¹ФГБУН «Институт проблем химической физики РАН»; Россия, 142432 Черноголовка, пр-т акад. Семенова, 1;
²Научно-образовательный центр «Медицинская химия» ГОУ ВО МО «Московский государственный областной университет»;
Россия, 142432 Черноголовка, пр-т акад. Семенова, 1;
³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Наталья Павловна Акентьева на aken@icp.ac.ru

Введение. RHAMM (опосредованный гиалуронатом рецептор подвижности) избыточно экспрессируется во многих типах рака человека, а повышенный синтез RHAMM обычно коррелирует с плохим прогностическим фактором. В ходе исследования мы синтезировали пептид RYQLHPYR, модулирующий активность RHAMM, и рассмотрели терапевтический потенциал этого RHAMM-таргет-пептида как противоопухолевого реагента.

Цель исследования — изучение влияния синтетического пептида RYQLHPYR на жизнеспособность, апоптоз, некроз, активность каспаз-3/7 и инвазивность клеток рака предстательной железы.

Материалы и методы. Пептид RYQLHPYR был получен твердофазным синтезом. Изучались клетки рака предстательной железы человека (PC3 m-LN₄), мышинные эмбриональные фибробласты (неинвазивные, нормальные клетки) и мышинные эмбриональные фибробласты (RHAMM^{-/-}). Для количественной оценки влияния пептида на апоптоз и некроз клеток использовали метод ELISA^{PLUS}. Определение активности каспаз-3/7 проводили колориметрическим методом. Антиметастатическое действие пептида *in vitro* оценивалось по инвазивности клеток методом количественного анализа площади деградации флуоресцентного желатина.

Результаты. Установлено, что пептид RYQLHPYR ингибировал рост опухолевых клеток PC3 m-LN4 при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) через 24 ч на ~80 %. Показано, что пептид стимулировал повышение уровня апоптоза в раковых клетках примерно в 10 раз и ускорял некротическую гибель опухолевых клеток в 2,5 раза. В ходе исследований выявлено, что пептид повышал в 2 раза активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках. В то же время показано, что RHAMM-таргет-пептид не оказывал значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток и RHAMM^{-/-}. Установлено, что пептид ингибировал инвазивность опухолевых клеток на ~99,86 % при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М).

Выводы. Полученные результаты указывают, что пептид RYQLHPYR обладает противоопухолевой активностью и, следовательно, имеет терапевтический потенциал для лечения рака предстательной железы.

Ключевые слова: пептиды, апоптоз, некроз, рак предстательной железы, инвазивность

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-40-50

STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY OF SYNTHETIC PEPTIDE RYQLHPYR ON THE PROSTATE CANCER CELLS

N. P. Akentjeva^{1,2}, S. S. Shushanov³

¹Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences; 1 Prospect Akademika Semenova, Chernogolovka 142432, Russia;

²Scientific-educational center "Medical chemistry" of the Moscow State Regional University;

1 Prospect Akademika Semenova, Chernogolovka 142432, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. The RHAMM (hyaluronan mediated mobility receptor) is overexpressed in many types of human cancer and increased synthesis of the RHAMM usually correlates with a poor prognostic factor. In this paper, we synthesized the peptide-RYQLHPYR modulating the activity of the RHAMM and examined the therapeutic potential of this RHAMM-targeting peptide as an antitumor agent.

Objective. Study the effect of the synthetic peptide RYQLHPYR on viability, apoptosis, necrosis, caspase-3/7 activity, and invasion of prostate cancer cells.

Materials and methods. The peptide RYQLHPYR was prepared by solid phase synthesis. Human prostate cancer cells (PC3 m-LN₄), murine embryonic fibroblasts and murine embryonic fibroblasts (RHAMM^{-/-}). To quantify the effect of the peptide on apoptosis and cell necrosis, ELISA^{PLUS} was used. The activity of caspase-3/7 was determined by the colorimetric method. Evaluation of the anti-metastatic effect of the peptide *in vitro* was evaluated by invasion of cells by quantitative analysis of the area of degradation of fluorescent gelatin.

Results. It was found that the peptide RYQLHPYR inhibited the growth of tumor cells PC3 m-LN4 at a concentration of 10 µg/ml (2×10^{-7} M) after 24 h by ~80 %. It was shown that the peptide stimulated the level of apoptosis in cancer cells, approximately 10-fold. It was found that the peptide increased the necrotic death of tumor cells by 2.5 times. During the research it was revealed that the peptide increased the caspase-3/7 activity in tumor cells by 2 times. At the same time, it was shown that RHAMM-targeting peptide had no significant effect on apoptosis and necrosis of normal cells (fibroblasts) and fibroblasts (RHAMM^{-/-}). It was found that the peptide inhibited invasion of tumor cells by ~99.86 % at a concentration of 10 µg/ml (2×10^{-7} M).

Conclusions. The obtained results indicate that the peptide RYQLHPYR has antitumor activity and, therefore, has a therapeutic potential for the treatment of prostate cancer.

Key words: peptides, apoptosis, necrosis, prostate cancer, invasion

Введение

Частота возникновения онкологических заболеваний в мире растет в геометрической прогрессии. Согласно статистике, к 2020 г. смертность от рака составит 40 % общего числа смертей [1]. Рак предстательной железы (РПЖ) остается 2-й ведущей причиной гибели в мире (после рака легких). Кроме того, лечение онкологических заболеваний является крайне дорогостоящим. Несмотря на определенные успехи в лечении, основная проблема в онкологии заключается в отсутствии селективности противоопухолевых препаратов. Поэтому разработка механизмов таргетной терапии раковых заболеваний – самая актуальная и активно развивающаяся область биомедицины.

Таргетная, адресная химиотерапия позволяет избирательно и эффективно локализовать препарат на молекулярных мишенях в клетке (например, на рецепторах), в то же время ограничить его доступ к нормальной клетке и таким образом получить максимальный терапевтический эффект, снизив токсичность препарата. На протяжении последних лет использование пептидов как перспективных терапевтических агентов для лечения онкологических заболеваний, стремительно растет. Терапевтические пептиды завоевывают все большую популярность для применения в различных аспектах медицины, в том числе в виде противоопухолевых вакцин, в составе антимикробной терапии, для доставки нуклеиновых кислот [2–9]. Недавно установлено, что антимикробный пептид низин обладает противоопухолевой активностью, индуцирует апоптоз и подавляет пролиферацию клеток астроцитомы человека (SW1088) [10].

В ходе исследований было выявлено, что пептиды обладают разными физиологическими активностями и эффектами воздействия на опухолевые клетки. Многие природные и синтетические проапоптотические пептиды индуцируют ферменты апоптоза и вызывают гибель клеток. Например, катионный антимикробный пептид, выделенный из бразильского тарантула, обладает не только бактериостатическими свойствами, но и проявляет противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo* [11]. Так называемые клеточно-проникающие пептиды усиливают эффект химиотерапевтических препаратов, в то же время мембранолитические, катионные антимикробные пеп-

тиды разрушают мембраны раковых клеток [12–16]. Недавно показано, что пептиды, выделенные из австралийской лягушки, ингибируют деление клеток рака молочной железы [17]. Химерные пептиды проявляют противоопухолевую активность и понижают множественную лекарственную устойчивость опухолей [18]. Известно, что клеточно-проникающий пептид dNP2 может ускорять накопление противоопухолевых препаратов в клетке и тем самым повышать эффективность лечения рака [19].

Под воздействием различных неблагоприятных факторов нормальная клетка может перерождаться в раковую, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии рецепторов, белков или ферментов, являющихся молекулярными мишенями опухолевой клетки. Существует категория противоопухолевых пептидов (пептидных антагонистов), которые преимущественно связываются с известным рецептором и модулируют его активность, активируют или блокируют его функции и тем самым влияют на процессы развития и прогрессии рака [20–26]. Недавние исследования показали, что белок 2 (Grb²), связанный с рецептором фактора роста, представляет собой адаптер, который в значительной степени вовлечен в опухолевые новообразования, а блокирование этого белка пептидами приводит к подавлению роста опухоли [27].

В последнее время эфрин-рецепторы киназной системы привлекают все большее внимание как основной класс потенциальных мишеней для лекарств [28]. Были идентифицированы пептиды, которые специфично связываются с эфрин-рецепторами с высоким сродством [29]. Эти пептиды, как правило, являются антагонистами, которые ингибируют связывание эфрина и передачу сигналов на эфрин-рецептор, но некоторые являются агонистами, имитирующими активацию эфрин-рецептора [30]. Помимо модуляции функции эфрин-рецептора такие пептиды могут служить в качестве диагностических и терапевтических средств, а также для доставки различных наночастиц в опухоли и другие пораженные ткани, представляющие мишени эфрин-рецепторов [31, 32]. Пептидные антагонисты имеют большие перспективы, потому что их основной механизм действия нацелен на конкретную молекулярную мишень опухолевых клеток, что приводит к их гибели.

RHAMM/НММР-онкорцептор (опосредованный гиалуронатом рецептор подвижности) является такой молекулярной мишенью для диагностических, прогностических и терапевтических целей в области лечения онкологических заболеваний. RHAMM синтезируется в избытке в метастатических агрессивных опухолевых клетках по сравнению с нормальными клетками. В ряде работ было показано, что повышенное содержание RHAMM наблюдается в клетках рака молочной и предстательной желез, толстой кишки, в солидных опухолях и в клетках рака крови, при миелоидном лейкозе, множественной миеломе, и обычно повышенный синтез RHAMM коррелирует с плохим прогнозом [33–36].

Идея нашей работы состоит в том, чтобы с помощью пептида-антагониста ингибировать активность RHAMM-онкорцептора, понизить выживаемость, инвазивность раковых клеток и тем самым заблокировать развитие опухоли на самой ранней стадии. Последовательности пептидов, обладающих высоким сродством к RHAMM, были идентифицированы методом биоинформатики и создания библиотеки пептидов [37]. Такие RHAMM-пептиды-антагонисты, специфично взаимодействующие с RHAMM, были охарактеризованы ранее [37, 38]. Показано, что RHAMM-пептиды специфично связываются с RHAMM с высоким сродством (константа связывания около 30 нМ), блокируют центр связывания гиалуроновой кислоты (физиологического лиганда RHAMM), легко проходят через цитоплазматическую мембрану клеток [37]. Пептиды-антагонисты, способные блокировать центр связывания гиалуроновой кислоты на RHAMM, представляют собой новую стратегию раковой терапии, направленную на индукцию процессов апоптоза, некроза и ингибирование инвазивности опухолевых клеток. В настоящее время RHAMM-таргет-пептиды известны как биомаркеры для ранней диагностики рака яичников, предстательной и молочной желез [38–40]. Кроме того, показано, что RHAMM-таргет-пептиды индуцируют апоптоз и некроз клеток рака молочной железы, а также ингибируют их инвазивность [41, 42].

Поиск новых RHAMM-таргет-пептидов, селективно блокирующих RHAMM и его сигнальные пути, является одним из перспективных подходов для лечения РПЖ. Однако в настоящее время физиологический эффект RHAMM-таргет-пептидов на апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток предстательной железы изучен не полностью. Поэтому в данной работе мы синтезировали пептид RYQLHPYR в соответствии с методом, описанным ранее, и изучили его терапевтический потенциал [37, 38].

Цель исследования – изучение противоопухолевой активности пептида RYQLHPYR на культуре раковых клеток предстательной железы. Задачи включали

такой важный аспект, как изучение влияния пептида RYQLHPYR на жизнеспособность, апоптоз, некроз и инвазивность опухолевых клеток PC3 m-LN4.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. В работе использовали ростовую среду DMEM (низкое содержание глюкозы (–1 г/л), L-глутамин, 25 мМ HEPES, пируват натрия, Biowest, Франция), эмбриональную бычью сыворотку (FBS, ультранизкое содержание эндотоксина, Biowest, Франция), трипсин 0,25 % – ЭДТА 0,02 % в HBSS (Biowest, Франция), гентамицин (10 mg/ml, Biowest, Франция), QCMTM Gelatin Invadopodia Assay (red) набор (Millipore, США), Fluoro-Gel II (Millipore, США). В работе была использована пластиковая посуда (чашки Петри, одноразовые пипетки) фирмы BD Falcon (США).

Линии клеток. Для исследований *in vitro* были использованы 3 линии клеток: адгезивные клетки карциномы предстательной железы человека (PC3 m-LN4), характеризующиеся повышенной экспрессией RHAMM, мышечные эмбриональные фибробласты (MEF) – неинвазивные, нормальные клетки и эмбриональные фибробласты мыши (RHAMM^{-/-}). Клеточные линии фибробластов RHAMM^{-/-} были получены, как описано ранее [43]. Клеточные линии PC3 m-LN4 и MEF получены из ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Способ культивирования: адгезивный в среде DMEM с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой при 37 °С, 5 % CO₂ и 95 % влажности.

Синтез пептида. Пептид RYQLHPYR был получен твердофазным методом, как описано ранее [37, 38, 44].

Оценка жизнеспособности клеток флуоресцентным методом (Alamar Blue). Для анализа действия пептида на жизнеспособность клеток использовали метод Alamar Blue® Cell Viability Assay (Thermo Fisher Scientific, США). Данный метод позволяет определить активность митохондриальных никотинамидадениндинуклеотид- (НАДН) – дегидрогеназ живых клеток, которые расщепляют НАДН на НАД и H⁺, и образующийся H⁺ восстанавливает нефлуоресцентный краситель резазурин в сильно флуоресцентный резозулин [45]. PC3 m-LN4, MEF-клетки засеивали в 96-луночные планшеты по 1 тыс. клеток в лунке в 200 мкл ростовой среды, клетки выращивали в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂ и 95 % влажности. Затем в лунки добавляли пептид (до конечной концентрации 10 мкг/мл, 2 × 10⁻⁷ М), а в контрольные добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера (0,01 М, pH = 7,2) и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. На каждую дозу препарата и контроль использовали не менее 3 лунок. Затем добавляли Alamar Blue-реагент (10 мкл, Thermo Fisher Scientific, USA) непосредственно к клеткам в ростовую

среду и проводили измерения через 24 ч. Интенсивность флуоресценции измеряли при 570/590 нм, используя спектрофлуориметр Wallac 1420 (Perkin Elmer). Жизнеспособность клеток при действии пептида оценивалась сравнением флуоресценции в экспериментальных лунках с флуоресценцией в контрольных. Все измерения дублировались 3 раза, и данные представлены как средние от 3 повторных экспериментов.

Оценка влияния пептида на апоптоз и некроз опухлевых клеток. Клетки РПЖ РС3 m-LN4, MEF, RHAMM^{-/-} высевали на плоскодонные 96-луночные планшеты при плотности 1 тыс. клеток в лунке, клетки выращивали в течение 24 ч в инкубаторе при 37 °С, 5 % CO₂ и 95 % влажности. Затем в лунки добавляли пептид (до конечной концентрации 10 мкг/мл, 2×10^{-7} М), а в контрольные культуры добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. Для количественной оценки апоптоза и некроза клеток под действием пептида использовали иммуоферментный метод Cell Death ELISA^{PLUS} Kit (Roche Diagnostic, США). Индукцию апоптоза и некроза с помощью пептида определяли измерением гистоновых компонентов моно-, олигонуклеосом (гистоны H1, H2A, H3 и H4), являющихся индикаторами апоптоза и некроза [46, 47]. Оптическую плотность измеряли при 405/490 нм на спектрофлуориметре Wallac 1420 (Perkin Elmer). Все измерения дублировались 3 раза, данные представлены как средние от 3 повторных экспериментов.

Определение активности каспаз-3/7 колориметрическим методом. Клетки РПЖ человека РС3 m-LN4, MEF засеивали плотностью 1 тыс. клеток в лунке в 24-луночные платы и инкубировали 24 ч в ростовой среде DMEM (Multicell) с 10 % эмбриональной бычьей сывороткой. Затем пептид (конечная концентрация 2×10^{-7} М) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 ч при 37 °С. В контрольные культуры добавляли обычную ростовую среду, содержащую 10 % сыворотки. Для количественного измерения активности каспаз-3/7 был использован Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (Gen Script, США). Активацию каспаз-3/7 определяли измерением расщепления колориметрического субстрата, специфичного для каспаз-3/7, (DEVD-p-нитроанилида). Субстрат, DEVD-p-нитроанилид состоит из хромофора p-нитроанилида и синтетического тетрапептида, DEVD (Asp-Glu-Val-Asp), который и отщепляется каспазами-3/7. После расщепления субстрата каспазами 3/7 высвобождается окрашенный хромофор p-нитроанилин (pNA), который определяется спектрофотометрически [48]. Измерение оптической плотности каждой лунки проводилось с использованием многорядного счетчика Wallac 1420 (Perkin

Elmer) при 405 нм. Все измерения дублировались 3 раза, данные представлены как средние от 3 повторных экспериментов.

Метод деградации флуоресцентного желатина для исследования инвазивности клеток. Для изучения инвазивности клеток использовали QCMTM Gelatin Invadopodia Assay (Red) Kit (Millipore, США). Данный метод основан на быстром обнаружении деградации флуоресцентно-меченого желатина клетками [49, 50]. Эффект пептида на образование инвадоподий исследовали по его влиянию на степень деградации желатина. Поверхность покровного стекла вначале обрабатывали поли-L-лизином, затем – разбавленным раствором глутаральдегида, чтобы бифункционально «активировать» поверхность для дальнейшего связывания желатина. После этого стекло инкубировали с желатином, флуоресцентно-меченым с Су³, в результате чего образовывалась ковалентная связь между поли-L-лизином и желатином через реакционноспособные альдегидные (-CHO) группы. Затем стекло, покрытое желатином, подготавливали для культивирования клеток путем дезинфекции в 70 % этаноле и добавляли ростовую среду для гашения свободных альдегидов. Клетки высевали на стекла, покрытые желатином, при концентрации ~500 клеток на лунку, добавляли ростовую среду и выращивали при 37 °С в 5 % CO₂ в течение 24 ч. Для эксперимента по влиянию пептида на инвазивность клеток пептид (конечная концентрация 40 мкг/мл) добавляли к ростовой среде и инкубировали в течение 40 ч. После этого ростовую среду удаляли и клетки фиксировали в течение 30 мин при 37 °С формальдегидом (3,7 %). Для визуализации цитоскелетного актина и ядер клетки окрашивали флуоресцентно-меченым FITC-фаллоидином (2 мг/мл) и DAPI (1 мг/мл) соответственно, чтобы анализировать одновременно локализацию деградации с клеточными признаками. После окрашивания клетки фиксировали на покровном стекле с помощью Fluoro-Gel II и анализировали методом конфокальной микроскопии при 358, 494 и 550 нм. Конфокальные изображения получали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Fluoview FV-1000; Olympus) при увеличении $\times 20$ для количественного анализа. На конфокальных изображениях флуоресцентно-меченый желатин красного цвета (Су³), актин клеток имеет зеленую окраску (FITC-фаллоидин), ядра клеток – синие (DAPI), а область деградации желатина – черного цвета (флуоресценция отсутствует). Изображения снимали с помощью программы Fluoview Software (FV10-ASW version 01.07; Olympus). Количественный анализ изображений, подсчет числа и площади клеток, а также площади деградации желатина проводили, используя программу ImageJ software (NIH, USA). На изображениях, полученных с помощью

этой программы, ядра клеток и площадь черного цвета, а площадь деградации желатина белого цвета.

Для статистического анализа готовили 3 слайда на каждый тип обработки и снимали 5 изображений со слайда. Свыше 100 клеток анализировали в каждом образце, чтобы получить процент площади деградации желатина по отношению к общей площади. Данные представляются как средние от 3 повторных экспериментов.

Статистическая обработка данных. Статистическая обработка всех полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm с использованием метода анализа One-Way ANOVA. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Пептид RYQLHPYR ингибирует жизнеспособность клеток PC3 m-LN4

Мы изучали влияние пептида RYQLHPYR на жизнеспособность клеток РПЖ PC3 m-LN4, для которых характерна повышенная экспрессия RHAMM [51]. Чтобы понять, может ли пептид ингибировать рост раковых клеток, PC3 m-LN4 обрабатывались пептидом при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) в течение 24 ч. В качестве контроля мы использовали MEF, которые обрабатывали аналогично. Деление клеток анализировали с помощью резазурина (Alamar Blue-реагент), как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты показали, что пептид ингибировал жизнеспособность опухолевой клеточной культуры через 24 ч на ~80 %, однако не влиял на рост фибробластов мыши (рис. 1). Это свидетельствует о том, что пептид RYQLHPYR, связываясь с RHAMM, значительно ингибирует активность митохондриальных дегидрогеназ клетки, которые играют центральную роль в процессах клеточного дыхания и окислительного фосфорилирования, около 40 % протонного градиента для синтеза аденозинтрифосфата создается именно этим комплексом [52]. Таким образом, результаты показали, что RYQLHPYR-пептид обладает цитотоксическим действием за счет модуляции RHAMM.

Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеточных культур РПЖ значительно подавлялась низкими концентрациями пептида (2×10^{-7} М). Это указывает на то, что пептид является перспективным кандидатом в качестве противоопухолевого препарата.

Пептид RYQLHPYR индуцирует апоптоз и некроз раковых клеток предстательной железы

Известно, что реализация апоптоза может происходить в результате комбинирования 2 основных сигнальных путей — рецепторзависимого и митохондриального [53, 54]. Внешний сигнальный путь осуществляется через поверхностные рецепторы смерти

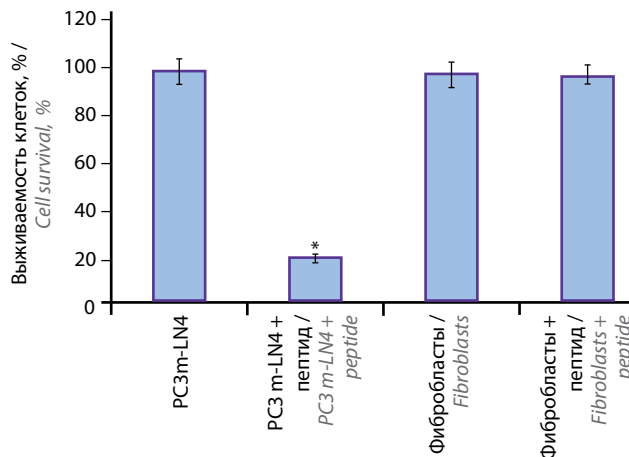


Рис. 1. Эффект пептида RYQLHPYR на жизнеспособность фибробластов и опухолевых клеток предстательной железы (PC3 m-LN4)
*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

Fig. 1. Effect of the RYQLHPYR peptide on viability of fibroblasts and prostate tumor cells (PC3 m-LN4)

*Significant differences at $p < 0.05$; $M \pm m$, $n = 3$

клетки, специально предназначенные для включения программы апоптоза [53, 55]. Такими рецепторами смерти являются рецепторы Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5 [53–58]. Сигнальный путь апоптоза индуцируется физиологическими факторами-индукторами апоптоза, такими как гормоны, ростовые факторы, цитокины и др. [59, 60]. Посредством рецепторов смерти могут быть активированы 3 иницирующие каспазы: 2, 8 и 10 [61]. В отличие от внешнего сигнального пути апоптоза, митохондриальный путь его активации индуцируется действием цитотоксических агентов, радиации, повреждением ДНК, глюкокортикоидов, изменением теломеров [54]. Внутренний, митохондриальный путь сопровождается активацией белка P53 и экспрессией генов, кодирующих белки семейств Bcl-2, Bax и Bid [54]. Эти белки вызывают пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, высвобождение цитохрома C, прокаспаз 2, 3, 7 и 9, белка AIF в цитоплазму, истощение митохондриального пула аденозинтрифосфата, что и приводит к апоптозу [62–65].

Поскольку мы показали, что жизнеспособность клеток PC3 m-LN4 значительно подавлялась пептидом, было важно классифицировать, какой тип гибели (апоптоз, некроз) наблюдается в клетках PC3 m-LN4. Анализ типа гибели клеток проводили методом ELISA, как описано в «Материалах и методах». Клетки, не обработанные пептидом, показали небольшой уровень апоптоза, поскольку каждая экспоненциально растущая клеточная культура содержит некоторое количество мертвых клеток (в норме приблизительно 3 %) вследствие спонтанной дифференциации и взросления клеточной линии. В то же время клетки, обработанные пептидом (концентрация

2×10^{-7} М), продемонстрировали высокий уровень апоптоза, а именно: пептид увеличивал апоптоз в опухолевых клетках приблизительно в 10 раз (см. таблицу). Эти результаты указывают на то, что RYQLHPYR-пептид и RHAMM вовлечены в апоптозные пути, которые индуцируют потерю энергии, и ингибирование работы мембранных насосов клетки [66].

Затем мы исследовали эффект пептида на некроз клеточной линии PC3 m-LN4. Наши результаты показали, что пептид стимулировал некротическую гибель опухолевых клеток приблизительно в 2,5 раза. Эти результаты свидетельствуют о том, что индукция апоптоза под действием пептида сопровождается последующим развитием некроза опухолевых клеток. Следует отметить, что в современной онкологии индукция некроза используется как один из методов лечения злокачественных опухолей. Для подтверждения специфичности действия пептида RYQLHPYR на опухолевые клетки мы изучали влияние его на апоптоз и некроз нормальных фибробластов и RHAMM^{-/-}. Результаты показали, что пептид не оказывал значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток. Как видно из таблицы, уровень апоптоза

в фибробластах был практически одинаковым до обработки пептидом и после (оптическая плотность 0,621 и 0,656 ед. соответственно). Установлено, что изначально уровень некроза в фибробластах был 2,324 ед., а после добавки пептида он составил 2,231 ед. Анализ данных показал, что наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза и некроза в контрольных и обработанных пептидом фибробластах не являются статистически значимыми. Это свидетельствует о том, что пептид не влияет на уровень апоптоза и некроза в фибробластах, потому что в них нет такого высокого уровня экспрессии RHAMM, который наблюдается в опухолевых клетках. В раковых клетках пептид связывается с RHAMM и таким образом индуцирует апоптоз и некроз через сигнальные пути рецептора.

Чтобы подтвердить участие RHAMM в апоптозе и некрозе, мы исследовали влияние пептида на апоптоз и некроз RHAMM^{-/-}, в которых отсутствует данный рецептор. Как видно из таблицы, пептид не влиял на уровни апоптоза и некроза в RHAMM^{-/-}. Наблюдаемые незначительные различия в уровне апоптоза (некроза) в контрольных фибробластах и обработанных пептидом не являются статистически значимыми. Эти данные указывают на то, что индукция апоптоза и некроза в опухолевых клетках под действием пептида RHAMM-опосредована.

Таким образом, результаты показали, что пептид RYQLHPYR селективно влияет на опухолевые клетки, не затрагивая жизнеспособность нормальных клеток, и его действие осуществляется через RHAMM. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными о специфичности действия RHAMM-таргет пептидов на опухолевые клетки молочной железы [41, 42].

Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7

Из литературы известно, что существует 2 основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный и через рецепторы апоптоза [67]. Оба пути приводят к активации каспаз и запуску каскада реакций, приводящих к гибели клетки. Митохондрии являются ключевым регулятором каспазного каскада и апоптоза, при этом наблюдаются выброс цитохрома С в цитоплазму, активация каспазы 9 и затем каспаз-3/7 [67].

Поскольку мы наблюдали цитостатический эффект и индукцию апоптоза (некроза) в опухолевых клетках под действием пептида, то исследовали влияние данного пептида на митохондриальный тип апоптоза. Активация каспаз 3/7 является основным индикатором митохондриального апоптоза, поэтому мы изучали эффект пептида на активность каспаз-3/7 в PC3 m-LN4-клетках. Фибробласты мыши использовали в качестве контрольных клеток.

Влияние пептида RYQLHPYR на апоптоз и некроз клеточной линии PC3 m-LN4, фибробластов и (RHAMM^{-/-}) клеток

Effect of the RYQLHPYR peptide on apoptosis and necrosis of the PC3 m-LN4, fibroblast and (RHAMM^{-/-}) cell lines

Типы клеток Cell type	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.) Apoptosis (absorbance at 405 nm, u.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.) Necrosis (absorbance at 405 nm, u.)
PC3 m-LN4	0,257	0,114
PC3 m-LN4 + пептид PC3 m-LN4 + peptide	2,213*	0,277*
Фибробласты Fibroblasts	0,621	2,324
Фибробласты + пептид Fibroblasts + peptide	0,656	2,231
Фибробласты (RHAMM ^{-/-}) Fibroblasts (RHAMM ^{-/-})	0,423	2,269
Фибробласты (RHAMM ^{-/-}) + пептид Fibroblasts (RHAMM ^{-/-}) + peptide	0,690	1,710

*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$.

*Significant differences at $p < 0.05$.

К клеткам добавляли пептид (2×10^{-7} М) и инкубировали в течение 24 ч. Затем активность каспаз-3/7 измеряли методом расщепления меченого субстрата DEVD-p-нитроанилида. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась примерно в 2 раза

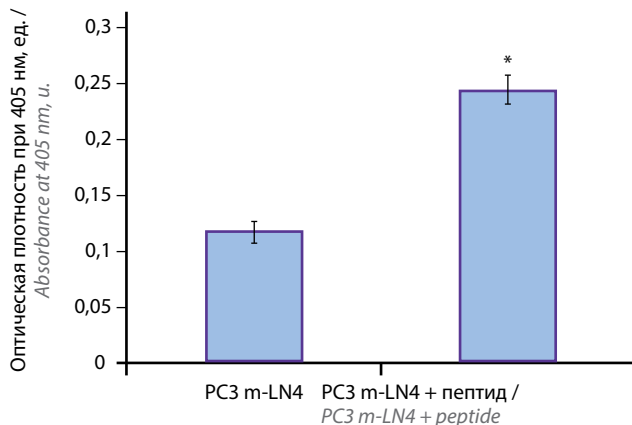


Рис. 2. Влияние пептида RYQLHPYR на активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках предстательной железы (PC3 m-LN4)

*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

Fig. 2. Effect of the RYQLHPYR peptide in caspase-3/7 activity in prostate tumor cells (PC3 m-LN4)

*Significant differences at $p < 0.05$; $M \pm m$, $n = 3$

в PC3 m-LN4-клетках, обработанных пептидом, по сравнению с необработанными (рис. 2). Пептид не оказывал влияния на активность каспаз в фибробластах. Эти данные подтверждают участие каспаз-3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках PC3 m-LN4, так как пептид значительно повышал активность каспаз-3/7.

Наши результаты показали, что под действием пептида наблюдается активация каспаз-3/7, что свидетельствует об индукции митохондриального пути апоптоза. Таким образом, RHAMM участвует в передаче сигналов в митохондриальный путь апоптоза.

Влияние пептида RYQLHPYR на инвазивность клеток РПЖ

Чтобы анализировать, может ли пептид ингибировать инвазивность клеток РПЖ, клетки высевали на Su^3 -флуоресцеин-желатиновые подложки, затем добавляли пептид или только ростовую среду (DMEM, контроль) и выращивали клетки в течение 40 ч. После фиксации и окраски клеток согласно протоколу, описанному в «Материалах и методах», снимали изображения и анализировали площадь деградации желатина клетками. На рис. 3а–ж представлены изображения клеток PC3 m-LN4 без обработки пептидом. Показано, что инвазивные клетки PC3 m-LN4

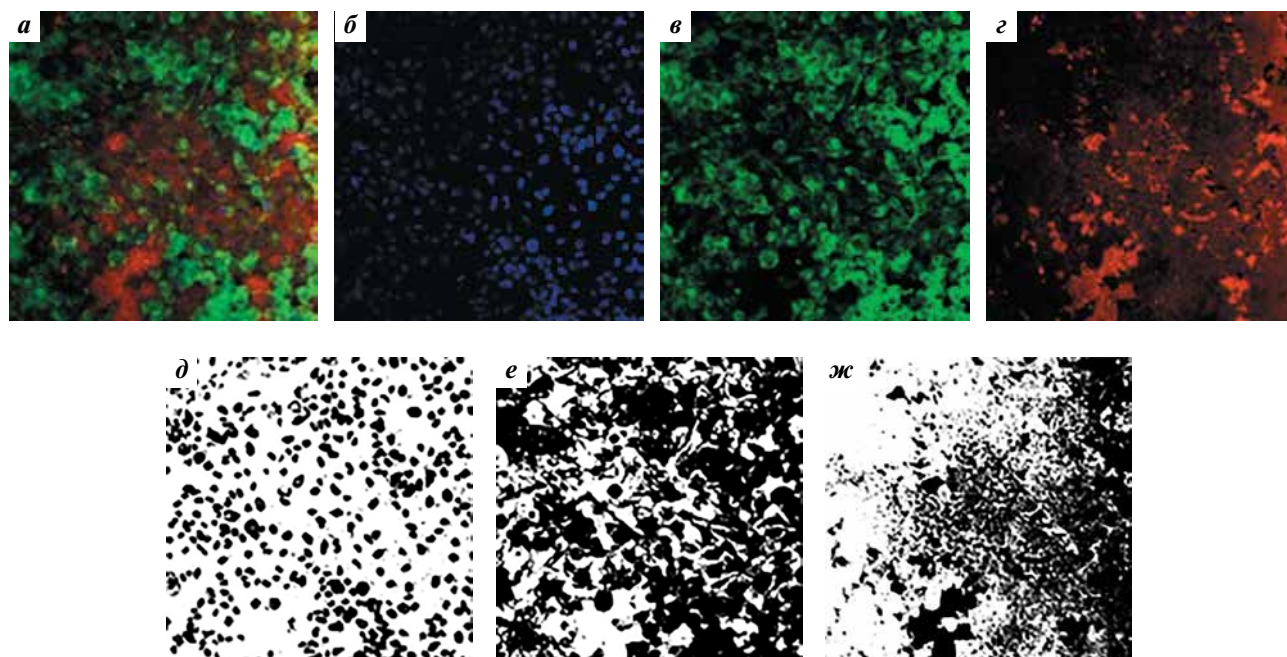


Рис. 3. Анализ инвазивности клеток PC3 m-LN4. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (г). Желатин окрашен Su^3 (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д – число клеток, е – площадь клеток (черный цвет), ж – площадь деградации желатина (белый цвет). $\times 20$

Fig. 3. Analysis of PC3 m-LN4 cell invasiveness. Confocal photos of cells (a), nuclei (b), actin (v), and gelatin degradation (z). Gelatin is stained with Su^3 (red fluorescence), nuclei are stained with DAPI (blue fluorescence), actin is stained with FITC-phalloidin (green fluorescence). Cell photos were obtained using the ImageJ software: d – number of cells, e – cell area (black), ж – gelatin degradation area (white). $\times 20$

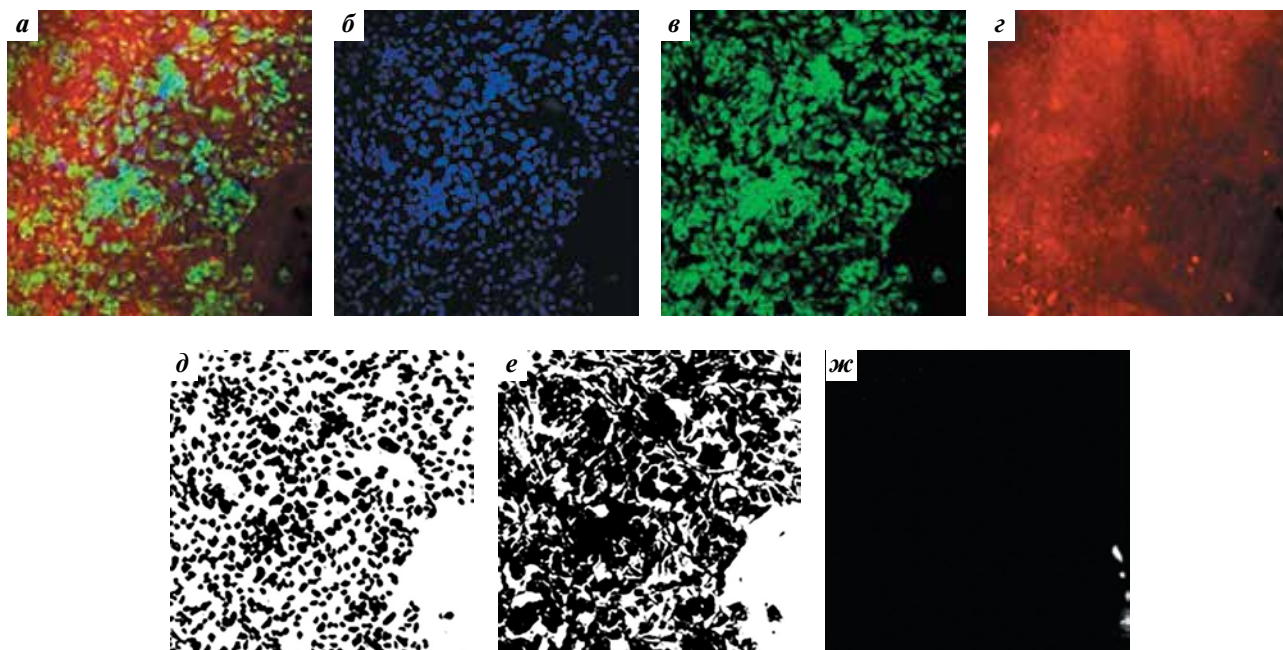


Рис. 4. Эффект пептида на инвазивность опухолевых клеток. Конфокальные изображения клеток (а), ядер (б), актина (в) и деградации желатина (z): PC3 m-LN4 клетки, обработанные пептидом. Желатин окрашен к Cy³ (красная флуоресценция), ядро клеток окрашено DAPI (синяя флуоресценция), актин клеток окрашен FITC-фаллоидином (зеленая флуоресценция). Изображения клеток, полученные с помощью программы ImageJ software: д – число клеток, е – площадь клеток (черный цвет), жс – площадь деградации желатина (белый цвет). ×20

Fig. 4. Effect of the peptide on invasiveness of tumor cells. Confocal images of cells (a), nuclei (б), actin (в), and gelatin degradation (z): PC3 m-LN4 cells treated with the peptide. Gelatin is stained with Cy³ (red fluorescence), nuclei are stained with DAPI (blue fluorescence), actin is stained with FITC-phalloidin (green fluorescence). Cell photos were obtained using the ImageJ software: д – number of cells, е – cell area (black), жс – gelatin degradation area (white). ×20

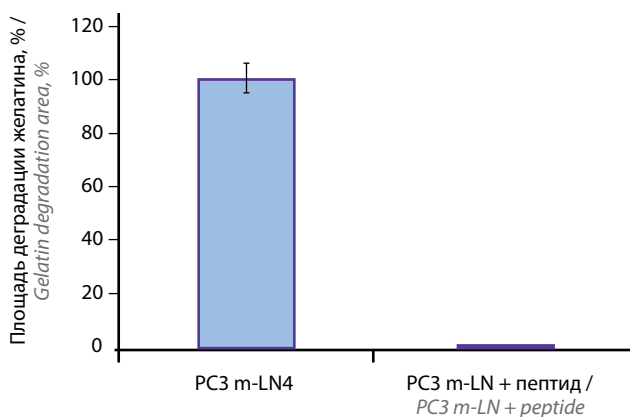


Рис. 5. Количественный анализ деградации желатина клетками PC3 m-LN4 и клетками, обработанными пептидом RYQLHPYR, с помощью ImageJ программы.

*Различия являются статистически значимыми при $p < 0,05$; $M \pm m$, $n = 3$

Fig. 5. Quantitative analysis of gelatin degradation by PC3 m-LN4 cells and cells treated with the RYQLHPYR peptide performed using the ImageJ software.

*Significant differences at $p < 0.05$; $M \pm m$, $n = 3$

вызывают лизис желатина, относящийся к образованию инвадоподий в виде областей, в которых отсутствует флуоресценция желатина, – на конфокальных изображениях это область черного цвета (рис. 3а, z).

Инвазивные клетки PC3 m-LN4 имеют большое количество инвадоподий и высокую концентрацию актина на концах клетки (рис. 3а, в). Количественный анализ изображений показал, что клетки PC3 m-LN4, не обработанные пептидом, значительно деградировали желатин, и площадь его деградации составляет около 90 % общей площади клеток (рис. 3z, жс). Однако клетки, обработанные пептидом, претерпели морфологические изменения, количество инвадоподий уменьшилось, и площадь деградации желатина резко сократилась, что свидетельствует о подавлении инвазивности клеток (рис. 4а, z). На рис. 3жс и 4жс представлены изображения, полученные с помощью программы ImageJ software, показывающие число и площадь клеток (черного цвета) и площадь деградации желатина (белого цвета). Количественный анализ площади деградации желатина с помощью ImageJ software показал, что клетки, обработанные пептидом, деградировали только 0,14 % площади желатина по отношению к общей площади клеток, что свидетельствует об ингибировании инвазивности клеток на 99,86 % в сравнении с контролем (рис. 5).

Эти результаты показали, что пептид RYQLHPYR значительно ингибирует инвазивность опухолевых клеток предстательной железы. Данные согласуются с ранее опубликованными результатами, свидетельствующими,

что RНАММ-таргет-пептиды ингибируют инвазивность опухолевых клеток молочной железы [40–42, 68, 69]. Таким образом, исследование показало, что пептид RYQLHPYR обладает антиметастатическим действием.

Заключение

Наши результаты продемонстрировали, что пептид RYQLHPYR при низкой концентрации (2×10^{-7} М)

ингибирует жизнеспособность, индуцирует апоптоз и некроз клеток предстательной железы. Индукция апоптоза происходит по митохондриальному пути. Пептид RYQLHPYR ингибирует инвазивность опухолевых клеток предстательной железы. Полученные результаты свидетельствуют, что пептид RYQLHPYR обладает противоопухолевой активностью и имеет терапевтический потенциал для лечения РПЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136(5):E359–86. DOI: 10.1002/ijc.29210.
2. Lehrer R.I. Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(9):727–38. DOI: 10.1038/nrmicro976.
3. Hancock R.E. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* 2001;1(3):156–64. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00092-4.
4. Koczulla A.R., Bals R. Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential. *Drugs* 2003;63(4):389–406. DOI:10.2165/00003495-200363040-00005.
5. Otvos L.Jr. Antibacterail peptides and proteins with multiple cellular targets. *J Pept Sci* 2005;11(11):697–706. DOI: 10.1002/psc.698.
6. Nicolaou K.C., Jinyou X., Murphy F. et al. Total synthesis of sanglifehrin A. *Chem Int Ed Engl* 1999;38(16):2447–51.
7. Xia Z., Smith C.D. Total synthesis of dendroamide A, a novel cyclic peptide that reverses multiple drug resistance. *J Org Chem* 2001;66(10):3459–66.
8. Davies J.S. the cyclization of peptides and depsipeptides. *J Peptide Sci* 2003;9(8):471–501. DOI: 10.1002/psc.491.
9. Lyu P., Ge L., Ma R. et al. Identification and pharmaceutical evaluation of novel frog skin-derived serine proteinase inhibitor peptide-PE-BBI (Pelophylax esculentus Bowman-Birk inhibitor) for the potential treatment of cancer. *Sci Rep* 2018;8(1):14502. DOI: 10.1038/s41598-018-32947-5.
10. Zainodini N., Hassanshahi G., Hajizadeh M. et al. Nisin Induces Cytotoxicity and Apoptosis in Human Astrocytoma Cell Line (SW1088). *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(8):2217–22. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.8.2217.
11. Tanner J.D., Deplazes E., Mancera R.L. the Biological and Biophysical Properties of the Spider Peptide Gomesin. *Molecules* 2018;23(7):E1733. DOI: 10.3390/molecules23071733.
12. Veloria J.R., Chen L., Li L. et al. Novel cell-penetrating-amyloid peptide conjugates preferentially kill cancer cells. *MedChemComm* 2017;9(1):121–30. DOI: 10.1039/c7md00321h.
13. Lindgren M., Rosenthal-Aizman K., Saar K. et al. Overcoming methotrexate resistance in breast cancer tumour cells by the use of a new cell-penetrating peptide. *Biochem Pharmacol* 2006;71(4):416–25. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.10.048.
14. Liang J.F., Yang V.C. Synthesis of doxorubicin-peptide conjugate with multidrug resistant tumor cell killing activity. *Bioorg Med Chem Lett* 2005;15(22):5071–5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.07.087.
15. Brogden K.A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005;3(3):238–50. DOI: 10.1038/nrmicro1098.
16. Mader J.S., Hoskin D.W. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 2006;15(8):933–46. DOI: 10.1517/13543784.15.8.933.
17. Yuan J., You X., Ni G. et al. Iodine-125 labeled Australian frog tree host-defense peptides caerin 1.1 and 1.9 better inhibit human breast cancer cells growth than the unlabeled peptides. 125I-caerin 1.9 may better be used for the treatment of breast cancer. *Hell J Nucl Med* 2018;21(2):115–20. DOI: 10.1967/s002449910803.
18. Уханова Т.М., Кулинич Е.А., Кудинова В.К. Терапевтические дозовые характеристики химерного пептида MM-D37K при парентеральном введении мышам BALB/C NUDE с колоректальным раком человека HCT-116. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(2):36–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-36-41. [Ukhanova T.M., Kulinich E.A., Kudinova V.K. Therapeutic dose characteristics of the chimeric peptide MM-D37K when administered parenterally to BALB/C NUDE mice with human colorectal cancer HCT-116. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2017;16(2):36–41. (In Russ.)].
19. Xiang Y., Shan W., Huang Y. Improved anticancer efficacy of doxorubicin mediated by human-derived cell-penetrating peptide dNP2. *Int J Pharm* 2018;551(1–2):14–22. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.011.
20. Kritzer J.A., Stephens O.M., Guaracino D.A. et al. β -Peptides as inhibitors of protein-protein interactions. *Bioorg Med Chem* 2005;13(1):11–6. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.09.009.
21. Qvit N., Mochly-Rosen D. Highly Specific Modulators of Protein Kinase C Localization: Applications to Heart Failure. *Drug Discov Today Dis Mech* 2010;7(2):e87–e93. DOI: 10.1016/j.ddmec.2010.07.001.
22. Zhang X.X., Eden H.S., Chen X. Peptides in cancer nanomedicine: drug carriers, targeting ligands and protease substrates. *J Control Release* 2012;159(1):2–13. DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.023.
23. Thayer A.M. Improving peptides. *C&EN* 2011;89(22):13–20.
24. Borghouts C., Kunz C., Groner B. Current strategies for the development of peptide-based anticancer therapeutics. *J Pept Sci* 2005;11(11):713–26. DOI: 10.1002/psc.717.
25. Platt V.M., Szoka F.C.Jr. Anticancer Therapeutics: targeting macromolecules and nanocarriers to hyaluronan or CD44, a hyaluronan receptor. *Mol Pharm* 2008;5(4):474–86. DOI: 10.1021/mp800024g.
26. Vives E., Schmidt J., Pelegrin A. Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 2008;1786(2):126–38. DOI: 10.1016/j.bbcan.2008.03.001.

27. Ijaz M., Wang F., Shahbaz M. et al. the Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. *Protein Pept Lett* 2018;24(12):1084–95. DOI: 10.2174/0929866525666171123213148.
28. Lisabeth E.M., Falivelli G., Pasquale E.B. Eph receptor signaling and ephrins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5(9):a009159. DOI: 10.1101/cshperspect.a009159.
29. Lamberto I., Lechtenberg B.C., Olson E. et al. Development and structural analysis of a nanomolar cyclic peptide antagonist for the EphA4 receptor. *ACS Chem Biol* 2014;9:2787–95. DOI: 10.1021/cb500677x.
30. Wang Y., Menendez A., Fong C. et al. Ephrin B2/EphB4 mediates the actions of IGF-I signaling in regulating endochondral bone formation. *J Bone Miner Res* 2014;29:1900–13. DOI: 10.1002/jbmr.2196.
31. Accardo A., Aloj L., Aurilio M. et al. Receptor binding peptides for target-selective delivery of nanoparticles encapsulated drugs. *Int J Nanomedicine* 2014;9:1537–57. DOI: 10.2147/IJN.S53593.
32. Patel A.R., Chougule M., Singh M. EphA2 targeting pegylated nanocarrier drug delivery system for treatment of lung cancer. *Pharm Res* 2014; 31:2796–809. DOI: 10.1007/s11095-014-1377-4.
33. Maxwell C.A., McCarthy J., Turley E. Cell-surface and mitotic-spindle RHAMM: moonlighting or dual oncogenic functions? *J Cell Sci* 2008;121(Pt 7):925–32. DOI: 10.1242/jcs.022038.
34. Turley E. A., Naor D. RHAMM and CD44 peptides-analytic tools and potential drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2012;17:1775–94.
35. Tabarkiewicz J., Giannopoulos K. Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia. *Transplant Proc* 2010;42(8):3293–6. DOI: 10.1016/j.transproceed.2010.07.022.
36. Casalegno-Garduño R., Schmitt A., Schmitt M. Clinical peptide vaccination trials for leukemia patients. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(6):785–99. DOI: 10.1586/erv.11.56.
37. Esguerra K.V., Tolg C., Akentieva N. et al. Identification, Design and Synthesis of Tubulin-Derived Peptides as Novel Hyaluronan Mimetic Ligands for the Receptor for Hyaluronan-Mediated Motility (RHAMM/HMMR). *Integr Biol (Camb)*. 2015;7(12):1547–60. DOI: 10.1039/c5ib00222b.
38. Luyt L.G., Turley E.A., Esguerra K.V. Rhamm binding peptides. International Patent WO2011/150495. 2011. London Health Sciences Centre Research Inc.
39. Turley E.A., Noble P.W., Bourguignon L.Y. Signaling properties of hyaluronan receptors. *J Biol Chem* 2002;277(7):4589–92. DOI: 10.1074/jbc.R100038200.
40. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Visualization of Ovarian Cancer Cells with Peptide VEGEGEGEEY. *Biochemistry (Moscow), Suppl A: Membrane and Cell Biology* 2018; 12(2):189–98. DOI: 10.1134/S1990747818020022.
41. Акентьева Н.П., Шушанов С.С., Котельников А.И. Эффект RHAMM-селективных пептидов на выживаемость клеток рака молочной железы. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(5):618–21. DOI: 10.1007/s10517-015-3041-3. [Akenteva N.P., Shushanov S.S., Kotelnikov A.I. Effects of RHAMM/HMMR-Selective Peptides on Survival of Breast Cancer Cells. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2015;159(5):618–21. (In Russ.)].
42. Акентьева Н.П., Шушанов С.С. Ингибирующий эффект RHAMM-таргет пептидов на инвазивность клеток рака молочной железы. *Вопросы онкологии* 2016;62(6):831–7. ISSN 0507-3758. [Akentieva N.P., Shushanov S.S. Inhibitory effect of RHAMM-target peptides on invasion of breast cancer cells. *Voprosy onkologii = Problems in oncology* 2016;62(6):831–7 (In Russ.)].
43. Tolg C., Hamilton S.R., Nakrieko K.A. et al. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1, 2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair. *J Cell Biol* 2006;175(6):1017–28. DOI: 10.1083/jcb.200511027.
44. Mäde V., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides. *Beilstein J Org Chem* 2014;10:1197–212. DOI: 10.3762/bjoc.10.118.
45. Schreier A., Tinson C., Sherry J.P., Schirmer K. Application of Alamar blue/5-carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester as a noninvasive cell viability assay in primary hepatocytes from rainbow trout. *Anal Biochem* 2005;344(1):76–85. DOI: 10.1016/j.ab.2005.06.009.
46. Terui Y., Furukawa Y., Kikuchi J. et al. Apoptosis during HL-60 cell differentiation is closely related to a G0/G1 cell cycle arrest. *J Cell Physiol* 1995;164(1):74–7. DOI: 10.1002/jcp.104160110.
47. Liu C.Y., Takemasa A., Liles W.C. et al. Broad-spectrum caspase inhibition paradoxically augments cell death in TNF- α -stimulated neutrophils. *Blood* 2003;101(1):295–304. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0266.
48. Pradhan N., Pratheek B.M., Garai A. et al. Induction of apoptosis by Fe (salen) Cl through caspase-dependent pathway specifically in tumor cells. *Cell Biol Int* 2014;38(10):1118–31. DOI: 10.1002/cbin.10308.
49. Artym V.V., Yamada K.M., Mueller S.C. ECM degradation assays for analyzing local cell invasion. *Methods Mol Biol* 2009;522:211–9. DOI: 10.1007/978-1-59745-413-1_15.
50. Xu C., Wang Y., Yu X. et al. Evaluation of human mesenchymal stem cells response to biomimetic bioglass-collagen-hyaluronic acid-phosphatidylserine composite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2009;88(1):264–73. DOI: 10.1002/jbm.a.31931.
51. Rizzardi A.E., Vogel R.I., Koopmeiners J.S. et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors. *Cancer* 2014;120(12):1800–9. DOI: 10.1002/cncr.28646.
52. Efremov R.G., Baradaran R., Sazanov L.A. the architecture of respiratory complex I *Nature* 2010;465(7297):441–5. DOI: 10.1038/nature09066.
53. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Иммунологические проблемы апоптоза. М.: Эдиториал УРСС, 2002. [Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. Immunological problems of apoptosis. М.: Editorial URSS, 2002. (In Russ.)].
54. Льюин Б., Кассимерис Л., Лингаппа В. и др. Клетки. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2011. [Lewin B., Kassimeris L., Langappa V. et al. *Cells. Moscow: Binom. Laboratoriya znaniy*, 2011. (In Russ.)].
55. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция. *Биохимия* 2004;69(10):1301–13. [Gordeeva A.V., Labas Yu.A., Zvyagil'skaya R.A. Apoptosis of unicellular organisms: mechanisms and evolution. *Biokhimiya = Biochemistry* 2004;69(10):1301–13. (In Russ.)].
56. Cory S. Apoptosis. Fascinating death factor. *Nature* 1994;367(6461):317–8. DOI: 10.1038/367317a0.
57. Smith C.A., Farrah T., Goodwin R.G. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 1994;76(6):959–62.
58. Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that

- induces apoptosis. *Immunity* 1995;3(6):673–82.
59. Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271(22):12687–90.
60. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88(3):355–65.
61. Tartaglia L., Goeddel D.V. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992;13(5):151–3. DOI: 10.1016/0167-5699(92)90116-O.
62. Peter M.E., Neufelder A.E., Hengartner M.O. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(24):12736–7.
63. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. *Molecular biology of the cell*. 5th Edn. Garland Sci 2008.
64. Qian T., Nieminen A.L., Herman B. et al. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1997;273(6 Pt 1):1783–92.
65. Petit P.X., Susin S.A., Zamzami N. et al. Mitochondria and programmed cell death: back to the future. *FEBS Lett* 1996;396(1):7–13.
66. Манских В.Н. Пути гибели клетки и их биологическое значение. *Цитология* 2007;49(11):909–15. [Manskikh V.N. Pathways of cell death and their biological importance. *Tsitologiya = Citology* 2007;49(11):909–15 (In Russ.)].
67. Bröker L.E., Kruyt F.A., Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3155–62. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2223.
68. Akentieva N. RHAMM-target peptides inhibit invasion of breast cancer cells. *EBTJ* 2017;1:138–148. DOI: 10.24190/ISSN2564-615X/2017/02.05.
69. Akentieva N.P., Shushanov S.S. Inhibition of cancer cell invasiveness by the synthetic peptides GEGEEGEE and DFGEAEAE. *Biochemistry (Moscow), Suppl A: Membrane and Cell Biology* 2017;11(1):24–34. DOI: 10.1134/S1990747816040127.

Вклад авторов:

Н.П. Акентьева: разработка дизайна исследования, постановка экспериментов, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи.

С.С. Шушанов: культивирование клеточных линий (PC3 m-LN4 и MEF), постановка экспериментов по влиянию пептида на апоптоз клеток, анализ полученных данных.

Authors' contributions

N.P. Akentieva: study design; experimental set up, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data; manuscript preparation; literature review on the subject of the article.

S.S. Shushanov: cell line cultures (PC3 m-LN4 and MEF), experiments on the effect of the peptide on cell apoptosis, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.П. Акентьева/N.P. Akentieva: <https://orcid.org/0000-0002-9126-3070>

С.С. Шушанов/S.S. Shushanov: <https://orcid.org/0000-0002-2273-3024>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа проводилась по тематической карте Минобрнауки РФ в соответствии с государственным заданием (регистрационный № 0089-2019-0014). Исследование выполнено без спонсорской поддержки.

Financial support. The study was performed per the subject card of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in accordance with the state task (registration № 0089-2019-0014). The study wasn't supported by external sources.

Статья поступила: 11.09.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 11.09.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.

ТЕРАФТАЛ СНИЖАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДОКСОРУБИЦИНУ *IN VITRO*, НО НЕ ВЛИЯЕТ НА ЕГО ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ *IN VIVO*

Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова,
В.И. Романенко, Д.А. Хоченков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Татьяна Александровна Сидорова tatsid@yahoo.com

Введение. Антрациклиновый антибиотик доксорубицин (DOX) широко используется в клинической онкологии. Известно, что гемин, эндогенный метаболит, обладает способностью модулировать цитотоксичность DOX. По нашим данным, токсичность DOX для опухолевых клеток млекопитающих, растущих *in vitro*, снижается в присутствии терафталла (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбокситалозианина кобальта), компонента бинарной каталитической системы (ТФ + аскорбиновая кислота).

Цель исследования – выяснить, влияет ли ТФ на противоопухолевый эффект DOX *in vivo*.

Материалы и методы. В работе были использованы опухолевые клетки меланомы мыши линии B16/F10 и перевиваемая опухоль меланомы B16. Способность ТФ защищать опухолевые клетки от гибели, индуцированной DOX, оценивали с помощью МТТ-метода, проточной цитометрии, световой микроскопии, цитохимического метода определения экспрессии β-галактозидазы, радиометрического метода. Противоопухолевый эффект препаратов в режимах (DOX ± ТФ) оценивался по продолжительности жизни животных.

Результаты. По нашим данным, токсичность DOX относительно клеток меланомы мышей линии B16/F10 в присутствии ТФ (10–20 мкМ) снижается в среднем в 4–6 раз. ТФ защищает опухолевые клетки линии B16/F10 от гибели путем апоптоза, индуцированного DOX, включая в клетке программу преждевременного старения. В защите ТФ/гемина от цитотоксичности DOX участвует один и тот же механизм, который связан со снижением способности клеток «накапливать» антрациклиновые антибиотики в присутствии модуляторов. Противоопухолевая активность DOX при лечении мышей с перевиваемой опухолью меланомы B16 в комбинации с ТФ не отличается от эффективности антрациклиновых антибиотиков в режиме монотерапии.

Заключение. Способность ТФ снижать цитотоксичность DOX для клеток меланомы мышей линии B16/F10, наблюдаемая *in vitro*, не влияет на противоопухолевый эффект DOX в условиях комбинированного воздействия препаратов.

Ключевые слова: доксорубицин, терафталл, меланома мышей линии B16/F10, препаратиндуцированное старение, перевиваемая опухоль мышей B16

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-51-59

TERAPHTAL DECREASED THE SENSITIVITY TUMOR CELLS TO DOXORUBICINE *IN VITRO* BUT DOES NOT AFFECT ITS ANTITUMOR EFFECT *IN VIVO*

T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokof'yeva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov

N.N. Blokhin NMRCO Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. Anthracycline antibiotic doxorubicin (DOX) is widely used in clinical oncology. It is known that hemin, endogenous compound, has the ability to modulate DOX cytotoxicity. We found that DOX toxicity against mammalian cancer cells can be decreased *in vitro* in the presence of teraftal (TF), the component anticancer binaric catalytic system (TF + ascorbic acid).

Purpose. To study the influence of TF on anticancer effect of DOX.

Materials and methods. The mouse melanoma cell line B16/F10 and mouse transplanted tumor B16 were used. The TF ability to protect from DOX-induced cell death were measured by MTT-assay, flow cytometry, light microscopy, cytochemical determination of β-galactosidase expression, radiometric assay and tumor growth inhibition assay *in vivo*.

Results. The sensitivity of mouse melanoma cell line B16/F10 to DOX decreased in the presence TF (10–20 μM) in the mean by 4–6 fold. The same mechanism takes part into the decrease of DOX cytotoxicity at the presence of TF/hemin known which connects with the cell ability to accumulate of drug. TF protect the mouse melanoma cells B16/F10 from apoptosis, induced by DOX throwing switching on cell premature senescence programme. The antitumor effect of DOX against mouse transplanted melanoma B16 at presence of TF was the same as DOX alone.

Conclusions. The TF potency to decrease the sensitivity of cancer cells to DOX *in vitro* does not correlate with its ability to modulate anthracycline antibiotics anticancer effect *in vivo*.

Key words: doxorubicin, sodium salt of cobalt 4,5-carboxyphthalocyanine, drug-induced senescence, mouse melanoma cell line B16/F10, transplanted mouse tumor B16

Введение

Антрациклиновые антибиотики (АА) — эффективные химиопрепараты с широким спектром противоопухолевой активности в клинике [1]. Эффективность химиотерапии АА у больных в первую очередь зависит от лекарственной чувствительности опухолевых клеток, природа которых определяет тип и количество внутриклеточных препарат-специфических мишеней. С другой стороны, в зависимости от химической структуры АА (стандартные: доxorубин — DOX, даунорубин и нестандартный: аklarубин) отмечается различная биологическая активность этой группы препаратов. Основной вклад в механизм действия АА, как полагают, вносит их взаимодействие с макромолекулами митохондрий (Мтх) и ядрами клеток [2, 3]. АА имеют высокое сродство к Мтх. «Антрахиноновый» хромофор АА, имитируя субстрат фермента 1-го комплекса дыхательной цепи Мтх — оксидоредуктазы никотинамидадениндинуклеотид-дегидрогеназы, позволяет им включаться в биоэнергетический синтез аденозинтрифосфорной кислоты [3], что в конечном итоге приводит к накоплению активных форм кислорода и запуску программ гибели клеток по механизмам апоптоза и некроза [4]. Ядерный компонент механизма действия АА обусловлен их способностью интеркалировать в ДНК независимо от химической структуры препаратов [2, 5]. Встраиваясь между парами оснований, АА способны образовывать сшивки с макромолекулой, которые препятствуют процессу репликации ДНК и индуцируют гибель клеток [6, 7]. АА являются ингибиторами фермента ДНК-топоизомеразы II (Торо II), вовлеченной в репликацию, репарацию и поддержание гомеостаза ДНК. Образование тройного комплекса Торо II — АА — ДНК и последующая блокада функции фермента Торо II приводит к разрывам ДНК [8]. Важно отметить, что аklarубин, в отличие от классических АА, является непрямым ингибитором каталитической активности двух топоизомераз — Торо II и Торо I, но при этом не индуцирует разрывы ДНК [9]. Такой механизм действия обусловлен тем, что аklarубин, встраиваясь между нитями ДНК, нарушает доступ ферментов Торо II и Торо I к ДНК, что приводит, с одной стороны, к стабилизации ковалентного комплекса Торо I с ДНК, а с другой — к угнетению каталитической активности Торо II [10].

Данные литературы свидетельствуют о том, что механизм клеточной гибели, индуцированной АА,

зависит от типа клеток, химической структуры, концентрации и времени воздействия препарата [11]. АА, взаимодействуя с различными программами опухолевых клеток, запускают разные механизмы их гибели: через апоптоз [11–13], включая клетки меланомы мышей B16/F10 [14, 15], некроз [11, 13], преждевременное старение [16, 17]. Для большинства типов клеток характерен АА-специфический тип гибели клеток по механизму преждевременного (усиленного) старения. Повреждения ДНК (сшивки-разрывы), вызванные АА, являются сигналами для развития в клетке признаков, характерных для стареющих клеток (SLC-фенотип). В отличие от стандартных АА, в присутствии аklarубина, неспособного вызывать разрывы ДНК [9], в опухолевых клетках запускается только процесс апоптоза и/или некроза [18]. SLC-фенотип индуцируется при воздействии DOX в опухолевых клетках различного гистогенеза [16, 19–23]. Для клеток с SLC-фенотипом характерны морфологические (увеличение размера, разбухание ядер, появление микроядер) и биохимические (увеличение активности фермента β -галактозидазы лизосом) признаки и сохранение жизнеспособности [16]. Развитие SLC-фенотипа сопровождается остановкой клеток в фазе G_2/M клеточного цикла и арестом пролиферации клеток [24]. Продолжительная остановка в фазе G_2/M клеток, перегруженных генетическим материалом, в конечном итоге приводит к их гибели по типу митотической катастрофы [20]. При этом выживание отдельных клеток, избежавших терминального ареста, может явиться предпосылкой для восстановления роста популяции [25].

Эндогенные вещества и фармакологические препараты различной природы могут влиять на эффективность АА. Так, токсичность АА снижается в присутствии эндогенного пигмента меланина [26], витамина С [27], гема (FePPIX) [28–30]. При этом механизмы, лежащие в основе снижения цитотоксичности АА, могут быть разными: образование комплекса меланина с АА и улавливание активных форм кислорода, генерируемых АА [26]; активация антиоксидантной системы (витамин С) [27]. Снижение токсичности АА в присутствии FePPIX обусловлено его прямым взаимодействием с антрациклинами [28, 31], угнетением транспорта АА в клетку [28, 31], селективным ингибированием активности СОХ, фермента дыхательной цепи Мтх [29], усилением экспрессии гена *Nrf2* и опосредованно через него — активацией антиоксидантной системы клетки [30].

Ранее нами было обнаружено, что чувствительность опухолевых клеток млекопитающих разного гистогенеза, растущих *in vitro*, к DOX снижается в присутствии терафтала (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбокситаллоцианина кобальта), компонента противоопухолевого средства – бинарной каталитической системы (ТФ + аскорбиновая кислота) [32, 33]. Известно, что в клинических протоколах фотодинамической терапии используются фотосенсибилизаторы фталоцианиновой природы, подобные ТФ, в комбинации с химиопрепаратами, включающей АА [34]. Принимая во внимание эти данные, мы продолжили исследования в условиях *in vivo*.

Цель настоящего исследования – выяснить, влияет ли ТФ на противоопухолевый эффект DOX *in vivo*. Для этого сначала в условиях *in vitro* на клетках меланомы мышей линии B16/F10 были подтверждены цитопротекторные свойства ТФ, затем исследовали эффективность лечения перевиваемой меланомы мышей B16 комбинацией DOX с ТФ.

Материалы и методы

В работе были использованы следующие химические реактивы: РНКазы А, ДМСО, NP-40, йодид пропидия (PI), $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$, X-Gal, МТТ фирмы Sigma. Бромистый этидий, $MgCl_2$, дитиотреитол, CH_3COONa , Tween 20, глутаральдегид получены из Serva; NaCl фирмы «Реахим». Препараты: DOX – Bristol Myers; Терафтал-Лио – совместного производства ФГУП ГНЦ «НИОПИК» и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. FePPIX получен из Sigma. C^{14} -даунорубин (удельная активность 1,67 ГБк/ммоль) получен из Amersham (Англия). FePPIX растворяли в ДМСО; DOX и ТФ – в H_2O . Стоковые растворы в аликвотах (20 мкл) хранили при $-60\text{ }^\circ\text{C}$ и размораживали в каждой новой серии опытов.

Экспериментальные модели

Культура клеток меланомы мышей линии B16/F10 была использована в качестве экспериментальной модели *in vitro*. Для поддержания линии и проведения экспериментов клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10 % FCS, 2 мМ глутамина и антибиотики (стрептомицин + пенициллин). Экспериментальной моделью *in vivo* служила меланома мышей MelB16, штамм (3-й пассаж) получен из Банка замороженных биоматериалов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Опухоль прививали в икроножные мышцы правой задней лапки. Прививочная доза – 20 мг взвеси опухоли в 0,1 мл среды 199. Исследование проводили на мышах-самках – гибридах F_1 (BDF₁) [$C_{57}BL/6 \times DBA_2$] массой тела 20–22 г, полученных из питомника «Столбовая», которых содержали в виварии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина при

естественном освещении на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

Исследование жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* МТТ-методом

Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован МТТ-метод, подробно описанный в работе [35]. Для оценки эффективности модулятора (М) в комбинации с препаратами использован индекс резистентности (IR), равный отношению:

$$IR = IC_{50}(\text{препарат} + M) / IC_{50} \text{ препарат.}$$

Величина $IR > 1,0$ в присутствии нетоксических концентраций М (выживаемость клеток не менее 80 % по сравнению с контрольными клетками) свидетельствовала о снижении чувствительности клеток к химиопрепарату.

Исследование клеточного цикла методом проточной флуориметрии

Для исследования влияния ТФ на способность DOX вмешиваться в клеточный цикл линии B16/F10 ($10^6/2$ мл питательной среды в лунке) использовали методику, описанную в работе [33]. Анализ клеточного цикла был выполнен на клетках, меченых PI, содержание в популяции клеток в фазах Sub-G₁, G₁, S и G₂/M было вычислено из гистограмм в программе FACS Diva и представлено в процентах.

Определение активности лизосомального фермента β -галактозидазы в клетках

Экспрессию β -галактозидазы в клетках определяли согласно методике [36] с модификациями [33].

Исследование способности клеток накапливать АА в присутствии и без модуляторов с помощью радиометрического метода

Для оценки способности опухолевых клеток накапливать АА в присутствии и без модуляторов использовали методику, описанную в работе [33]. Данные выражены как количество импульсов в час в расчете на 10^6 клеток и являются средними величинами, полученными из 2 независимых экспериментов.

Исследование противоопухолевой активности DOX (режимы и дозы препаратов)

Изучение противоопухолевой активности DOX в комбинации с ТФ и без модулятора соответствовало рекомендациям, изложенным в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств под редакцией А.Н. Миронова [37].

Перед лечением мышей распределили на 4 группы по 5 особей: 1-я группа (контроль роста опухоли)

получала 0,2 мл физраствора, 2-я получала только DOX, 3-я – комбинацию ТФ + DOX (ТФ вводили первым без интервала между введениями препаратов); 4-я группа – комбинацию DOX + ТФ (DOX вводили первым и ТФ – через 2,5 ч после АА). Дозы препаратов выбраны по принципу максимальной переносимости: DOX – 8 мг/кг [37], ТФ – 25 мг/кг (собственные неопубликованные данные). Препараты растворяли 0,2 мл физраствора и вводили 1-кратно через 48 ч после трансплантации опухоли: ТФ – Терафтал-Лию (0,1 %) вводили внутривенно в хвостовую вену очень медленно, DOX (0,08 %) вводили внутривенно. Объем опухолей измеряли на 7, 10, 14 и 17-е сутки после трансплантации опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО) рассчитывали соответственно на 5, 8, 12 и 15-е сутки после окончания лечения. Эффективность лечения оценивали по стандартному критерию ТРО (%) [37]. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследование влияния ТФ на токсичность DOX для опухолевых клеток меланомы мышей линии B16/F10 в системе *in vitro*

По нашим данным, в присутствии ТФ (10 мкМ) чувствительность клеток линии B16/F10 к DOX снижается в 4 раза, о чем свидетельствует величина IR: $(4,1 \pm 0,6)$. В этих же условиях в присутствии FePPIX

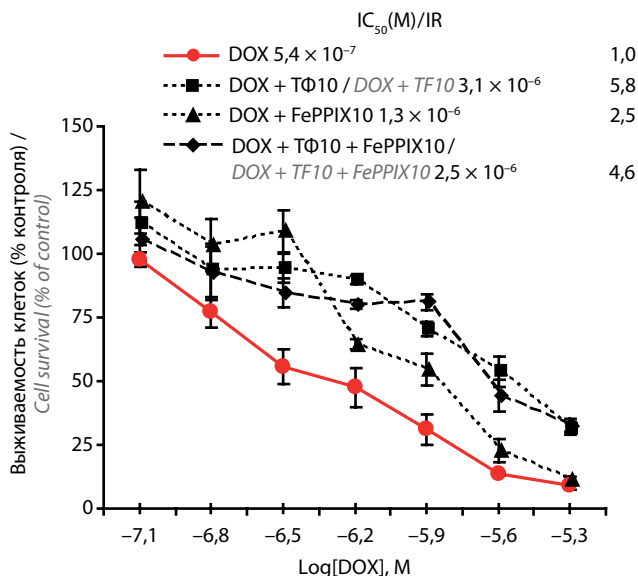


Рис. 1. Цитотоксичность DOX для клеток B16/F10 в присутствии и без модуляторов (ТФ/FePPIX). Здесь и на рис. 2, 3, 5: ТФ – терафтал, DOX – доксорубицин

Fig. 1. DOX cytotoxicity for B16/F10 cells with and without modulators (TF/FePPIX). Here and in fig. 2, 3, 5: TF – teraftal, DOX – doxorubicin

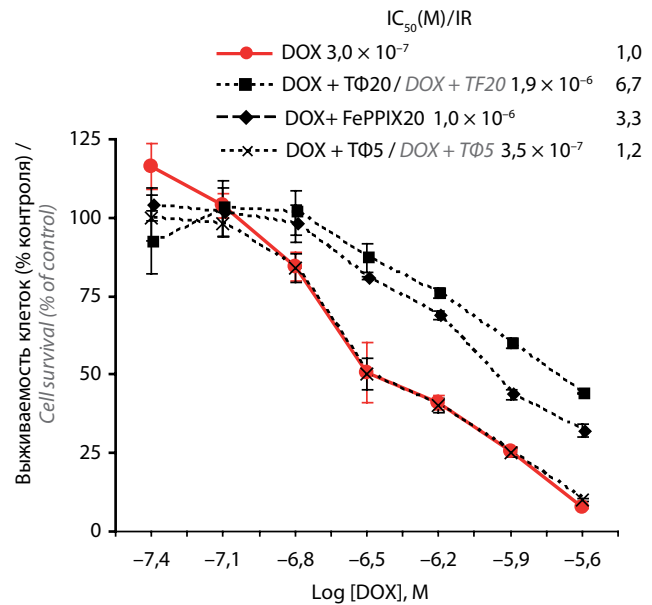


Рис. 2. Зависимость токсичности комбинации DOX + ТФ/FePPIX для клеток B16/F10 от концентрации модулятора

Fig. 2. Dependence of DOX + TF/FePPIX combination toxicity for B16/F10 cells on modulator concentration

(10 мкМ), известного модулятора токсичности АА [28–30], величина IC₅₀ для DOX увеличивается в среднем в 2,5 раза IR: $(2,7 \pm 0,4)$ (рис. 1).

Кривая выживаемости клеток в присутствии комбинации DOX + ТФ не отличается от таковой для DOX + (ТФ + FePPIX). Таким образом, конечный эффект комбинации DOX + (ТФ + FePPIX) не является суммой вклада обоих модуляторов. Эти данные могут свидетельствовать, что ТФ и FePPIX конкурируют за одни и те же мишени, участвующие в механизме снижения токсичности к АА.

Эффективность ТФ как протектора определена в исследовании зависимости токсичности DOX для клеток B16/F10 от концентрации модулятора. По нашим данным, защитный эффект ТФ для клеток B16/F10 отсутствует при концентрации модулятора в среде 5 мкМ, регистрируется при 10 мкМ (IR = $4,1 \pm 0,6$), возрастает при 20 мкМ (IR = $6,0 \pm 0,4$) (рис. 2). В этих же условиях эффективность FePPIX, протектора токсичности DOX, при концентрации модулятора в среде 10 мкМ не отличается от таковой при 20 мкМ (см. рис. 1 и 2). Эти данные свидетельствуют, что ТФ является более эффективным модулятором токсичности DOX для клеток меланомы линии B16/F10 по сравнению с FePPIX.

Исследование влияния ТФ на механизмы гибели клеток меланомы линии B16/F10 в присутствии DOX: индукцию апоптоза и преждевременного старения клеток

По данным литературы, DOX индуцирует гибель клеток меланомы мышей B16/F10 в основном по

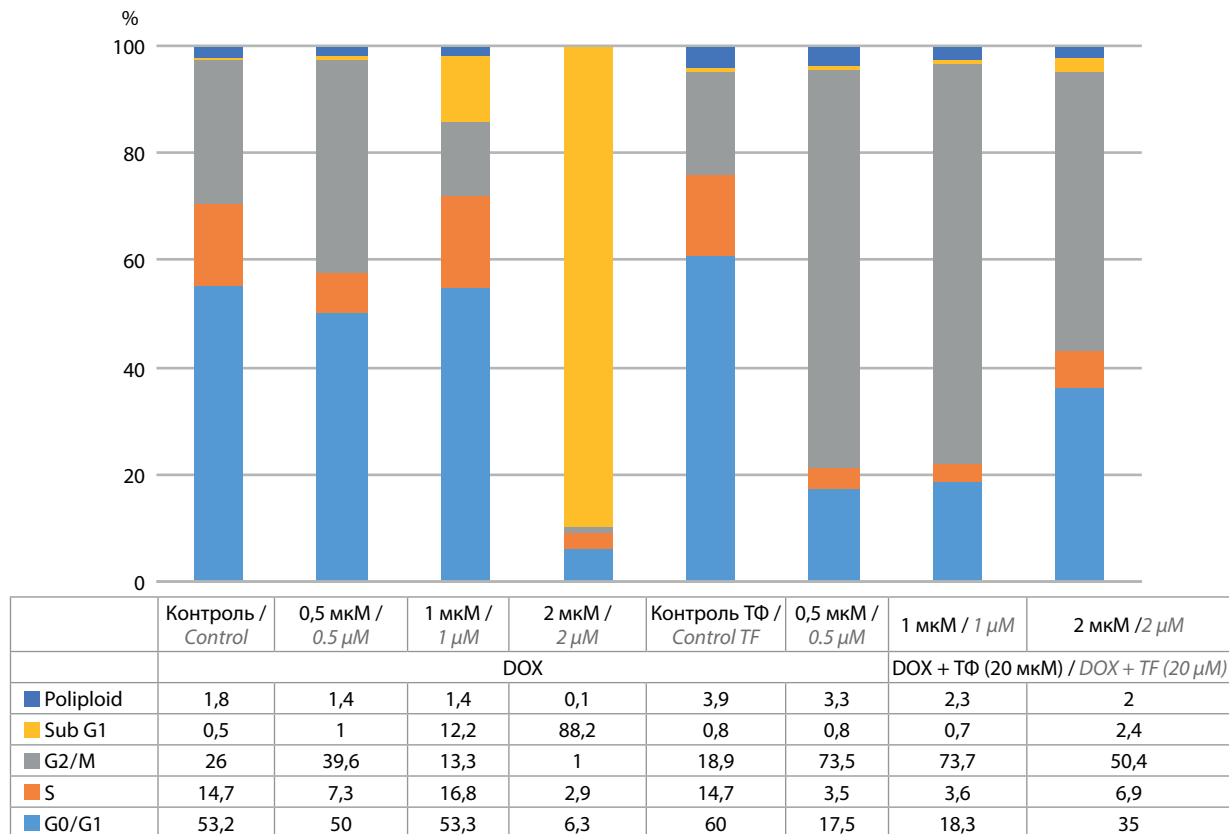


Рис. 3. Распределение клеток B16/F10 по фазам клеточного цикла после воздействия на клетки DOX ± ТФ в течение 48 ч

Fig. 3. Cell cycle phase distribution of B16/F10 cells after treatment with DOX ± TF for 48 hours

механизму апоптоза [14, 15]. Одним из маркеров начального этапа индукции апоптоза по митохондриальному пути является появление Sub-G₁-пика при исследовании клеточного цикла методом точной цитофлуорометрии.

По нашим данным, представленным на рис. 3, в популяции клеток меланомы линии B16/F10 после воздействия DOX (0,5, 1 и 2 мкМ) в течение 48 ч фракция клеток в Sub-G₁-фазе составляет 1, 12,2 и 88 % соответственно по сравнению с 0,5 % таковой в отсутствие AA. В присутствии ТФ (20 мкМ) количество «апоптотических» клеток в ответ на DOX (2 мкМ) остается на низком уровне (2,4 %). Таким образом, ТФ способен защищать клетки меланомы линии B16/F10 на ранних этапах апоптоза по митохондриальному пути, индуцированного DOX. Известно, что DOX, будучи интеркалятором ДНК и ингибитором Торо II, способен вызывать сшивки и разрывы в ДНК, следствием чего является нарушение митоза: остановка в S-фазе, накопление клеток в фазе G₂ клеточного цикла и в дальнейшем – арест пролиферации клеток [24]. По нашим данным, количество клеток в исходной популяции линии B16/F10 в фазе G₂/M составляет 26 %. При концентрации DOX в среде инкубации 0,5 мкМ данная фракция клеток

возрастает до 39 %, а при концентрации AA 1 и 2 мкМ снижается до 13 и 1 % соответственно. В присутствии ТФ (20 мкМ) в тех же условиях мы наблюдаем резкое возрастание фракции клеток в фазе G₂/M до 73 % (DOX 0,5, 1 мкМ). Доля клеток в блоке G₂/M при концентрации DOX 2 мкМ составляет 50 % и не возвращается к контрольным величинам. Таким образом, в присутствии ТФ механизм защиты клеток меланомы линии B16/F10 от токсичности DOX (индукция апоптоза) коррелирует с остановкой клеток в фазе G₂/M. Такие клетки, как известно, приобретают фенотип SLC, для которого характерны морфологические (увеличение размера, разбухание ядер, появление микроядер) и биохимические (увеличение активности фермента β-галактозидазы лизосом) признаки [16, 34].

По нашим данным, индукция SLC-фенотипа в клетках B16/F10 после воздействия DOX (0,625 мкМ) сопровождается набуханием клеток и увеличением в них количества лизосом, о чем свидетельствуют «синие» клетки с высокой экспрессией фермента β-галактозидазы, выявленные с помощью X-GAL-реактанта (рис. 4б). В популяции клеток, обработанных комбинацией DOX + ТФ (20 мкМ), количество «синих» клеток возрастает. При концентрации DOX

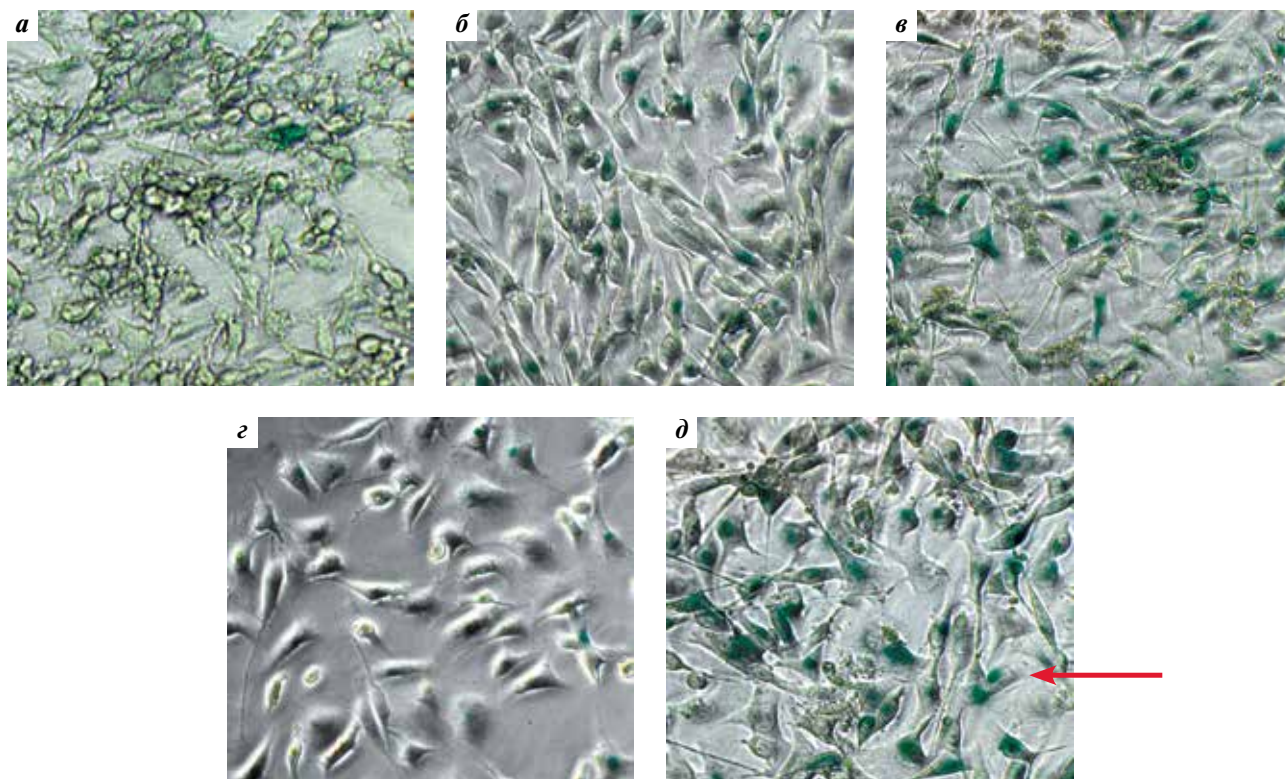


Рис. 4. Экспрессия β -галактозидазы в клетках линии B16/F10 после воздействия на них DOX \pm TF в течение 48 ч: а – при отсутствии препаратов; б – DOX 0,6 мкМ; в – DOX 0,6 мкМ + TF 20 мкМ; г – DOX 1,2 мкМ; д – DOX 1,2 мкМ + TF 20 мкМ; красная стрелка указывает на клетки, окрашенные на β -галактозидазу

Fig. 4. β -galactosidase expression in B16/F10 cells after treatment with DOX \pm TF for 48 hours: а – without medications; б – DOX (0.6 μ M); в – DOX (0.6 μ M) + TF (20 μ M); г – DOX (1.2 μ M); д – DOX (1.2 μ M) + TF (20 μ M); red arrow shows cells stained for β -galactosidase

(1,25 мкМ) наблюдается гибель клеток, о чем свидетельствует их низкая плотность в лунках, среди оставшихся клеток выявляются редкие варианты с признаками SLC-фенотипа (рис. 4е). В присутствии TF клеточная гибель не наблюдается, и практически все клетки имеют морфологические признаки SLC-фенотипа: увеличенные размеры и экспрессию β -галактозидазы (рис. 4в, г). В этих же условиях единичные «синие» клетки присутствуют в контрольных образцах (рис. 4а, стрелка).

Исследование влияния TF на способность клеток меланомы мышей линии B16/F10 накапливать AA

Согласно данным литературы механизм защиты клеток от токсичности AA в присутствии TF/FePPIX может быть связан со способностью модулятора снижать накопление препаратов опухолевыми клетками [28, 31, 33]. Учитывая эти сведения, мы исследовали влияние TF/FePPIX на накопление AA опухолевыми клетками линии B16/F10.

По нашим данным, при кратковременной инкубации клеток с C^{14} -даунорубицином величина накопления AA клетками B16/F10 составляет 8765 ± 869 имп/ч, в присутствии TF (10 мкМ) она снижается на 32 % (5926 ± 192), а в присутствии FePPIX (10 мкМ) –

на 20 % (7111 ± 695). Таким образом, оба модулятора TF и FePPIX являются ингибиторами накопления AA клетками B16/F10, но эффективность TF в 1,5 раза выше по сравнению с FePPIX. В условиях комбинирования двух модуляторов уровень накопления AA соответствует величине, характерной для TF (5539 ± 643) (рис. 5), что свидетельствует о конкурентном типе взаимодействия модуляторов с белками-мишенями AA.

Снижение способности клеток B16/F10 в присутствии TF накапливать AA может свидетельствовать о том, что TF вмешивается в механизм действия DOX уже на уровне поступления его в клетки. Таким образом, в исследованиях *in vitro* нами показано, что TF является модулятором токсичности DOX для клеток меланомы мышей линии B16/F10. Установлено, что ведущим механизмом гибели опухолевых клеток линии B16/F10 при воздействии на них DOX является апоптоз. В присутствии TF наблюдается защита клеток меланомы от индукции апоптоза уже на ранних этапах поступления AA в клетку путем переключения на программу преждевременного старения.

На следующем этапе исследования предстояло выяснить, сохраняется ли защитный эффект TF, выявленный *in vitro*, в условиях *in vivo*. Для решения этой задачи

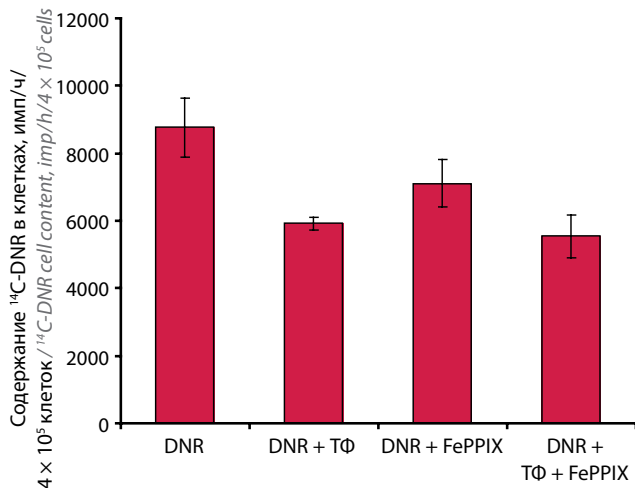


Рис. 5. Накопление ¹⁴C-даунорубицина клетками линии B16/F10 в присутствии и без ТФ/FePPIX. DNR – даунорубицин, ТФ – терафтал, FePPIX – гемин

Fig. 5. ¹⁴C-daunorubicin accumulation in B16/F10 cells with and without TF/FePPIX. DNR – daunorubicin, TF – teraftal, FePPIX – hemin

мы использовали сингенную экспериментальную модель (перевиваемую опухоль меланомы мышей MelB16) и исследовали влияние ТФ на эффективность лечения DOX.

Исследование влияния ТФ на противоопухолевую активность DOX относительно перевиваемой опухоли мышей MelB16

Согласно данным, представленным в таблице, в 1-й группе (контрольной) наблюдался быстрый рост опухоли: на 7-е сутки – 827 (±69) мм³, 10-е – 2498

(±313) мм³, 14-е – 5734 (±347) мм³, 17-е – 8934 (±486) мм³ после трансплантации опухоли. Во 2-й группе (DOX) объемы опухолей на 7-е сутки – 524 (±34) мм³, 10-е – 1658 (±204) мм³, 14-е – 3769 (±142) мм³, 17-е – 8323 (±471) мм³ после трансплантации опухоли. ТРО на 5, 8, 12, 15-е сутки после окончания лечения – 37, 34, 34 и 7 % соответственно. В 3-й группе (DOX + ТФ без временного интервала между введением препаратов) объемы опухолей на 7-е сутки: 501 (±39) мм³, 10-е – 1542 (±151) мм³, 14-е – 4057 (±256) мм³, 17-е – 7884 (±1144) мм³ после трансплантации опухоли. ТРО на 5, 8, 12, 15-е сутки после окончания лечения: 39, 38, 29 и 12 % соответственно. В 4-й группе (DOX + ТФ с интервалом между введением препаратов 2,5 ч) объемы опухолей на 7-е сутки – 533 (±159) мм³, 10-е – 1581 (±159) мм³, 14-е – 3856 (±293) мм³, 17-е – 8147 (±253) мм³. ТРО на 5, 8, 12, 15-е сутки после окончания лечения – 36, 37, 33 и 9 % соответственно. Результаты представлены в таблице и достоверны при $p < 0,05$ на 7, 10, 14 и 5, 8, 12-е сутки соответственно. Таким образом, во всех группах мышей, получавших как один DOX, так и АА в комбинации с ТФ, наблюдался слабый противоопухолевый эффект (29–39 %), который практически полностью снижался к 15-м суткам.

Заключение

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что ТФ снижает токсичность DOX для клеток меланомы мышей B16/F10 в условиях *in vitro* и не влияет на эффективность лечения препаратом перевиваемой опухоли мышей MelB16.

Терапевтический эффект DOX относительно меланомы мышей MelB16 в присутствии и без ТФ

Therapeutic effect of DOX for MelB16 murine melanoma with and without TF

Группа Group	Средний объем опухоли после трансплантации, мм ³ Mean tumor volume a day after transplantation				ТРО после лечения, % TGI % a day after treatment			
	сутки day							
	7-е	10-е	14-е	17-е	5-е	8-е	12-е	15-е
Контроль 0,2 мл физраствора Control 0.2 ml of normal saline	*827 ± 69	*2498 ± 313	*5734 ± 347	8934 ± 486				
DOX 8 мг/кг DOX 8 mg/kg	*524 ± 34	*1658 ± 204	*3769 ± 142	8323 ± 471	*37	*34	*34	7
ТФ 25 мг/кг + DOX 8 мг/кг без интервала TF 25 mg/kg + DOX 8 mg/kg at the same time	*501 ± 39	*1542 ± 151	*4057 ± 256	7884 ± 1144	*39	*38	*29	12
DOX 8 мг/кг + ТФ 25 мг/кг через 2,5 ч DOX 8 mg/kg + TF 25 mg/kg 2.5 hours later	*533 ± 159	*1581 ± 159	*3856 ± 293	8147 ± 253	*36	*37	*33	9

* $p < 0,05$ на 7, 10, 14 и 5, 8, 12-е сутки соответственно.

* $p < 0.05$ for 7, 10, 14 and 5, 8, 12th day, respectively.

Примечание. DOX – доксорубицин, ТФ – терафтал.

Note. DOX – doxorubicin, TF – teraftal.

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

- Arcamone F.M. Fifty years of chemical research at Farmitalia. *Chemistry* 2009;15(32):7774–91. DOI: 10.1002/chem.200900292.
- Gewirtz D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999;57:727–41. DOI: 10.1016/s0006-2952(98)00307-4.
- Doroshov J.H. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res* 1983;43(10):4543–51.
- Kagan V.E., Bayir H.A., Belikova N.A. et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* 2009;46(11):1439–53. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.
- Tarasiuk J., Frézard F., Garnier-Suillerot A., Gattegno L. Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear concentration. *Biochim Biophys Acta* 1989;1013(2):109–17. DOI: 10.1016/0167-4889(89)90038-4.
- Swift L.P., Rephaeli A., Nudelman A. et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 2006;66(9):4863–71. DOI: 10.1158/0008-5472.can-05-3410.
- Skladanowski A., Konopa J. Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochem Pharmacol* 1994;47(12):2269–78. DOI: 10.1016/0006-2952(94)90265-8.
- Tewey K.M., Rowe T.C., Yang L. et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science* 1984;226(4673):466–8. DOI: 10.1126/science.6093249.
- Hajji N., Mateos S., Pastor N. et al. Induction of genotoxic and cytotoxic damage by aclarubicin, a dual topoisomerase inhibitor. *Mutat Res* 2005;583(1):26–35. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.01.012.
- Mordente A., Meucci E., Martorana G.E. et al. Topoisomerases and Anthracyclines: Recent Advances and Perspectives in Anticancer Therapy and Prevention of Cardiotoxicity. *Curr Med Chem* 2017;24(15):1607–26. DOI: 10.2174/0929867323666161214120355.
- Dartsch D.C., Schaefer A., Boldt S. et al. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis* 2002;7(6):537–48. DOI: 10.1023/a:1020647211557.
- Bogason A., Bhuiyan H., Masquelier M. et al. Uptake of anthracyclines *in vitro* and *in vivo* in acute myeloid leukemia cells in relation to apoptosis and clinical response. *Eur J Clin Pharmacol* 2009;65(12):1179–86. DOI: 10.1007/s00228-009-0734-4.
- Koceva-Chyla A., Jedrzejczak M., Skierski J. et al. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis* 2005;10(6):1497–514. DOI: 10.1007/s10495-005-1540-9.
- Olszewska-Slonina D., Drewa T., Czajkowski R., Olszewski K. Effect of adriablastin on viability, cell cycle and apoptosis in B16 and cloudman s91 mouse melanoma cells *in vitro*. *Acta Pol Pharm* 2004;61(6):439–46.
- Itzhaki O., Kaptzan T., Skutelsky E. et al. Age-adjusted antitumoral therapy based on the demonstration of increased apoptosis as a mechanism underlying the reduced malignancy of tumors in the aged. *Biochim Biophys Acta* 2004;1688(2):145–59. DOI: 10.1016/j.bbdis.2003.11.009.
- Chang B.D., Broude E.V., Dokmanovic M. et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res* 1999;59:3761–7.
- te Poele R.H., Okorokov A.L., Jardine L. et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 2002;62(6):1876–83.
- Rogalska A., Koceva-Chyla A., Józwiak Z. Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. *Chem Biol Interact* 2008;176(1):58–70. DOI: 10.1016/j.cbi.2008.07.002.
- Litwiniec A., Grzanka A., Helmin-Basa A. et al. Features of senescence and cell death induced by doxorubicin in A549 cells: organization and level of selected cytoskeletal proteins. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136(5):717–36. DOI: 10.1007/s00432-009-0711-4.
- Eom Y.W., Kim M.A., Park S.S. et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene* 2005;24(30):4765–77. DOI: 10.1038/sj.onc.1208627.
- Joyner D.E., Bastar J.D., Randall R.L. Doxorubicin induces cell senescence preferentially over apoptosis in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *J Orthop Res* 2006;24(6):1163–9. DOI: 10.1002/jor.20169.
- Zingoni A., Cecere F., Vulpis E. et al. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *J Immunol* 2015;195(2):736–48. DOI: 10.4049/jimmunol.1402643.
- Däbritz J.H., Yu Y., Milanovic M. et al. CD20-Targeting Immunotherapy Promotes Cellular Senescence in B-Cell Lymphoma. *Mol Cancer Ther* 2016;15(5):1074–81. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0627.
- Forrest R.A., Swift L.P., Rephaeli A. et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem Pharmacol* 2012;83(12):1602–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.02.026.
- Gewirtz D.A., Alotaibi M., Yakovlev V.A., Povirk L.F. Tumor Cell Recovery from Senescence Induced by Radiation with PARP Inhibition. *Radiat Res* 2016;186(4):327–32. DOI: 10.1667/rr14437.1.
- Svensson S.P., Lindgren S., Powell W., Green H. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment Cell Res* 2003;4:351–4. DOI: 10.1034/j.1600-0749.2003.00030.x.
- Heaney M.L., Gardner J.R., Karasavas N. et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res* 2008;68(19):8031–8. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-1490.
- Tsiftoglou A.S., Wong W., Wheeler C. et al. Prevention of anthracycline-induced cytotoxicity in hemopoietic cells by hemin. *Cancer Res* 1986;46(7):3436–40.
- Papadopoulou L.C., Tsiftoglou A.S. Effects of hemin on apoptosis, suppression of cytochrome c oxidase gene expression, and bone-marrow toxicity induced by doxorubicin (adriamycin). *Biochem Pharmacol* 1996;52(5):713–22. DOI: 10.1016/0006-2952(96)00349-8.
- Nagai T., Kikuchi S., Ohmine K. et al. Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J Cell Biochem* 2008;104(2):680–91. DOI: 10.1002/jcb.21659.
- Böhmer R.M., Hoffmann K., Morstyn G. Hematoporphyrin derivative and anthracyclines mutually inhibit cellular uptake and toxicity. *Cancer Chemother*

- Pharmacol 1987;20(1):16–20.
DOI: 10.1007/bf00252953.
32. Сидорова Т.А., Какпакова Е.С., Вла-сенкова Н.К. и др. Различная реакция на терафтал культивируемых *in vitro* клеток, экспрессирующих Р-глико-протеин, и клеток, не экспрессирую-щих этот белок. Цитология 2001;43:889–90. [Sidorova T.A., Какпакова Е.С., Vlasenkova N.K. et al. the different reaction *in vitro* the cell cultures, expressed or not Р-glycoprotein, to teraphtal. Tsitologiya = Cytology 2001;43:889–90. (In Russ.)].
33. Сидорова Т.А., Рябая О.О., Татар-ский В.В. и др. Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситаллоцианина кобальта снижает чувствительность опухолевых клеток к антрациклино-вым антибиотикам и митоксантрону *in vitro*. Клиническая онкогематоло-гия 2018;1:10–25. DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-10-25. [Sidorova T.A., Ryabaya O.O., Tatarskiy V.V. et al. Teraphtal (sodium salt of 4,5-carboxyphtalocyanin-cobalt) decreased the sensitivity tumor cells to anthracyclines and mithoxantrone *in vitro*. Klinicheskaya onkologiya = Clinical Oncohematology 2018;1:10–25. (In Russ.)].
34. Anigo E.C., George B.P.A., Abrahamse H. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with Doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2017;17(8):693–702. DOI: 10.1080/14737140.2017.1347505.
35. Сидорова Т.А., Вагида М.С., Калия О.Л., Герасимова Г.К. Роль ка-талазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуци-рованного бинарной каталитической системой («терафтал + аскорбиновая кислота»). Клиническая онкогемато-логия 2014;3:282–289. [Sidorova T.A., Vagida M.S., Kaliya O.L., Gerasimova G.K. The part of catalase in defence against oxydaive stress of cancer cells induced by binaric catalytic system. Klinicheskaya onkologiya = Clinical oncohematology 2014;3:282–9 (In Russ.)].
36. Dimri G.P., Lee X., Basile G. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(20):9363–7. DOI: 10.1073/pnas.92.20.9363.
37. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических иссле-дований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012, Ч.1. С.642–56. [Mironov A.N., Bunatyan N.D., Vasil'yev A.N. et al. Guidelines for pre-clinical trials of drugs . М.: 2012, v.1. P.642–56. (In Russ.)].
38. Forrest R.A., Swift L.P., Rephaeli A. et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. Biochem Pharmacol 2012;83(12):1602–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.02.026.

Вклад авторов

Т.А. Сидорова: концепция и дизайн исследования;
Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: сбор и обработка данных;
Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: предоставление ма-териалов исследования;
Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, В.В. Татарский, Н.А. Андропова, В.И. Романенко, Д.А. Хоченков: анализ и интерпрета-ция данных;
Т.А. Сидорова: подготовка рукописи.

Authors' contributions

T.A. Sidorova: study concept and design;
T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov: data accumulation and processing;
T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov: provision of study materials;
T.A. Sidorova, O.O. Ryabaya, A.A. Prokofieva, V.V. Tatarskiy, N.A. Andronova, V.I. Romanenko, D.A. Khochenkov: data analysis and interpretation;
T.A. Sidorova: manuscript preparation.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Сидорова/T.A. Sidorova: <https://orcid.org/0000-0003-3498-061X>
О.О. Рябая/O.O. Ryabaya: <https://orcid.org/0000-0001-6295-3497>
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.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИР 01201373454 «Идентификация новых молекулярных механизмов роста и прогрессии меланомы кожи человека».

Funding. The study was performed as part of the research project 01201373454 “Identification of new molecular mechanisms of human skin melanoma growth and progression”.

Статья поступила: 10.10.2018. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 10.10.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИФИТОАДАПТОГЕНА НА ЛЕЙКОЦИТАРНУЮ ИНФИЛЬТРАЦИЮ ГЕПАТОКАРЦИНОМ МЫШЕЙ

Р.В. Карпова¹, Е.В. Бочаров¹, О.А. Бочарова¹, И.В. Казеев¹, В.Г. Кучеряну², Ю.Н. Соловьев¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Регина Васильевна Карпова planta39@rambler.ru

Цель исследования — морфологическое изучение ткани печени мышей линии СВА на разных этапах онтогенеза и при лечебном воздействии жидкой формы мультифитоадаптогена.

Материалы и методы. Объект исследования — образцы печени мышей-самцов линии СВА (сублиния СВА/ЛасУ). Опытные мыши получали (курсами) 10 % водный раствор мультифитоадаптогена с 6-месячного возраста до естественной гибели животных. Образцы ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине и заключали в парафин. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином. Определяли строение печени, а также степень лейкоцитарной инфильтрации в опухолевой ткани.

Результаты. У мышей-самцов СВА были выявлены опухоли, по морфологическому строению представляющие собой умеренно-дифференцированные трабекулярные гепатокарциномы (в возрасте 8 мес) и низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы (в возрасте 22 мес). У опытных животных в обеих временных точках в гепатокарциномах морфологически определена лейкоцитарная инфильтрация, которую оценивали количественно. Более высокий уровень лейкоцитарной инфильтрации у животных в опыте сочетался с деструктивными процессами в опухоли.

Заключение. Лейкоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей-самцов СВА может иметь значение для снижения частоты опухолеобразования у животных высокоракковых линий.

Ключевые слова: гепатокарцинома, лейкоцитарная инфильтрация, мыши-самцы СВА, фитоадаптогены (женьшень, родиола, элеутерококк)

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-60-65

THE INFLUENCE OF MULTIPHYTOADAPTOGEN ON LEUKOCYTE INFILTRATION IN MICE HEPATOCARCINOMAS

R. V. Karpova¹, E. V. Bocharov¹, O. A. Bocharova¹, I. V. Kazeev¹, V. G. Kucheryanu², Yu. N. Soloviev¹

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

24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Institute of general pathology and pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

The aim of this study was the morphological investigation of the CBA mice liver tissue at different stages of ontogenesis as well as during liquid form multiphytoadaptogen therapeutic administration.

Materials and methods. The study objects are the liver samples of CBA male mice (subline CBA/LacY). Experimental animals received a 10 % solution of multiphytoadaptogen from 6 months of age until natural death. Tissue samples were fixed in neutral buffered formalin and embedded in paraffin. Sections from paraffin blocks were stained with hematoxylin and eosin. The structure of the liver tumours was determined as well as the quantitative degree of leukocyte infiltration in the tumour tissue.

Results. The tumours morphologically structured as moderately differentiated trabecular hepatocarcinomas (at 8 months of age) and low differentiated trabecular-acinar hepatocarcinomas (aged 22 months) were revealed in CBA male mice. Higher level of leukocyte infiltration in hepatocarcinomas of experimental animals was determined.

Conclusion. Leukocyte infiltration may be important for antitumour immune reaction as well as for reduction of the tumour formation incidence in high-cancer mice.

Key words: hepatocarcinomas, leukocyte infiltration, CBA male mice, phytoadaptogens (ginseng, rhodiola, eleutherococcus)

Введение

Снижение активности иммунных эффекторов в отношении опухолевых клеток может быть обусловлено ослаблением контактных взаимодействий гистонеспецифических мембраносвязанных молекул адгезии ICAM-1 с их лигандами – лейкоцитарными интегринами, в частности LFA-1 и Mac-1 [1–3]. Вместе с тем предполагается участие цитокинов в прогрессии и метастазировании опухолей. Так, повышенный уровень интерлейкинов (ИЛ) 6 и 10 сопровождается подавлением противоопухолевых иммунных реакций [4, 5].

Данная работа продолжает серию статей, посвященных изучению нарушения адгезионных взаимодействий между клетками иммунной системы и опухолью с участием цитокинов ИЛ-6 и -10, а также возможности их коррекции на примере воздействия нетоксичного мультифитоадаптогена (МФА). Известна способность фитоадаптогенов регулировать межклеточную адгезию, нормализуя процессы дифференцировки тканей, усиливать иммунологическую реактивность организма в отношении опухолей, проявляя противоопухолевый эффект [6, 7].

В предыдущих работах на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей-самцов линии СВА [8] было показано, что развитие опухолей сопровождается снижением в онтогенезе экспрессии лейкоцитарных интегрин LFA-1 и Mac-1, а также возрастанием сывороточного уровня супрессорных ИЛ-6 и -10. Воздействие МФА как в профилактическом режиме (в течение 1-го месяца жизни), так и в лечебном (с возраста 6 мес до естественной гибели животных) приводило к долговременному усилению экспрессии LFA-1 и Mac-1, подавлению сывороточного уровня ИЛ-6 и -10, снижению уровня наследственного опухолеобразования (количества и размеров гепатокарцином по сравнению с животными контрольной группы) [9, 10].

При морфологическом исследовании гепатокарцином животных, получавших МФА профилактически, в опухолевой ткани была определена лейкоцитарная инфильтрация, а также выявлены деструктивные участки [11].

Цель исследования – морфологическое изучение ткани печени мышей-самцов линии СВА на разных этапах онтогенеза при лечебном воздействии жидкой формы МФА.

Материалы и методы

В исследование были включены опытная ($n = 80$) и контрольная ($n = 90$) группы мышей-самцов линии СВА (сублиния СВА/Лас У). Источник получения животных – локальная колония Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Мыши контрольной группы по-

лучали в качестве питья воду, животные опытной группы – 10 % водный раствор МФА с возраста 6 мес (периода появления первых опухолей) до естественной гибели животных.

Мышей (по 15 из каждой группы) выводили из эксперимента в возрасте 4, 8, 22 мес. Остальные животные находились под наблюдением до их естественной гибели. Образцы ткани печени фиксировали в нейтральном забуференном формалине и заключали в парафин. Срезы с парафиновых блоков окрашивали гематоксилином и эозином для проведения гистологического исследования.

При оценке гистологических препаратов определяли строение печени, а также степень лейкоцитарной инфильтрации в опухолевой ткани.

Количественную оценку лейкоцитарной инфильтрации проводили путем подсчета у каждого животного числа клеток не менее чем в 10 репрезентативных полях зрения в областях наиболее интенсивного окрашивания при увеличении микроскопа 400. Определяли среднее количество клеток в 1 поле зрения. Затем оценивали средний показатель с учетом общего числа животных в группе.

Мультифитоадаптоген – стандартизованная фармацевтическая композиция на основе компонентов экстрактов 40 растений (включая фитоадаптогены женьшень, элеутерококк, родиолу розовую и др.), в состав которых входят в том числе соединения фенольной природы (флавоноиды, тритерпеновые гликозиды и др). МФА обладает антиоксидантными, антимуtagenными, антистрессорными, гормономодулирующими, противоопухолевыми, иммуномодулирующими, в том числе адгезиогенными и интерферогенными свойствами [12–17].

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0.

Результаты

У животных обеих групп в возрасте 4 мес опухолей не выявлено. Примеры микропрепаратов ткани печени животных контрольной и опытной групп в этом возрасте изображены на рис. 1. Представленная морфологическая картина характерна для нормальной ткани печени. При этом у животных 2 групп она не различалась.

Примеры строения гепатом у мышей обеих групп в возрасте 8 мес приведены на рис. 2. Опухоли представляют собой умеренно дифференцированные трабекулярные гепатокарциномы – опухолевые клетки с относительно крупными ядрами образуют тяжи и трабекулы. В опухолевой ткани животных контрольной группы выявлены единичные лейкоциты (см. рис. 2а). На гистологическом срезе гепатокарциномы опытного животного (см. рис. 2б) видна инфильтрация опухоли лейкоцитами (судя по однородным

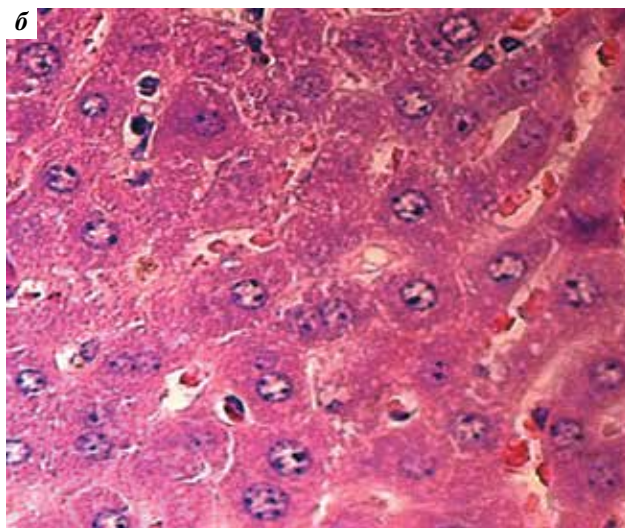
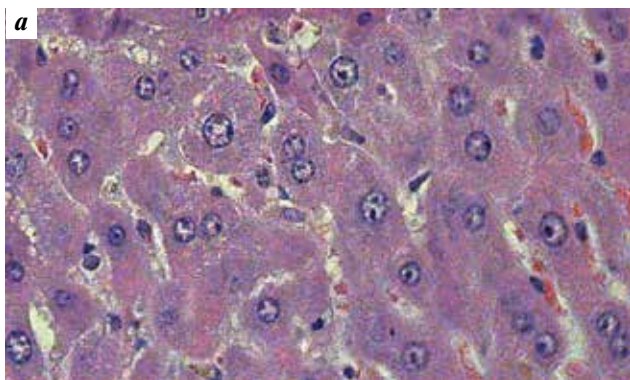


Рис. 1. Микроскопическое строение ткани печени животного в возрасте 4 мес: а – контрольной группы; б – опытной группы. Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Fig. 1. Microscopic structure of the animal's liver at 4 months of age: а – control group; б – study group. Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$

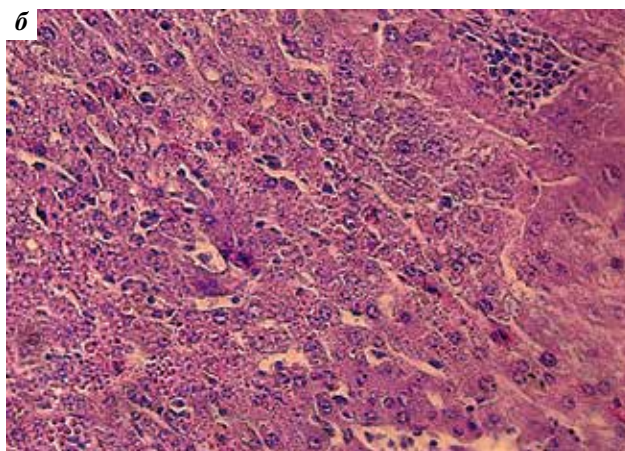
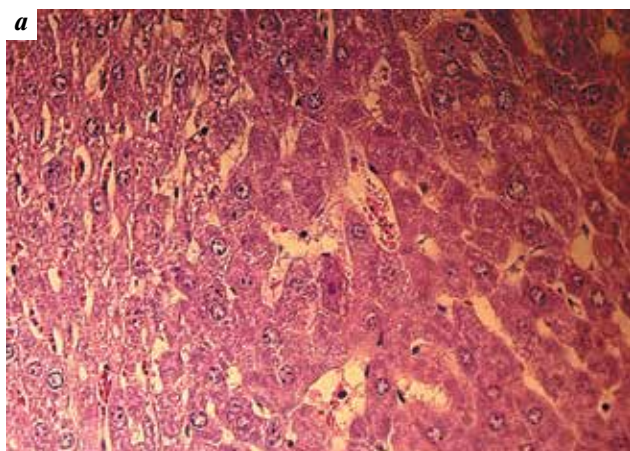


Рис. 2. Умеренно-дифференцированная трабекулярная гепатокарцинома у мышей СВА в возрасте 8 мес: а – образец печени контрольного животного; б – образец печени животного опытной группы (под воздействием мультифитоадаптогена). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Fig. 2. Moderately differentiated trabecular hepatocellular carcinoma in CBA mice aged 8 months: а – liver sample of a control animal; б – liver sample of a study animal (under the effect of multiphytoadaptogen). Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$

крупным клеточным ядрам, активированными лимфоцитами) в виде тяжей или локальных скоплений клеток.

На рис. 3 продемонстрированы примеры гистологических препаратов опухолей мышей обеих групп в позднем онтогенезе (в возрасте 22 мес). В данном случае визуализируются низкодифференцированные опухоли смешанного строения – трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы. Полиморфные клетки, расположенные в виде трабекул, имеют гиперхромные ядра, между трабекулами располагаются атипичные полости (ацинусы). У мышей опытной группы, получавших МФА в лечебном режиме, на срезе опухолевой ткани (см. рис. 3б) видны участки, инфильтрированные лейкоцитами. У животных контрольной группы лейкоцитарную инфильтрацию наблюдали в минимальных количествах.

В таблице приведены количественные показатели инфильтрации гепатокарцином лейкоцитами у мышей обеих групп в возрасте 8 и 22 мес. У контрольных животных как в 8 мес, так и в 22 мес в поле зрения наблюдались единичные лейкоциты ($1,3 \pm 0,1$ и $2,3 \pm 0,2$ клетки соответственно). У мышей опытной группы, получавших МФА с 6 мес, лейкоцитарная инфильтрация гепатокарцином более многочисленна в обоих возрастных периодах ($12,1 \pm 1,0$ и $123,6 \pm 11,0$ соответственно).

Следует отметить, что в контрольной группе животных частота опухолеобразования в возрасте 22 мес составила 100 %, в то время как у животных 2-й группы в этом возрасте частота опухолеобразования (70 %) была статистически достоверно ниже. При этом средний объем опухолевой массы на мышь также был достоверно ниже, чем в контрольной группе [10].

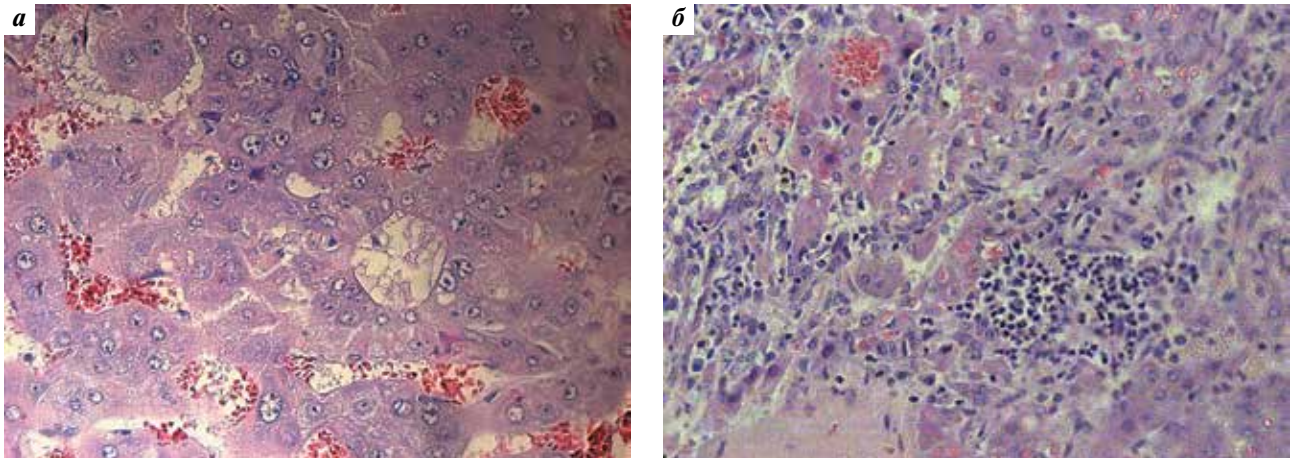


Рис. 3. Трабекулярно-ацинарная гепатокарцинома у мышей СВА в возрасте 22 мес: а – образец печени контрольного животного; б – образец печени животного опытной группы (под воздействием мультифитоадаптогена). Окраска гематоксилином и эозином; $\times 400$

Fig. 3. Trabecular acinar hepatocellular carcinoma in CBA mice aged 22 months: a – liver sample of a control animal; б – liver sample of a study animal (under the effect of multiphytoadaptogen). Hematoxylin and eosin staining; $\times 400$

Количественные показатели инфильтрации гепатокарцином лейкоцитами под воздействием мультифитоадаптогена у мышей СВА в возрасте 8 и 22 мес

Quantitative characteristics of hepatocellular carcinoma infiltration by leukocytes under the effect of multiphytoadaptogen in CBA mice aged 8 and 22 months

Группы Groups	Число мышей, n Number of mice, n	Возраст мышей, мес Age of mice, months	Количество ОИЛ в поле зрения ($M \pm m$) Number of TIL in the field of vision ($M \pm m$)	Min–Max количество ОИЛ в поле зрения Min–Max number of TIL in the field of vision
Контрольная группа Control group	15	8	$1,3 \pm 0,1$	0–3
	15	22	$2,3 \pm 0,2$	0–5
Мультифито-адаптоген с 6 мес Multiphytoadaptogen since age 6 months	15	8	$12,1 \pm 1,0$	0–40
	15	22	$123,6 \pm 11,0$	10–570

Примечание. ОИЛ – опухолеинфильтрирующие лейкоциты.
Note. TIL stands for tumor-infiltrating leukocytes.

Данные результаты указывают на то, что наличие опухолеинфильтрирующих лейкоцитов в гепатокарциномах мышей при воздействии МФА может иметь значение для подавления опухолевого процесса.

Вместе с тем наличие лейкоцитарной инфильтрации гепатокарцином у мышей СВА под воздействием МФА в лечебном режиме сочеталось с нормализацией иммуноадгезионных параметров, а именно с повышением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови и снижением сывороточного содержания соответствующих цитокинов (ИЛ-6 и -10) [9].

Обсуждая полученные результаты, следует отметить, что миграция в опухолевую ткань активированных лимфоцитов может служить положительным прогностическим признаком опухолевого процесса [18, 19].

Результаты ряда исследователей говорят в пользу того, что инфильтрация опухоли цитотоксическими

лимфоцитами может быть обеспечена усилением экспрессии лейкоцитарных интегринов, в том числе LFA-1 и Mac-1. Вместе с тем и молекулы адгезии ICAM-1, -2, -3, выступающие в роли контррецепторов лейкоцитарных интегринов на клетках опухоли, также могут индуцировать их экспрессию при участии ряда цитокинов (ИЛ-6, -10, -12, интерферона- γ , фактора некроза опухоли и др.) [20].

Очевидно, снижение частоты опухолеобразования у мышей СВА при лечебном воздействии жидкой формы МФА можно объяснить в том числе выраженной лейкоцитарной инфильтрацией гепатокарцином.

Однако на данном этапе работы остался невыявленным фенотип клеток, инфильтрирующих опухоль, а также вопрос о том, экспрессированы ли на этих клетках, в частности, молекулы лейкоцитарных интегринов при использовании МФА. Этот вопрос будет являться предметом дальнейших исследований.

Вместе с тем можно предположить, что в данном случае в опухоль мигрируют цитотоксические CD8⁺-лимфоциты, что согласуется с подавлением образования гепатокарцином в опытной группе. Также важно проследить корреляционную связь инфильтрации опухоли лимфоцитами с продолжительностью жизни мышей СВА, предрасположенных к спонтанному образованию гепатом.

Выводы

Лейкоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей-самцов линии СВА под воздействием жидкой формы МФА в лечебном режиме (начиная с возраста 6 мес и до естественной гибели животных) может иметь значение для снижения частоты опухолеобразования у высокоракковых животных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочарова О.А., Карпова Р.В. Адгезия в биологии рака. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(3):55–60. [Bocharova O.A., Karpova R.V. Adhesion in cancer biology. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2006;5(3):55–60 (In Russ.)].
2. Ramos T.N., Bullard D.C., Barnum S.R. ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. J Immunol 2014;192(10):4469–74. DOI: 10.4049/jimmunol.1400135.
3. Mitsou I., Mulhaupt H., Couchman J.R. Proteoglycans, ion channels and cell-matrix adhesion. Biochem J 2017;474(12):1965–79. DOI: 10.1042/BCJ20160747.
4. Brady J., Carotta S., Thong R. et al. The interactions of multiple cytokines control NK cell maturation. J Immunol 2010;185(11):6679–88. DOI: 10.4049/jimmunol.0903354.
5. Pop V.V., Seicean A., Lupan I. et al. IL-6 roles – Molecular pathway and clinical implication in pancreatic cancer – A systemic review. Immunol Lett 2017;181:45–50. DOI: 10.1016/j.imlet.2016.11.010.
6. Guo, L., Song L., Wang Z. et al. Panaxydol inhibits the proliferation and induces the differentiation of human hepatocarcinoma cell line HepG2. Chem Biol Interact 2009;181(1):138–43. DOI: 10.1016/j.cbi.2009.04.015.
7. Shanmugam M.K., Lee J.H., Chai E.Z. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. Semin Cancer Biol 2016;40–1:35–47. DOI: 10.1155/2018/1617202.
8. Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линийных мышей. Экспериментальная онкология 1983;5(3):39–42. [Modyanova E.A., Bocharova O.A., Malenkov A.G. The kontaktins-chalones preventive action on spontaneous carcinogenesis in mice inbred strains. Eksperimentalnaya onkologiya = Experimental oncology 1983;5(3):39–42. (In Russ.)].
9. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегринны при гепатоканцерогенезе мышей высокоракковой линии СВА. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(3):53–6. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Il'yenko V.A. et al. Leukocyte integrins at hepato carcinogenesis in high-cancer CBA strain of mice. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(3):53–6. (In Russ.)].
10. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновение гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракковых мышей СВА. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):73–6. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Reduced occurrence of hepatomas in phytoadaptogen exposed high-cancer CBA strain of mice. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(2):73–6. (In Russ.)].
11. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Вершинская А.А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высокоракковой линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):85–90. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Verzhinskaya A.A. et al. Hepatocarcinomas infiltration lymphocytes in high-cancer CBA mice when multiphytoadaptogen exposed in early postnatal ontogenesis. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):85–90. (In Russ.)].
12. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л. и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции иммуномодулятором. Иммунология 2004;25(1):36–43. [Bocharova O.A., Pozharitskaya M.M., Chekalina T.L. et al. The role of adhesive disorders in the pathogenesis of leukoplakia and the possibility of their correction by a nonspecific immunomodifier. Immunologiya = Immunology 2004;25(1):36–43. (In Russ.)].
13. Чулкова С.В., Бочарова О.А., Клименков А.А. и др. Возможности повышения эффективности комплексного лечения распространенного рака желудка фитоадаптогеном. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(2):85–92. [Chulkova S.V., Bocharova O.A., Klimenkov A.A. et al. Possibilities of increasing the effectiveness of integrated treatment of advanced gastric cancer by phytoadaptogen. Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2006;5(2):85–92. (In Russ.)].
14. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. и др. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006;141(5):495–8. [Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovskiy G.N. et al. Effect of complex phytoadaptogen on MPTP-induced parkinson syndrome in mice. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2006;141(5):495–8. (In Russ.)].
15. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Шейченко В.И. и др. Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата «Фитомикс-40». Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии 2007;5(2):20–5. [Shejchenko O.P., Bocharova O.A., Shejchenko V.I. The possibility of electronic absorption spectra for the multi-component preparation "Phytomix-40" standardization. Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2007;5(2):20–5. (In Russ.)].

16. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии 2012;(10):52–9. [Shejchenko O.P., Bocharova O.A., Kravivkin B.A. et al. Study of complex phytoadaptogen by HPLC method. *Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2012;(10):52–9. (In Russ.)].
17. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. Генетика 2013;49(12):1364–69. [Kurennaaya O.N., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogen antimutagenesis in yeast cells of *Saccharomyces*. *Genetika* = Russian Journal of Genetics 2013;49(12):1364–69 (In Russ.)].
18. Lu, P., Zhu X.Q., Xu Z.L. et al. Increased infiltration of activated tumor-infiltrating lymphocytes after high intensity focused ultrasound ablation of human breast cancer. *Surgery* 2009;145(3):286–93. DOI: 10.1016/j.surg.2008.10.010.
19. Sasada T., Suekane S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance. *Immunotherapy* 2011;3(10):1235–51. DOI: 10.2217/imt.11.106.
20. Oble D., Loewe R., Yu P., Mihm M. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma. *Cancer Immun* 2009;9(3):245–51.

ORCID авторов / ORCID of authors

Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>
Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>
О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>
В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 13.12.2018. Принята в печать: 12.04.2019.
Article received: 13.12.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОТЕЧЕСТВЕННОГО ГИДРОКСИКАРБАМИДА И ПРЕПАРАТА СРАВНЕНИЯ ГИДРЕА

**И.Б. Меркулова¹, Т.В. Абрамова¹, О.И. Коняева¹, Н.Ю. Кульбачевская¹,
Н.П. Ермакова¹, В.А. Чалей¹, А.Ю. Семушкина²**

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии –
МВА им. К.И. Скрябина»; Россия, 109472 Москва, ул. Акад. Скрябина, 23

Контакты: Ирина Борисовна Меркулова Merkulovairina@rambler.ru

Введение. В соответствии с российской федеральной программой по импортозамещению зарубежных лекарственных препаратов качественными российскими препаратами в России воспроизведен препарат гидроксикарбамид (ГК), который проходил в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина доклинические токсикологические и патоморфологические исследования в сравнении с препаратом гидреа (ГД) производства Италии.

Цель исследования – сравнительная патоморфологическая оценка влияния ГК и ГД на внутренние органы крыс для подтверждения их идентичности по морфологическим критериям.

Материалы и методы. В ходе исследования были использованы 70 неинбредных крыс-самцов, по 10 в группе. Ежедневно в течение 5 дней ГК и ГД вводили крысам перорально в одинаковых суммарных дозах, соответствующих 2, 1 и 1/2 максимально переносимой дозы. Контрольным крысам в том же режиме перорально вводили 1 % крахмальный клейстер. Животных выводили из опыта на 3-и и 30-е сутки после окончания введений препаратов. Проводили макроскопическое и гистологическое исследования внутренних органов по общепринятым методикам, включавшим фиксацию материала в 10 % формалине и окраску срезов гематоксилином и эозином. Гистологические препараты внутренних органов исследовали под световым микроскопом при увеличении 100, 400 и 1000.

Результаты. Препараты ГК и ГД в суммарных дозах 3000 и 1500 мг/кг на 3-и сутки после окончания введений вызывали во внутренних органах крыс сходные морфологические изменения разной степени: умеренную гипоплазию в тимусе, костном мозге и селезенке, деструктивные и воспалительные изменения в желудке и двенадцатиперстной кишке и почках. На 30-е сутки после окончания применения ГК и ГД изменения в тимусе, костном мозге и селезенке полностью исчезали, в двенадцатиперстной кишке и почках сохранялись остаточные морфологические изменения, в семенниках крыс – умеренные атрофические изменения. Препараты ГК и ГД в суммарной дозе 750 мг/кг не оказали влияния на внутренние органы крыс.

Заключение. На основании полученных результатов макроскопического и гистологического исследований сделан вывод об аналогичном влиянии ГК и ГД на внутренние органы крыс.

Ключевые слова: гидроксикарбамид, гидреа, крысы, внутренние органы, морфологические изменения

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-66-73

COMPARATIVE PATHOMORPHOLOGICAL RESEARCH OF HYDROXYCARBAMIDE AND HYDREA

I.B. Merkulova¹, T.V. Abramova¹, O.I. Konyeva¹, N. Yu. Kulbachevskaya¹, N.P. Ermakova¹, V.A. Chaley¹, A. Yu. Semushkina²

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

²K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary medicine and Biotechnology; 23 Acad. Skryabin St., Moscow 109472, Russia

Introduction. In accordance with Russian Federal Program of import substitution of foreign medicines replacement for high-quality Russian drugs in Russia reproduced hydroxycarbamide (HC), which passed preclinical toxicological and pathomorphological testing in comparison with hydrea (HD), produced by Italy.

The aim. The aim of present study was the comparative evaluation of HC and HD effect on the internal organs of rats for the clearing up of their identity according to the morphological criterions.

Materials and methods. 70 non-inbred male rats, by 10 rats per group, were used. HC and HD were administered to rats oral daily for 5 days in the same total doses correspond with to the 2, 1 and 1/2 maximum tolerated dose. In the same regime control rats were oral administered with 1 % starch paste solution. Of animals were removed from the experience on days 3 and 30 after the end of the administration

of the drugs. The macroscopic and histological examination of internal organs were performed by routine methods, including fixation of the material in 10 % formalin and staining of sections with hematoxylin and eosin. The histological preparations of the internal organs were analyzed in the light microscope at magnifications of 100, 400, 1000.

Results. HC, as well as HD, in total doses of 3000 and 1500 mg/kg at the 3 day after the end of the introduction caused different degrees of similar morphological changes in rat internal organs: moderate hypoplasia in the thymus, bone marrow and spleen, destructive and inflammatory changes in the stomach, duodenum and kidney. At the 30 day after the application of both drugs morphological changes in the thymus, the bone marrow and the spleen disappeared completely, residual morphological changes persisted in the duodenum and kidneys; in the testes of rats – moderate atrophic changes. HC, as well as HD in total dose 750 mg/kg did not cause changes in the internal organs of the rats.

Conclusion. Based on the results of macroscopic and histological examination the conclusion about of the identity of the influence of HC and HD on the internal organs of rats was made.

Key words: hydroxycarbamide, hydrea, rats, internal organs, morphological changes

Введение

Гидроксикарбамид (ГК) – противоопухолевый препарат из группы антиметаболитов, производное гидроксимочевины, выпускается зарубежными фирмами. Он обладает выраженным противоопухолевым действием и применяется как в монотерапии, так и в комбинации с другими цитостатическими средствами или с облучением для лечения ряда злокачественных заболеваний: меланомы, лимфогранулематоза, хронического миелолейкоза, опухолей головы и шеи, рака яичников и шейки матки и др. [1–3].

Основной механизм действия ГК связывают с угнетением синтеза ДНК пролиферирующих клеток [3, 4]. Препарат оказывает побочное действие в виде подавления функции костного мозга (лейкопения, анемия, тромбоцитопения), диспепсии и ulcerации желудочно-кишечного тракта, гепатотоксичности, фиброза легких, интерстициального нефрита и др. [1, 3]. Эксперименты на собаках и крысах показали, что ГК в переносимых и высоких дозах может вызывать дозозависимые и обратимые изменения разной степени в костном мозге, тимусе, лимфатических узлах, селезенке, тонком кишечнике, печени, почках, семенниках [5, 6]. В России в соответствии с целевой федеральной программой реализации импортозамещения зарубежных лекарственных препаратов качественными российскими препаратами воспроизводятся и изучаются отечественные генерические препараты [7, 8]. В последние годы воспроизведен ряд активных противоопухолевых препаратов, аналогичных зарубежным: цисплатин, оксалиплатин, метотрексат, винкристин и др. Эти препараты проходили доклинические токсикологические и патоморфологические исследования в лаборатории фармакологии и токсикологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [9–15].

В лекарственной форме ГК (капсулы по 500 мг) воспроизведен отечественным производителем ООО «Озон» и прошел доклинические токсикологические исследования в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в сравнении с препаратом гидреа (ГД) фирмы «Кор-

ден Фарма Латина С. п. А.» (Италия). На основании результатов токсикологического исследования установлено, что ГК и ГД по показателям субхронической токсичности вполне идентичны [16]. Патоморфологическое исследование при изучении субхронической токсичности ГК является конечным этапом доклинического токсикологического исследования и проводится в соответствии с требованиями по доклиническому изучению новых противоопухолевых, а также воспроизведенных препаратов [17–19].

Цель исследования – сравнительная патоморфологическая оценка влияния ГК и ГД на внутренние органы крыс для установления идентичности этих препаратов по морфологическим критериям.

Материалы и методы

В ходе исследования были использованы 70 неинбредных крыс-самцов, по 10 в группе. Препараты ГК и ГД грызунам вводили перорально ежедневно в течение 5 дней в 3 одинаковых дозах, рассчитанных исходя из максимально переносимой дозы (МПД): разовая доза – 600 мг/кг, суммарная – 3000 мг/кг (2 МПД), разовая – 300 мг/кг, суммарная – 1500 мг/кг (МПД), разовая – 150 мг/кг, суммарная – 750 мг/кг (1/2 МПД).

Контрольным крысам в том же режиме и тем же способом вводили 1 % крахмальный клейстер в объеме, соответствующем объему препаратов в максимальной дозе. Грызунов (по 5 из каждой группы) выводили из опыта гуманным методом – усыплением диэтиловым эфиром на 3-и и 30-е сутки после прекращения применения препаратов. На вскрытии проводили наружный осмотр и макроскопическое исследование внутренних органов. Для гистологического исследования у крыс были взяты участки головного мозга, сердца, легких, печени, желудка, поджелудочной железы, тонкого и толстого кишечника, почек, мочевого пузыря, тимуса, селезенки, лимфатических узлов брыжейки, семенников, надпочечников, щитовидной железы, гипофиза. Гистологическое исследование внутренних органов проводили

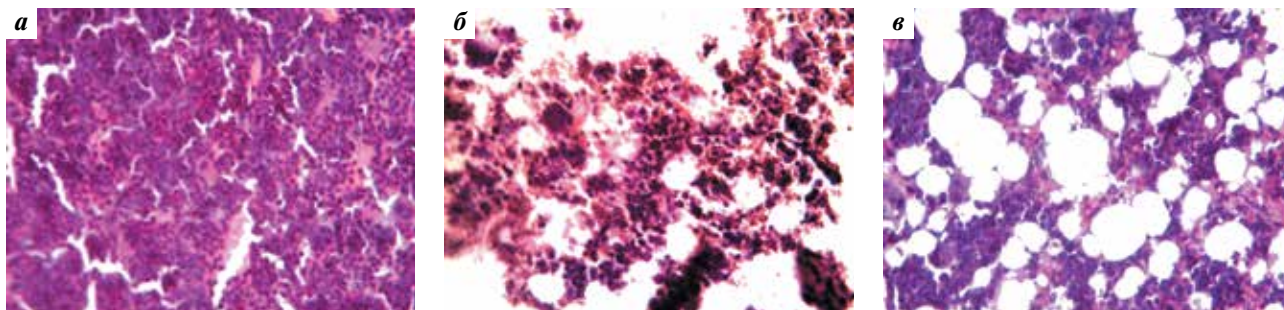


Рис. 1. Морфологические изменения в костном мозге крыс на 3-и сутки после применения гидроксикарбамида и гидреа в суммарной дозе 3000 мг/кг: а – после применения 1 % крахмального клейстера (контрольная группа): высокая плотность содержания кроветворных клеток; б – после применения гидроксикарбамида: уменьшенное содержание и некоторая деструкция кроветворных клеток; в – после применения гидреа: уменьшенное содержание и некоторая деструкция кроветворных клеток, повышенное число жировых клеток. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 1. Morphological changes in the rat bone marrow on day 3 after hydroxycarbamide and hydrea application with total dose of 3000 mg/kg: а – after application of 1 % starch paste (control group): high density of hematopoietic cells; б – after application of hydroxycarbamide: decreased number and some destruction of hematopoietic cells; в – after hydrea application: decreased number and some destruction of hematopoietic cells, increased number of fat cells. Hematoxylin and eosin staining, $\times 400$

по общепринятым методикам, включавшим фиксацию материала в 10 % нейтральном формалине и окраску срезов гематоксилином и эозином. Гистологические препараты исследовали и фотографировали под световым микроскопом Leica DM 1000 с использованием цветной цифровой камеры Leica DFC295 и компьютерной программы визуализации и захвата изображения.

Результаты и обсуждение

На 3-и сутки после 5-кратного ежедневного перорального введения 1 % крахмального клейстера крысам (контрольная группа) при макроскопическом и гистологическом исследовании внутренних органов изменения не обнаружены. Морфологическая (гистологическая) картина внутренних органов у 5 грызунов была сходной и соответствовала морфологической картине, обычно наблюдаемой у интактных неинбредных крыс-самцов.

На 3-и сутки после окончания применения ГК и ГД в суммарной дозе 3000 мг/кг у большинства животных, в отличие от контрольной группы, наблюдали уменьшение величины тимуса и селезенки, что согласуется с некоторым уменьшением массы этих органов [16]. А после применения ГК и ГД в суммарной дозе 1500 отмечали лишь уменьшение величины тимуса у отдельных крыс. У животных, получивших ГК и ГД в суммарной дозе 750 мг/кг, эти изменения не выражены.

При гистологическом исследовании внутренних органов крыс на 3-и сутки после окончания применения ГК и ГД в суммарной дозе 3000 мг/кг, в отличие от контрольной группы, отмечены морфологические изменения разной степени. Так, в костном мозге большинства грызунов выявлено уменьшение содержания (умеренная гипоплазия) ядросодер-

жащих гемопоэтических клеток, среди которых обнаруживаются островки жировых клеток (рис. 1). В тимусе большинства крыс наблюдалось выраженное снижение содержания лимфоцитов в корковом веществе (рис. 2). В селезенке после применения ГК, как и после ГД, несколько уменьшены площадь красной пульпы и количество ядросодержащих клеток в ней, причем в некоторых зонах хорошо были видны ретикулярные клетки. В сердце, в миокарде левого желудочка у большинства грызунов после применения ГК, как и после применения ГД, среди кардиомиоцитов выявлены немногочисленные участки измененных набухших кардиомиоцитов с повышенной окраской эозином и слабовыраженной поперечнополосатой исчерченностью (очаги гипоксии). В слизистой оболочке железистого отдела желудка у отдельных крыс после применения ГК и ГД отмечены участки деструкции поверхностного призматического эпителия, а у единичных самцов в фундальных железах – деструкция и вакуолизация цитоплазмы париетальных клеток. В тонком кишечнике (в двенадцатиперстной или тощей кишке) некоторых крыс после применения ГК и ГД в апикальной зоне ворсинок выявлены десквамация энтероцитов, некроз, а также воспалительная инфильтрация и отек стромы ворсинок (рис. 3). В почках самцов после применения ГК, как и после применения ГД, в прямых канальцах и собирательных трубочках мозгового вещества обнаруживались комочки погибшего десквамированного эпителия (рис. 4). В мозговом веществе у 1 крысы после применения ГК обнаружен очаг фиброза, а после применения ГД у 1 грызуна выявлены киста и участок фиброза. В корковом веществе почек у отдельных крыс находили вакуолизацию цитоплазмы некоторых клеток эпителия извитых канальцев. Учитывая изложенное, можно видеть, что при высокой

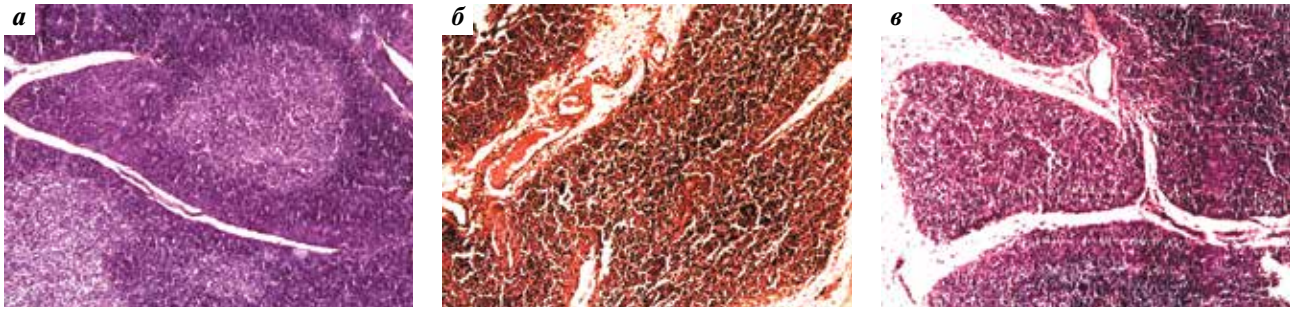


Рис. 2. Морфологические изменения в тимусе крыс на 3-и сутки после применения гидроксикарбамида и гидреа в суммарной дозе 3000 мг/кг: а – после применения 1 % крахмального клейстера (контрольная группа): высокое содержание лимфоцитов в корковом веществе; б – после применения гидроксикарбамида: выраженное снижение содержания лимфоцитов в корковом веществе (гипоплазия лимфоцитов); в – после применения гидреа: выраженное снижение содержания лимфоцитов в корковом веществе (гипоплазия лимфоцитов). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 2. Morphological changes in the rat thymus on day 3 after hydroxycarbamide and hydrea application with total dose of 3000 mg/kg: а – after application of 1 % starch paste (control group): high numbers of lymphocytes in the cortex; б – after application of hydroxycarbamide: pronounced decrease in lymphocytes in the cortex (lymphocyte hypoplasia); в – after hydrea application: pronounced decrease in lymphocytes in the cortex (lymphocyte hypoplasia); hematoxylin and eosin staining, $\times 100$

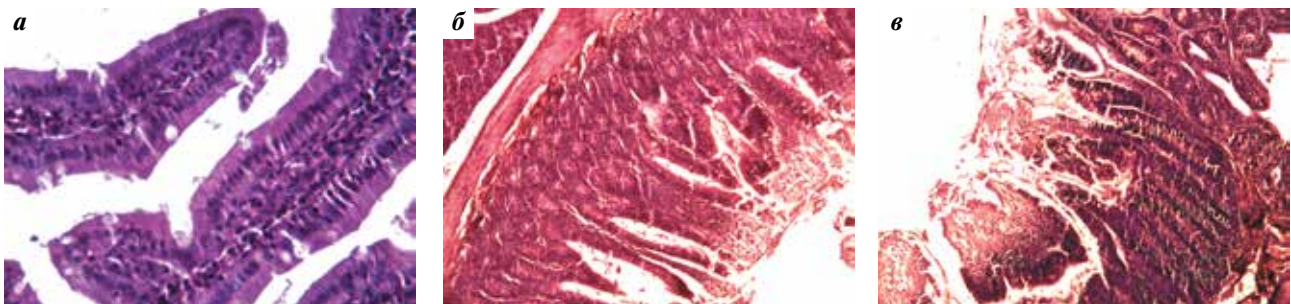


Рис. 3. Морфологические изменения в тонком кишечнике крыс на 3-и сутки после применения гидроксикарбамида и гидреа в суммарной дозе 1500 мг/кг: а – после применения 1 % крахмального клейстера (контроль): неизменные ворсинки слизистой оболочки двенадцатиперстной кишки; б – после применения гидроксикарбамида: участок слизистой оболочки тонкой кишки с деструктивными, некротическими и воспалительными изменениями апикальной зоны ворсинок; в – после применения гидреа: участок слизистой оболочки тонкой кишки с деструктивными, некротическими и воспалительными изменениями апикальной зоны ворсинок. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 3. Morphological changes in the rat small intestine on day 3 after hydroxycarbamide and hydrea application with total dose of 1500 mg/kg: а – after application of 1 % starch paste (control): unchanged villi of the duodenal mucosa; б – after application of hydroxycarbamide: a fragment of the duodenal mucosa with destructive, necrotic and inflammatory changes in the apical part of the villi; в – after hydrea application: a fragment of the duodenal mucosa with destructive, necrotic and inflammatory changes in the apical part of the villi; hematoxylin and eosin staining, $\times 400$

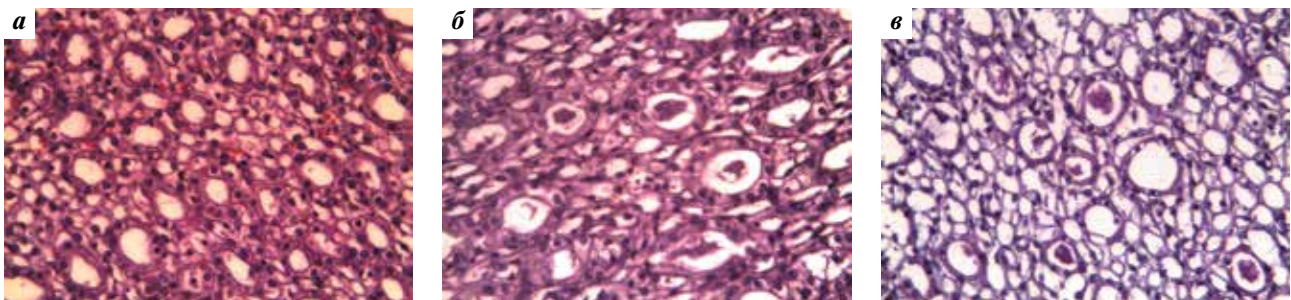


Рис. 4. Морфологические изменения в почках крыс на 3-и сутки после применения гидроксикарбамида и гидреа в суммарной дозе 3000 мг/кг: а – после применения 1 % крахмального клейстера (контроль): участок мозгового вещества – просветы собирательных трубочек и прямых канальцев свободны; б – после применения гидроксикарбамида: в просвете некоторых собирательных трубочек и прямых канальцев – десквамированный погибший эпителий («цилиндры»); в – после применения гидреа: в просвете некоторых собирательных трубочек и прямых канальцев – десквамированный погибший эпителий («цилиндры»). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 400$

Fig. 4. Morphological changes in the rat kidney on day 3 after hydroxycarbamide and hydrea application with total dose of 3000 mg/kg: а – after application of 1 % starch paste (control): fragment of the medulla – lumens of the collector and straight tubules are empty; б – after application of hydroxycarbamide: desquamated dead epithelium (“cylinders”) in the lumen of some collector and straight tubules; в – after hydrea application: desquamated dead epithelium (“cylinders”) in the lumen of some collector and straight tubules; hematoxylin and eosin staining, $\times 400$

суммарной дозе 3000 мг/кг, соответствующей 2 МПД, оба препарата вызвали сходные изменения в одинаковых органах животных. Наиболее выраженные и четкие изменения отмечены в тимусе, костном мозге, селезенке, желудке, тонкой кишке, менее выраженные — в сердце и почках.

При гистологическом исследовании внутренних органов крыс на 3-и сутки после окончания применения ГК и ГД в суммарной дозе 1500 мг/кг морфологические изменения отмечены у отдельных животных в тимусе (в виде умеренной гипоплазии корковой зоны) и в почках (в виде десквамированного эпителия в прямых канальцах мозгового вещества и вакуолизации цитоплазмы некоторых клеток эпителия извитых канальцев коркового вещества). Кроме того, у некоторых крыс после применения ГК, как и после ГД, в слизистой оболочке железистого желудка отмечены участки разрыхления, отека и деструкции покровного призматического эпителия, а в двенадцатиперстной и тощей кишке наблюдались деструктивные и воспалительные изменения ворсинок.

Следует отметить, что после применения ГК в суммарной дозе 1500 мг/кг изменения в костном мозге, селезенке и сердце, отмеченные при применении суммарной дозы 3000 мг/кг (2 МПД), не наблюдались, тогда как после применения ГД в этой же дозе у отдельных крыс в костном мозге отмечена умеренная гипоплазия гемопоэтических клеток, а в селезенке (в красной пульпе) — некоторое снижение содержания ядросодержащих клеток. На основании изложенного можно сделать вывод, что оба препарата при применении суммарной дозы 1500 мг/кг, соответствующей МПД, оказали сходное действие на тимус, желудок и тонкую кишку крыс.

Но ГК в отличие от ГД не вызвал изменений в костном мозге, селезенке и сердце животных.

При применении ГК и ГД в суммарной дозе 750 мг/кг (1/2 МПД) макроскопическая и гистологическая картина во внутренних органах животных практически не отличалась от контрольной группы.

На 30-е сутки после окончания перорального применения ГК и ГД в суммарных дозах 3000, 1500 и 750 мг/кг макроскопические изменения внутренних органов не наблюдались, как и у самцов контрольной группы.

Гистологическое исследование на 30-е сутки после введения ГК и ГД в суммарных дозах 3000 и 1500 мг/кг показало, что изменения в тимусе, костном мозге, селезенке и железистом желудке крыс полностью исчезали, морфологическая картина в этих органах соответствовала контрольной группе. В двенадцатиперстной и в тощей кишке у некоторых крыс отмечены признаки остаточных воспалительных и атрофических изменений в виде укорочения и расширения ворсинок. Кроме того, в этот срок в семенниках большинства самцов, получивших ГК и ГД в суммарных дозах 3000 и 1500 мг/кг, обнаружены срезы семенных канальцев с атрофированным (сильно редуцированным) сперматогенным эпителием и пустым просветом семенного канальца (рис. 5). В почках отдельных крыс после применения ГК и ГД в суммарных дозах 3000 и 1500 мг/кг отмечали некоторые изменения в мозговом веществе: в просвете некоторых прямых канальцев и собирательных трубочек наблюдали гомогенные или зернистые цилиндры. А после окончания применения ГК в суммарной дозе 3000 мг/кг, кроме того, у 2 крыс в корковом веществе вблизи клубочков обнаружены признаки воспаления в виде мелких одиночных воспалительных

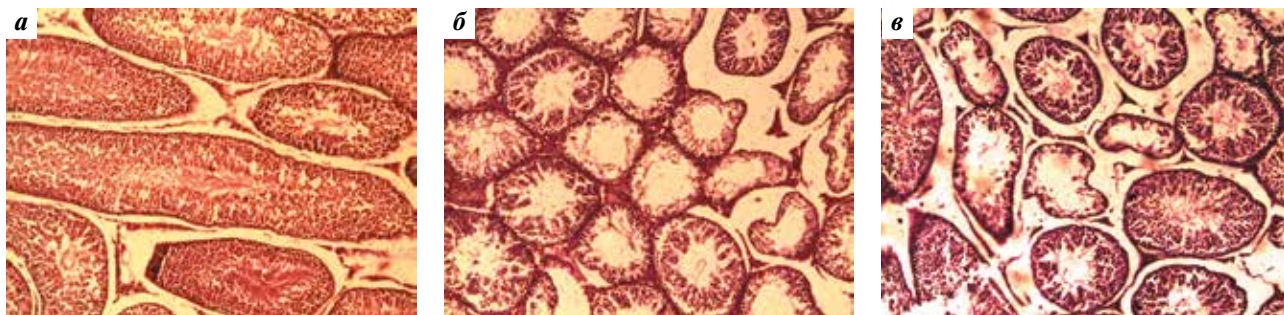


Рис. 5. Морфологические изменения в семенниках крыс на 30-е сутки после применения гидроксикарбамида и гидреа в суммарной дозе 3000 мг/кг: а — после применения 1 % крахмального клейстера (контроль): в срезах семенных канальцев — клетки сперматогенного эпителия на разных стадиях сперматогенеза; б — после применения гидроксикарбамида: среди срезов с неповрежденным сперматогенным эпителием видны срезы с повреждением и атрофией клеток сперматогенного эпителия; в — после применения гидреа: среди срезов с неповрежденным сперматогенным эпителием видны срезы с повреждением и атрофией клеток сперматогенного эпителия. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Fig. 5. Morphological changes in the rat testis on day 3 after hydroxycarbamide and hydra application with total dose of 3000 mg/kg: а — after application of 1 % starch paste (control group): in testis sections — spermatogenic epithelial cells at different stages of spermatogenesis; б — after application of hydroxycarbamide: among sections with undamaged spermatogenic epithelium are sections with damaged and atrophied spermatogenic epithelial cells; в — after hydra application: among sections with undamaged spermatogenic epithelium are sections with damaged and atrophied spermatogenic epithelial cells; hematoxylin and eosin staining, $\times 100$

инfiltrатов из моноклеаров. В сердце единичных самцов, в миокарде левого желудочка после применения ГК и ГД в суммарной дозе 3000 мг/кг отмечены небольшие очаги измененных набухших кардиомиоцитов, а после применения ГК в суммарной дозе 1500 мг/кг, кроме того, вблизи поврежденных кардиомиоцитов обнаружен моноклеарный инfiltrат.

Таким образом, можно утверждать, что на 30-е сутки после применения ГК, как и ГД, в дозах 3000 и 1500 мг/кг оба препарата обнаруживают сходные изменения в семенниках, показывают их полную обратимость в тимусе, костном мозге и селезенке, остаточные изменения в почках и тонком кишечнике, несильно выраженные очаговые изменения в миокарде.

Сравнение результатов морфологических проявлений токсичности ГД и ГК в нашем исследовании с данными результатов других исследований токсичности производных гидроксимочевин, проведенных

на грызунах, показало, что мишенями повреждающего действия обоих сравниваемых препаратов являются одни и те же органы: тимус, костный мозг, селезенка, семенники, желудок и тонкий кишечник. Но, кроме перечисленных органов, в исследованиях, представленных в разных источниках литературы, изменения наблюдались и в других органах крыс: в печени и легких. Суммарные дозы препаратов были либо выше суммарных доз, которые использовались в нашем исследовании, либо применение препаратов было более длительным (не менее 10 дней) [3–5].

Заключение

Отечественный воспроизведенный препарат ГК при 5-кратном ежедневном пероральном применении в суммарных дозах 3000, 1500 и 750 мг/кг по патоморфологическим критериям оценки влияния на внутренние органы крыс оказался в целом идентичным препарату сравнения – ГД (Италия).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Характеристика отдельных противоопухолевых препаратов. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. 3-е изд., доп. и перераб. М.: Практическая медицина, 2011. С. 72–119. [Characteristics of individual anticancer drugs. In: Chemotherapy Guide for Tumor Diseases. 3rd edn., additional and revised. Ed.: N.I. Perevodchikova. Moscow: Prakticheskaya medicina, 2011. P. 72–119. (In Russ.)].
2. Гидреа – официальная инструкция по применению. https://medi.ru/instrukciya/gidrea_3182/ [Hydrea – the official instruction on the application. https://medi.ru/instrukciya/gidrea_3182/ (In Russ.)].
3. Клинико-фармакологическая характеристика противоопухолевых средств. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой, 3-е изд., доп. и перераб. М.: Практическая медицина, 2011. С. 30–40. [Clinical and pharmacological characteristics of anticancer drugs. In: Chemotherapy Guide for Tumor Diseases. 3rd edn., additional and revised. Ed.: N.I. Perevodchikova. Moscow: Prakticheskaya medicina, 2011. P. 30–40. (In Russ.)].
4. Frederick S. Philips, Stephen S. Sternberg, Herbert S. Schwartz et al. Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats. *Cancer Res* 1967;27(1):61–74.
5. Asmaa M. Khamis, Samah S. Oda, Asmaa F. Khafaga et al. Hematocytological Evaluation of Hydroxyurea-Induced Toxicity in Male Rats. *AJVS* 2017;55(2):77–82. DOI: 10.5455/ajvs.267052.
6. Morton D., Reed L., Huang W. et al. Toxicity of Hydroxyurea in Rats and Dogs. *Toxicol Pathol* 2015;43(4):498–512. DOI: 10.1177/0192623314559103.
7. Денисова М.Н., Пархоменко Д.В. Дженирики и их место в лекарственном обеспечении. *Медицинские технологии. Оценка и выбор* 2012;2(8):94–9. [Denisova M.N., Parhomenko D.V. Generics and their place in drug supply. *Meditsinskiye tekhnologii. Otsenka i vybor* = Medical Technology. Evaluation and Selection 2012;2(8):94–9. (In Russ.)].
8. Гуськова Т.А. Оценка безопасности применения генериков в странах СНГ: проблемы и перспективы. *Биомедицина* 2010;4:74–6. [Guskova T.A. Safety assessment of generic use in the CIS countries: problems and prospects. *Biomeditsina* = Biomedicine 2010;4:74–6. (In Russ.)].
9. Бухман В.М., Ермакова Н.П., Кonyaева О.И. и др. Эквитоксичность Цисплатина–РОНЦ® и Цисплатина–Тева при однократном введении мышам и крысам. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):65–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-65-69. [Bukhman V.M., Ermakova N.P., Konyaeva O.I. et al. The equitoxicity of Cisplatin–RONC® and Cisplatin–Teva at a single injection to mice and rats. *Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(3):65–9. (In Russ.)].
10. Абрамова Т.В., Меркулова И.Б., Кульбачевская Н.Ю. и др. Сравнительное патоморфологическое исследование внутренних органов крыс при доклиническом изучении воспроизведенного винкристина–РОНЦ и винкристина фирмы Teva. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(1):76–82. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-76-82. [Abramova T.V., Merkulova I.B., Kulbachevskaya N.Yu. et al. The comparative pathomorphological research of the internal organs of rats on the pre-clinical study of vincristine–RONC and vincristine–TEVA. *Rossiysky bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):76–82. (In Russ.)].
11. Меркулова И.Б., Абрамова Т.В., Кульбачевская Н.Ю. и др. Сравнительное патоморфологическое исследование внутренних органов крыс при 3-кратном внутривенном применении отечественного воспроизведенного оксалиплатина и оксалиплатина фирмы Teva. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):111. [Merkulova I.B., Abramova T.V., Kulbachevskaya N.Yu. et al. The comparative pathological study of the internal organs of rats with 3 times intravenous administration of domestic reproduced oxaliplatin and oxaliplatin of the Teva company.

- Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(1):111. (In Russ.).
12. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Сравнительное токсикологическое изучение отечественного воспроизведенного винкристина и винкристина фирмы Teva. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):56. [Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. the comparative toxicological study of domestic reproduced vincristine and vincristine of the Teva company. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):56. (In Russ.)].
 13. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Сравнительное токсикологическое изучение отечественного воспроизведенного оксалиплатина и оксалиплатина фирмы Teva. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):102. [Kulbachevskaya N.Yu., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. The comparative toxicological study of domestic reproduced oxalyplatin and oxaliplatin of the Teva company. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(1):102. (In Russ.)].
 14. Меркулова И.Б., Абрамова Т.В., Коняева О.И. и др. Сравнительное патоморфологическое изучение воспроизведенного метотрексата и метотрексата-Эбеве. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):105. [Merkulova I.B., Abramova T.V., Kulbachevskaya N.Yu. et al. The comparative pathomorphological study the reproduced metotrexate and metotrexate-Ebeve. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):105. (In Russ.)].
 15. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Ермакова Н.П. и др. Сравнительное токсикологическое изучение отечественного воспроизведенного метотрексата и метотрексата фирмы Эбеве. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):94. [Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu., Ermakova N.P. et al. the comparative toxicological study of domestic reproduced metotrexate and metotrexate of the Ebeve company. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):94. (In Russ.)].
 16. Коняева О.И., Кульбачевская Н.Ю., Чалей В.А. и др. Эквитоксичность отечественного гидроксикарбамида и препарата сравнения гидреа на крысах. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(1):80–6. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-80-86. [Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Yu., Chaley V.A. et al. The equitoxicity of the domestic hydroxycarbamide and the reference drug hydrea on rats. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(1):80–6. (In Russ.)].
 17. 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., доп. и перераб. 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. 2nd edn., revised and additional edition. Ed.: R.U. Khabriev. Moscow: Meditsina, 2005. P. 170–204 (In Russ.)].
 18. Миронов А.Н., Бутанян Н.Д. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. М.: Гриф и К, 2012. [Mironov A.N., Butanyan N.D. et al. A guide to preclinical drug research. Moscow: Grif i K, 2012. (In Russ.)].
 19. Березовская И.В., Гуськова Т.А., Дурнев А.Д. Методические рекомендации по изучению безопасности воспроизведенных лекарственных препаратов. Биомедицина 2011;3:78–80. [Berezovskaya I.V., Gus'kova T.A., Durnev A.D. The methodical recommendations for study of safety reproduced medicinal preparations. Biomedicine 2011;3:78–80 (In Russ.)].

ORCID авторов/ORCID of authors

Н.Ю. Кульбачевская/N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>
 В.А. Чалей/V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.
Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 25.12.2018. Принята в печать: 12.04.2019.
 Article received: 25.12.2018. Accepted for publication: 12.04.2019.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СУХОГО ЭКСТРАКТА, ПОЛУЧЕННОГО ИЗ СБОРА ОДУВАНЧИКА ЛЕКАРСТВЕННОГО ТРАВЫ И ЛОПУХА БОЛЬШОГО ЛИСТА

Л. М. Федосеева, Ю. И. Чистова

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России;
Россия, 656038 Барнаул, пр-т Ленина, 40

Контакты: Юлия Игоревна Чистова juls.chistova@mail.ru

Цель исследования – изучение фенольных соединений сухого экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа.

Материалы и методы. Разделение и идентификацию фенольных соединений изучаемого экстракта проводили методами тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием.

Результаты. В результате исследований установлено, что оптимальной для разделения фенольных соединений методом тонкослойной хроматографии является система этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3). На хроматограмме обнаруживаются 4 зоны адсорбции, по положению и флуоресценции в ультрафиолетовом свете соответствующие флавоноидам группы флавона и фенолоксидам (хлорогеновая и кофейная кислоты). Для дальнейшей идентификации фенольных соединений использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. В ходе работы обнаружено 8 пиков, которые по временам удерживания и спектральным характеристикам соответствуют фенологликозидам, хлорогеновой кислоте, производным кофейной кислоты, феруловой кислоты, умбеллиферона.

Заключение. Установлено, что экстракт сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухой содержит гидроксикоричные кислоты и их производные, соединения кумариновой природы, фенологликозиды.

Ключевые слова: фенольные соединения, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, экстракт сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухой

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-73-77

IDENTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS OF DRY EXTRACT OF DANDELION HERB AND LARGE BURDOCK LEAF TEA

L. M. Fedoseeva, Yu. I. Chistova

Altai State Medical University of the Ministry of Health of Russia; 40 Prospekt Lenina, Barnaul 656038, Russia

The purpose of this work is to study of phenolic compounds in the dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea.

Materials and methods. The separation and identification of phenolic compounds of dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea by thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography with UV-detection has been carried out.

Results. As a result of research, it has been established that during TLC the optimal system for the separation of phenolic compounds is the ethyl acetate – formic acid – water system (10:2:3). On the chromatogram four spots were found corresponding to the value of R_f and fluorescence in UV-light to flavonoids of the flavone group and phenolic acids (chlorogenic and caffeic acids). For further identification of phenolic compounds using HPLC, eight peaks were found, which in terms of retention time and spectral characteristics correspond to phenoglycosides, chlorogenic acid, caffeic acid derivatives, ferulic acid, umbelliferone.

Conclusions. Thus, the dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea contains hydroxycinnamic acids and their derivatives, compounds of coumarin nature, phenoglycosides.

Key words: phenolic compounds, thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography, dry extract of dandelion herb and large burdock leaf tea

Введение

Нами разработана технология получения экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и ло-

пуха большого листа сухого методом ремацерации. Экстрагент – вода очищенная, соотношение «сырье: экстрагент» – 1:10. Одним из этапов исследования

лекарственных препаратов из растительного сырья является изучение качественного состава основных групп биологически активных веществ. В ходе проведенных химических реакций установлено наличие флавоноидов групп флавона и флавонола, гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ, полисахаридов [1]. При изучении специфической активности экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого доказан его диуретический эффект, что можно объяснить входящими в состав соединениями фенольной природы [2]. Однако одним из недостатков сухих экстрактов является высокая гигроскопичность, вследствие чего ухудшается их сыпучесть, снижается качество. По этой причине мы планируем разработать лекарственную форму с экстрактом сбора сухим в виде твердых капсул.

Цель исследования — изучение фенольных соединений в экстракте сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухом физико-химическими методами.

Материалы и методы

Объект исследования — экстракт сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухой.

Для разделения и идентификации фенольных соединений экстракта использовали методы тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В ходе исследования 0,2 г экстракта растворяли в 5,0 мл 70 % этилового спирта, затем фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента, ООО «Бавер»), по 5 мкл фильтрата наносили на хроматографические пластинки Sorbfil (силикагель, ПТСХ-УФ). Хроматографическое исследование проводили с использованием 6 систем растворителей: *n*-бутанол—кислота уксусная ледяная—вода (4:1:1 и 4:1:2), этилацетат—кислота уксусная ледяная—вода (7:1:2), этилацетат—кислота муравьиная—вода (10:2:3), этилацетат—кислота муравьиная—кислота уксусная ледяная—вода (100:11:11:26), хлороформ—спирт этиловый 96 %—вода (26:16:3) [3–7].

В качестве стандартных образцов использовали 0,1 % спиртовые растворы рутина (каталожный номер R5143), лютеолина (L9283), кверцетина (Q4951), кверцитрина (83388), нарингенина (N5893), ориентина (O9765), хлорогеновой кислоты (C3878), кофейной кислоты (C0625), феруловой кислоты (PHR1791), π -кумаровой кислоты (C9008), приобретенных в компании ООО «Сигма-Алдрич Рус». После хроматографирования пластинки высушивали при комнатной температуре на воздухе до исчезновения запаха растворителей и просматривали в дневном и ультрафиолетовом свете до и после обработки хромогенными

реактивами (1 % спиртовой раствор алюминия (III) хлорида, пары аммиака).

Фиксировали изменения окраски зон адсорбции в исследуемых пробах и сравнивали их окраску и положение (величину R_f) с соответствующими зонами адсорбции в пробах стандартных образцов. Определение проводили в 5 повторностях.

Последующее разделение и идентификацию фенольных соединений спиртового раствора экстракта проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЭкоНова, Россия) с ультрафиолетовым детектором. Условия хроматографирования: колонка ProntoSIL 120–5–C18 AQ, 2,0 × 75 мм. Элюент А — раствор трифторуксусной кислоты водный 0,01 %, элюент Б — 100 % ацетонитрил. Скорость подачи элюента — 100 мкл/мин, объем пробы — 2 мкл, температура колонки — 35 °С; градиент 5–55 % элюента Б за 30 мин. Детектирование осуществляли при длинах волн 220, 254, 268, 300, 324, 330 и 360 нм. Соединения идентифицировали по временам удерживания (τ , мин) и спектральным характеристикам (λ_{\max} , нм), сравнивая их с аналогичными характеристиками стандартных образцов и данными литературы [8, 9].

Результаты и обсуждение

В ходе предварительных исследований установили, что для разделения фенольных соединений методом тонкослойной хроматографии оптимальной системой растворителей является этилацетат — кислота муравьиная — вода (10:2:3).

В результате исследования на хроматограмме обнаружены 4 пятна с желтой и голубой флуоресценцией, что характерно для флавоноидов группы флавонона и фенолокислот. По значению R_f и цвету зон адсорбции до и после обработки хромогенными реактивами в дневном и ультрафиолетовом свете идентифицированы кофейная ($R_f = 0,66$) и хлорогеновая ($R_f = 0,81$) кислоты (табл. 1).

Для дальнейшей идентификации фенольных соединений использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В результате эксперимента на хроматограмме спиртового раствора экстракта зарегистрировано 8 пиков. В процессе исследования снимали электронные спектры поглощения индивидуальных веществ, соответствующих пикам на хроматограмме. Идентификацию индивидуальных веществ проводили по временам удерживания (τ , мин) и спектральным характеристикам (λ_{\max} , нм) в сравнении с аналогичными характеристиками стандартных образцов или данными литературы [8, 9].

Установлено, что спиртовой раствор экстракта содержит хлорогеновую кислоту, фенологликозиды, производные кофейной и феруловой кислоты,

Таблица 1. Результаты тонкослойной хроматографии экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого в системе растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3)

Table 1. Results of thin-layer chromatography of common dandelion and dried greater burdock extracts in the system of solvents ethyl acetate – formic acid – water (10:2:3)

Исследуемый образец Studied sample	Rf	УФ-свет UV light	Окрашивание после детектирования Staining after detection				Идентифицированное соединение Identified compound
			АICI3 раствор спиртовой 1 % 1 % alcohol solution of AICI3		Аммиака пары Ammonia fumes		
			Видимый свет Visible light	УФ-свет UV light	Видимый свет Visible light	УФ-свет UV light	
Экстракт сбора: Extract: пятно 1 blot 1	0,55 ± 0,03	Желтое Yellow	Желтое Yellow	Желто-зеленое Greenish yellow	Желто-коричневое Brownish yellow	Серое Grey	Флавоноид группы флавона Flavone type flavonoid
пятно 2 blot 2	0,66 ± 0,02	Голубое Blue	–	Серо-зеленое Greyish green	–	Голубое Blue	Кофейная кислота Caffeic acid
пятно 3 blot 3	0,72 ± 0,03	Желтое Yellow	Желтое Yellow	Желто-зеленое Greenish yellow	Желтое Yellow	Серое Grey	Флавоноид группы флавона Flavone type flavonoid
пятно 4 blot 4	0,81 ± 0,02	Голубое Blue	–	Серо-зеленое Greyish green	Желто-зеленое Greenish yellow	Голубое Blue	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid

Примечание. УФ – ультрафиолетовый.

Note. UV – ultraviolet.

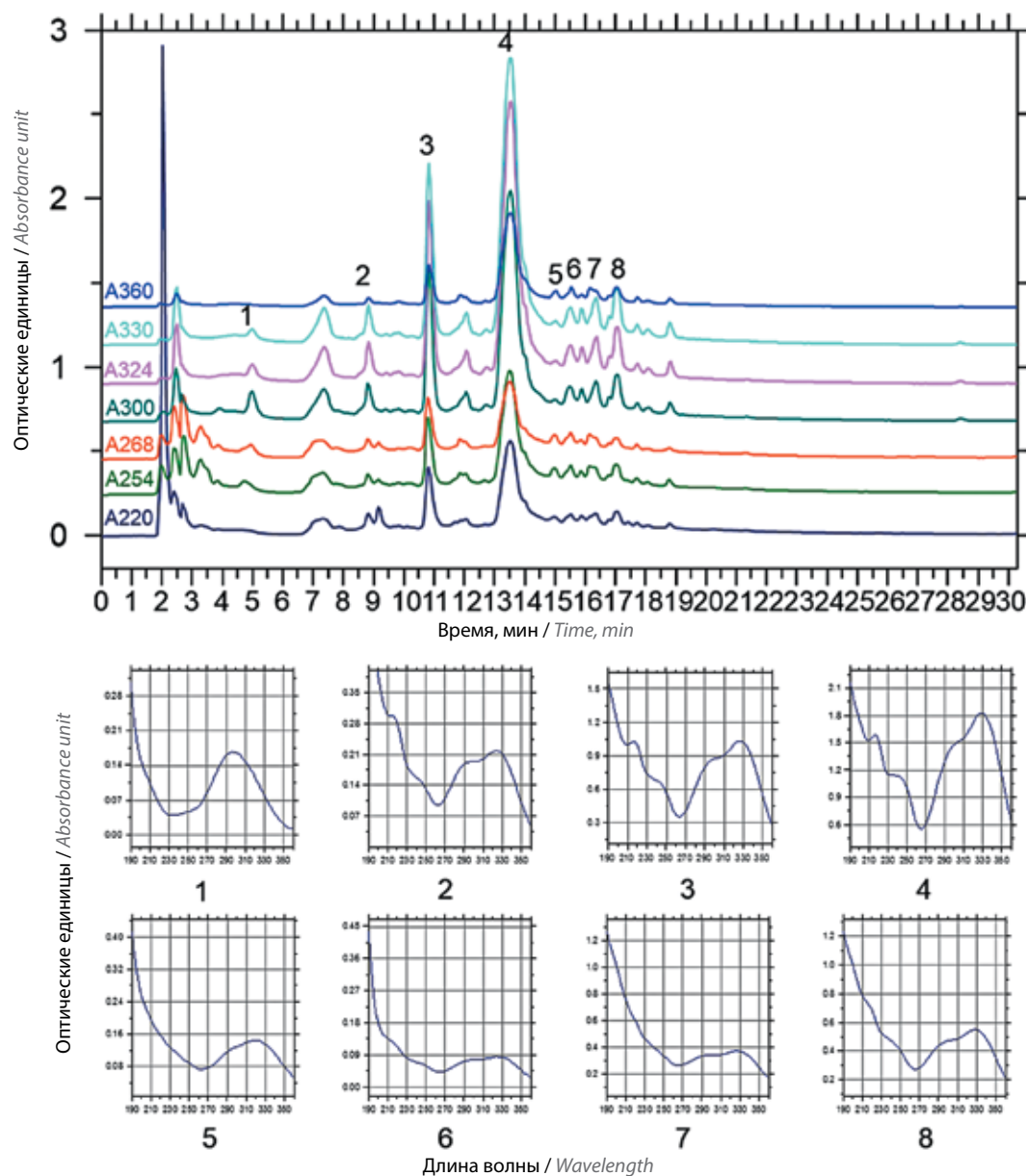
Таблица 2. Результаты идентификации фенольных соединений спиртового раствора экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Table 2. Results of identification of phenolic compounds in alcohol solution of common dandelion and dried greater burdock extracts using high-performance liquid chromatography

№ пика, п/п Peak No.	Время удерживания, мин Retention time, min	Максимум поглощения, нм Maximum absorption, nm	Идентифицированное соединение Identified compound
1	4,9	300	Фенологликозид Phenolic glycoside
2	8,7	216, 230 пл.,* 290 пл., 324 216, 230 sh*, 290 sh, 324	Производное феруловой кислоты Derivative of ferulic acid
3	10,6	218, 235 пл., 297 пл., 330 218, 235 sh, 297 sh, 330	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid
4	13,4	218, 230 пл., 295 пл., 329 218, 230 sh, 295 sh, 329	Производное кофейной кислоты Derivative of caffeic acid
5	14,8	320	Фенологликозид Phenolic glycoside
6	15,3	209 пл.; 229 пл., 292, 325 209 sh; 229 sh, 292, 325	Производное умбеллиферона Derivative of umbelliferone
7	16,1	290, 328	
8	16,9	212, 230 пл., 290, 330 212, 230 sh, 290, 330	Производное кофейной кислоты Derivative of caffeic acid
Стандартные образцы Standard samples			
1	10,6	218, 235 пл., 297 пл., 330 218, 235 sh, 297 sh, 330	Хлорогеновая кислота Chlorogenic acid
2	12,0	217, 242, 298 пл., 328 217, 242, 298 sh, 328	Кофейная кислота Caffeic acid
3	15,0	218, 234, 293 пл., 323 218, 234, 293 sh, 323	Феруловая кислота Ferulic acid

*Пл. – плечо.

*Sh – shoulder.



Хроматограмма и спектры индивидуальных веществ спиртового раствора экстракта сбора травы одуванчика лекарственного и листа лопуха большого сухого: 1 – фенологликозид; 2 – производное феруловой кислоты; 3 – хлорогеновая кислота; 4 – производное кофейной кислоты; 5 – фенологликозид; 6 – производное умбеллиферона; 7 – производное умбеллиферона; 8 – производное кофейной кислоты

Chromatogram and spectra of individual compounds of alcohol solutions of common dandelion and dried greater burdock: 1 – phenolic glycoside; 2 – derivative of ferulic acid; 3 – chlorogenic acid; 4 – derivative of caffeic acid; 5 – phenolic glycoside; 6 – derivative of umbelliferone; 7 – derivative of umbelliferone; 8 – derivative of caffeic acid

умбеллиферона. Результаты представлены в табл. 2 и на рисунке.

Таким образом, в результате высокоэффективной жидкостной хроматографии удалось идентифицировать гидроксикоричные кислоты и их производные, соединения кумариновой природы, фенологликозиды.

Заключение

Для разделения и идентификации фенольных соединений экстракта сбора методом тонкослойной

хроматографии использовали систему растворителей этилацетат – кислота муравьиная – вода (10:2:3). Применение данной системы позволяет обнаружить 4 зоны адсорбции с желтой и голубой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете со значениями $R_f = 0,55$, $0,72$ и $R_f = 0,66$, $0,81$ соответственно. Желтая флуоресценция характерна для флавоноидов группы флавона. Пятна с голубой флуоресценцией идентифицированы как кофейная и хлорогеновая кислоты. В результате идентификации

методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в спиртовом растворе экстракта сбора обнаружены хлорогеновая кислота, производные феруловой и кофейной кислот, умбеллиферона

и фенологликозиды. Полученные результаты будут использоваться для стандартизации экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чистова Ю.И., Федосеева Л.М. Качественный анализ экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа сухого. Молодежь – Барнаул: материалы XVII–XIX городской научно-практической конференции молодых ученых. Барнаул, 2018. С. 899–901. [Chistova Yu.I., Fedoseeva L.M. Qualitative analysis of the dry extract of dandelion herb and large burdock leaf specie. Youth – Barnaul: materials of XVII–XIX municipal scientific-practical conference of young scientists. Barnaul, 2018. P. 899–901. (In Russ.)].
2. Чистова Ю.И., Федосеева Л.М. Изучение диуретической активности экстракта сбора одуванчика лекарственного травы и лопуха большого листа. SCIENTIST 2018;1(1):69–72. [Chistova Yu.I., Fedoseeva L.M. the study of the diuretic activity of the extract of dandelion herb and large burdock leaf specie. SCIENTIST 2018;1(1):69–72. (In Russ.)].
3. Галияхметова Э.Х., Кудашкина Н.В., Чуйкин С.В., Егорова Е.Г. Использование денситометрии в качественном анализе флавоноидов листьев лимонника китайского. Медицинский вестник Башкортостана 2016;5(65):70–3. [Galiakhmetova E.H., Kudashkina N.V., Chujkin S.V., Egorova E.G. the use of densitometry in the qualitative analysis of flavonoids of schisandrachinensis leaves. Meditsinskiy vestnik Bashkortostana = Bashkortostan Medical Journal 2016;5(65):70–3. (In Russ.)].
4. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Платонов И.А., Павлова Л.В. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной. Химия растительного сырья 2015;1:95–100. DOI: 10.14258/jcrpm.201501410. [Kurkin V.A., Ryzanova T.K., Platonov I.A., Pavlova L.V. Quantitative determination of arbutin in the leaves of arctostaphylosuva-ursi (L.) spreng. Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material 2015;1:95–100. (In Russ.)].
5. Латыпова Г.М. Вопросы стандартизации листьев первоцвета весеннего. Вестник Оренбургского государственного университета 2009;6:195–7. [Latypova G.M. Issues of standardization of primrose leaves. Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta = Vestnik of the Orenburg State University 2009;6:195–7. (In Russ.)].
6. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Сорокина О.Н. и др. Тонкослойная хроматография флавоноидов на силикагеле в модифицированных мицеллярных подвижных фазах на основе додецилсульфата натрия. Сорбционные и хроматографические процессы 2014;14(1):52–64. [Sumina E.G., Shtykov S.N., Sorokina O.N. et al. TLC on silicagelin flavonoids modified micellar mobile phases based on sodium dodecylsulfate. Sorbtionnyye i khromatograficheskiye protsessy = Sorption and chromatographic processes 2014;14(1):52–64. (In Russ.)].
7. Шаталова Т.А., Вдовенко-Мартынова Н.Н., Айрапетова А.Ю. и др. Разработка технологии и анализа косметического крема на основе травы мелиссы лекарственной. Современные проблемы науки и образования 2015;4. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=20993>. [Shatalova T.A., Vdovenko-Martynova N.N., Ajrapetova A.Yu. et al. Development of technology and the analysis of cosmetic cream on the basis of the grass of melissa officinalis. Modern problems of science and education 2015;4. URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=20993>. (In Russ.)].
8. Wagner H., Bauer R., Melchart D. et al. Chromatographic Fingerprint Analysis of Herbal Medicines. New-York: Springer, 2011. 1012 p.
9. Mabry T.J., Markham K.R., Thomas M.B. the Systematic Identification of Flavonoids. New-York: Springer, 1970. 354 p.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.И. Чистова/Yu.I. Chistova: <https://orcid.org/0000-0003-1923-8097>

Вклад авторов

Л.М. Федосеева: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;

Ю.И. Чистова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи.

Author's contributions

L.M. Fedoseeva: developing the research design, analysis of the obtained data;

Yu.I. Chistova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing, reviewing of publications of the article's theme.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 13.02.2019. Принята в печать: 12.04.2019.

Article received: 13.02.2019. Accepted for publication: 12.04.2019.

ОЛЕГУ НИКОЛАЕВИЧУ ЧУПАХИНУ – 85 ЛЕТ

9 июня 2019 года исполняется 85 лет со дня рождения академика Олега Николаевича Чупахина, основателя нового научного направления – нуклеофильное ароматическое замещение водорода, которое включено в современные отечественные и зарубежные учебники, и создателя известной в России и за рубежом научной школы по органической химии. О.Н. Чупахиным проведены имеющие мировой приоритет систематические исследования реакций C-H-функционализации. Эта тематика служит основой создания экологически чистых, так называемых зеленых технологий. С использованием этой методологии разработаны оригинальные, принципиально новые синтетические методы построения разнообразных органических соединений, предназначенных для создания лекарственных препаратов и новых материалов. Помимо этого, в последние 15 лет О.Н. Чупахин занимается химией фторсодержащих соединений, в том числе гетероциклических, а также химическими аспектами охраны окружающей среды.

О.Н. Чупахин успешно работает в области создания лекарственных веществ: им вместе с сотрудниками открыта новая группа противовирусных препаратов широкого спектра действия. Препарат триазавирин из этой группы прошел полные клинические испытания, зарегистрирован в 2014 г. в Госреестре лекарственных средств РФ и реализуется через аптечную сеть. Разработаны



технологии антибактериального препарата пefлоксацин, технология энантимерно чистого левофлоксацина – бактерицидного препарата с широким антимикробным спектром действия, создана технологическая база, средство для лечения воспалительных стоматологических заболеваний силативит (завершена I фаза клинических испытаний).

О.Н. Чупахин ведет большую научно-педагогическую работу в качестве профессора кафедры органической и биомолекулярной химии Химико-технологического института Уральского федерального университета им. первого Президента России Б.Н. Ельцина, является Соросовским профессором. Его работы используются при чтении курсов в МГУ, Ростовском, Новосибирском и других госуниверситетах, включены в учебники. Он автор и соавтор свыше 600 научных работ, в том числе 10 монографий, автор и соавтор более 200 авторских свидетельств и патен-

тов. Большое внимание им уделяется подготовке кадров высшей квалификации. Среди его учеников 13 докторов наук и 49 кандидатов. Учениками О.Н. Чупахина являются академик В.Н. Чарушин, председатель Уральского отделения РАН, члены-корреспонденты РАН В.Л. Русинов и В.И. Салоутин.

О.Н. Чупахин – председатель специализированного совета по защите диссертаций, председатель Объединенного ученого совета Уральского отделения РАН по химическим наукам, руководитель раздела «Здоровье населения» региональной научно-технической программы «Урал», председатель Уральского отделения и член президиума правления Российского химического общества им. Д.И. Менделеева, член экспертного совета РФФИ, член Национального комитета российских химиков, редколлегии «Журнала органической химии», журналов «Химия гетероциклических соединений», «Химия твердого топлива», «Макрогетероциклы», член научного совета Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», член Международного союза антивирусных соединений, член Межведомственного научного совета по конвенционным проблемам химического и биологического оружия. На протяжении 20 лет О.Н. Чупахин является бессменным президентом областного Центра благотворительных фондов и организаций.

О.Н. Чупахин – лауреат Государственной премии РФ в области науки и тех-

нологий 2011 г., премии Совета Министров СССР (1990), Демидовской премии (2007), премии Всесоюзного химического общества им. Д.М. Менделеева (1986), премии Международного академического издательства «Наука» (1998, 2008), премии им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (2004), премии им. Н.Д. Зелинского РАН (2005), международной премии Prix Galien

Russia (в категории «Лучшее исследование в России», 2016), лауреат конкурса Фонда содействия отечественной науке в номинации «Выдающиеся ученые РАН» (2007), награжден Орденом Дружбы (1995), Орденом Почета (2003), медалью «За полезное» (2007), Почетным знаком «За заслуги перед городом Екатеринбургом» (2009), Знаком отличия «За заслуги перед Свердловской областью»

II степени (2011), Золотой медалью им. академика С.В. Вонсовского Уральского отделения РАН (2012), медалью им. И.Я. Постовского (2015). О.Н. Чупахину присвоено звание Почетного доктора Ростовского госуниверситета (2004), Почетного профессора УГТУ-УПИ (2004) и Санкт-Петербургского технологического университета (2011), Почетного гражданина города Екатеринбурга (2009).

Редакция «Российского биотерапевтического журнала» искренне поздравляет Олега Николаевича с 85-летием и желает ему крепкого здоровья и благополучия!
