

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

3

ТОМ 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)

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

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

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

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

Адрес издательства:
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. № 3. 1–70
© 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>

3^{ТОМ 18}
'19

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

3 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

Publishing 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: ПИИ № 77-11695 dated 21.01.2002; ПИИ № ФЦ77-53039 dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2019. Volume 18. No 3. 1–70
© PH "ABV-Press", 2019
Rospechat catalogue index: 81679
Printed at the Mediacolor LLC

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, В.Г. Кучеряну, Р.В. Карпова*
Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 1) 6
- Е.М. Трещалина, И.Н. Михайлова, М.В. Киселевский*
Различные роли толл-подобных рецепторов в онкотерапии 15

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- В.С. Косоруков, М.А. Барышникова, Е.Н. Кособокова, Д.Ю. Яковишина, А.С. Ершова, Ю.А. Пеков*
Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей. 23
- Б.К. Эрназарова, А.З. Джуманазарова, А.Е. Бармашов, Г.Н. Апрышко*
Поиск противоопухолевых средств среди новых углеводных производных мочевины. 31
- А.С. Гриневич, М.Н. Краева, Е.Н. Захарова, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов*
Создание иммунофлуоресцентных зондов для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии на базе моноклональных антител серии ICO с фикоэритрином — флуорофором группы фикобилипротеинов 39
- И.А. Мамичев, Т.А. Богуш, Е.А. Богуш, А.Н. Гришанина, Н.О. Вихлянцева, Н.С. Сапрыкина, А.А. Каменский*
Экспрессия бета-III тубулина в ткани рака пищевода и окружающей морфологически нормальной ткани 48
- В.А. Чалей, О.И. Коняева, Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова, В.М. Бухман, Н.Ю. Кульбачевская*
Доклиническое изучение субхронической токсичности ормустина на собаках 53
- Г.М. Волгарева, Т.С. Бельшева, Л.Э. Завалишина, Д.Б. Хестанов, О.С. Бурова, Я.В. Вишневская, М.Д. Алиев*
Врожденное пигментное новообразование кожи у ребенка: опыт диагностики 63

REVIEWS

<i>O.A. Bocharova, E.V. Bocharov, V.G. Kucheryanu, R.V. Karpova</i> Dopaminergic system: stress, depression, cancer (part 1)	6
<i>E.M. Treshalina, I.N. Mikhaylova, M.V. Kiselevskiy</i> The different roles of toll-like receptors in oncotherapy	15

ORIGINAL REPORTS

<i>V.S. Kosorukov, M.A. Baryshnikova, E.N. Kosobokova, D.Yu. Yakovishina, A.S. Ershova, Yu.A. Pekov</i> Identification of immunogenic mutant neoantigens in the genome of murine melanoma	23
<i>B.K. Ernazarova, A.Z. Dzhumanazarova, A.E. Barmashov, G.N. Apryshko</i> Search for new anticancer drugs among new carbohydrate derivatives urea	31
<i>A.S. Grinevich, M.N. Kraeva, E.N. Zakharova, D.Yu. Blokhin, P.K. Ivanov</i> The creation of immunofluorescence probes based on monoclonal antibodies series ICO and phycoerythrin – fluorophore of phycobiliprotein group for analysis of cell populations by flow cytometry	39
<i>I.A. Mamichev, T.A. Bogush, E.A. Bogush, A.N. Grishanina, N.O. Vikhljantzeva, N.S. Saprykina, A.A. Kamenskiy</i> Beta-III tubulin expression in esophageal cancer and adjacent morphologically normal tissue	48
<i>V.A. Chaley, O.I. Konyaeva, N.P. Ermakova, I.B. Merkulova, T.V. Abramova, V.M. Bukhman, N.Yu. Kulbachevskaya</i> Pre-clinical study of subchronic toxicity of ormustine in dogs	53
<i>G.M. Volgareva, T.S. Belysheva, L.E. Zavalishina, D.B. Khestanov, O.S. Burova, Ya.V. Vishnevskaya, M.D. Aliev</i> Inborn pigment skin malformation in a child: practice of diagnostics	63

ДОФАМИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА: СТРЕСС, ДЕПРЕССИЯ, РАК (ЧАСТЬ 1)

О.А. Бочарова¹, Е.В. Бочаров¹, В.Г. Кучеряну², Р.В. Карпова¹

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

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

Контакты: Ольга Алексеевна Бочарова imufarm@rambler.ru

В обзоре обсуждаются функциональные особенности дофаминергической системы. Синтез дофамина осуществляется как в центральной нервной системе, так и в желудочно-кишечном тракте. Первая часть обзора посвящена данным современной литературы о роли дофамина в механизмах старения. Вместе с тем описываются процессы, лежащие в основе депрессивного расстройства с точки зрения участия дофаминергической системы при интеграции моноаминергической, эпигенетической, воспалительной, нейротрофинной и антиапоптотической концепций.

Ключевые слова: дофаминергическая система, дофаминовый рецептор, старение, депрессивное расстройство, болезнь Паркинсона

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-6-14

DOPAMINERGIC SYSTEM: STRESS, DEPRESSION, CANCER (PART 1)

O.A. Bocharova¹, E.V. Bocharov¹, V.G. Kucheryanu², R.V. Karpova¹

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

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

The review discusses the functional features of the dopaminergic system. Dopamine synthesis is carried out both in the central nervous system and in the gastrointestinal tract. The first part of the review is devoted to the data of modern literature on the role of dopamine in the mechanisms of aging. At the same time, the processes underlying the depressive disorder in terms of the dopaminergic system participation integrating monoaminergic, epigenetic, inflammatory, neurotrophic and anti-apoptotic concepts are described.

Key words: dopaminergic system, dopamine receptor, aging, depressive disorder, Parkinson's disease

Введение

Во многих ситуациях в современном мире мы подвержены стрессу. И если острый стресс может иметь положительное воздействие на организм, то хроническое состояние стресса, как правило, наносит вред здоровью, приводя к серьезным заболеваниям, в том числе к раку, который считают болезнью старения. Принимая во внимание адгезионную концепцию возникновения новообразований, злокачественный рост можно расценивать как стремительное старение клеток органа [1]. По этой причине применение антидепрессантов и геропротекторов для онкологических больных может быть целесообразным. Из литературы известно, что дофамин, недостаток которого играет существенную роль при старении и стрессе, ограничивает развитие опухолей [2]. В связи с этим выдвигается гипотеза о роли центральных нейрональных процессов с участием дофаминерги-

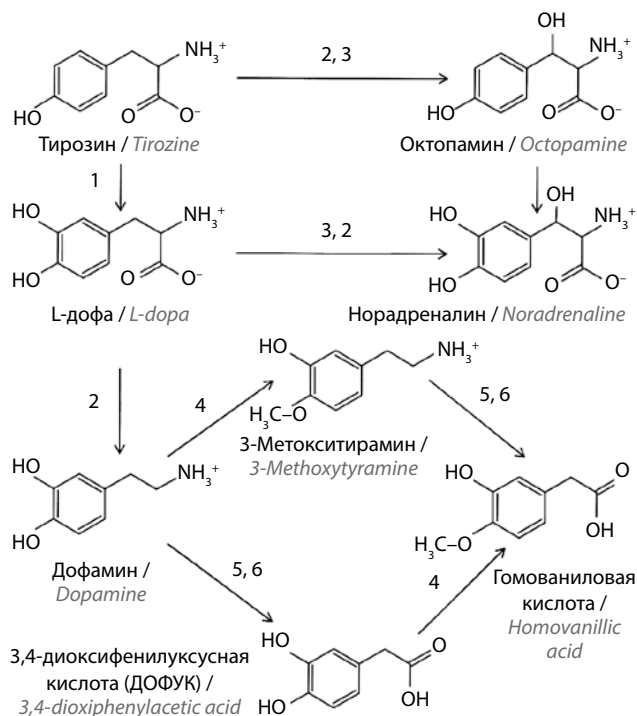
ческой системы в механизмах контроля злокачественного роста.

Роль дофамина в процессе старения

Дофамин является 2-(3,4-дигидроксифенил)-этиламин и относится к основным нейромедиаторам головного мозга. Образуется он из аминокислоты тирозина. Основные пути метаболизма дофамина в организме показаны на рисунке [3].

С момента появления более чем 50 лет назад представления о том, что дофамин является не только предшественником норадреналина и адреналина, но и обладает самостоятельной регуляторной активностью в центральной нервной системе (ЦНС), он остается одним из наиболее изучаемых моноаминергических нейротрансмиттеров [4].

Несмотря на то что нейроны могут жить более 100 лет, а нейрогенез способен заменять погибшие



Основные пути образования и обмена дофамина: 1 – тирозингидроксилаза; 2 – дофа-декарбоксилаза; 3 – катехоламин-β-гидроксилаза; 4 – катехоламин-О-метилтрансфераза; 5 – моноаминоксидаза; 6 – альдегиддегидрогеназа

Main pathways of dopamine production and metabolism: 1 – tyrosine hydroxylase; 2 – dopa decarboxylase; 3 – catecholamine-β-hydroxylase; 4 – catecholamine-O-methyltransferase; 5 – monoamine oxidase; 6 – aldehyde dehydrogenase

нейроны, в течение жизни происходит функциональное угасание дофаминергической системы. Дофаминовые нейроны считаются центральными факторами старения, а функциональное подавление дофаминергической системы может быть одним из основных механизмов этого процесса [5–7].

Потерю дофаминовых нейронов в качестве ключевого фактора старения связывают с угасанием когнитивных и моторных функций. Снижение уровня нейронов с возрастом выявлено в нигростриатных и гиппокампальных участках головного мозга [8]. Стоит отметить, что участки мозга, вовлеченные в регуляцию когнитивных и двигательных функций, очень чувствительны к окислительному стрессу, который с возрастом усугубляется [9, 10].

Полифункциональность дофаминергической системы обусловлена ее широким распространением в структурах мозга. Среди дофаминергических путей обычно выделяют 4 основные системы: нигростриатную, мезолимбическую, мезокортикальную и тубероинфундибулярную [11].

Нигростриатная система формируется нейронами среднего мозга компактной зоны черной субстанции и заканчивается в полосатом теле. Являясь частью двигательной системы, она содержит около 80 % до-

фаминовых нейронов головного мозга. Поскольку повреждения в этой системе вызывают болезнь Паркинсона, она привлекает особое внимание исследователей. Нигростриатная система наиболее восприимчива к потере функции дофаминовых нейронов при старении [12, 13]. В молодом возрасте у людей обнаруживают чрезвычайно большое их количество в черной субстанции, а у новорожденных в этой части мозга насчитывается около 400 тыс. таких нервных клеток. К 60 годам их число уменьшается до 250 тыс. Пожилой возраст является основным фактором риска развития болезни Паркинсона, для которой характерна десятикратно ускоренная потеря нигральных дофаминовых нейронов, в результате чего их число колеблется между 60 и 120 тыс. [3, 11, 13].

Мезолимбическая система, включающая в себя структуры лимбической, иннервируется терминалями нейронов среднего мозга и вентральной тегментальной области. Дисфункция мезолимбической дофаминергической системы приводит к нарушениям когнитивных функций, психическим и эмоциональным расстройствам, таким как реактивные психозы, шизофрения, депрессия [11]. Мезолимбическая система, менее чувствительная к нарушениям, отвечает также за снижение мотивационных и эмоциональных функций.

Тубероинфундибулярная (аксоны в нейрогипофизарном комплексе и промежуточной части аденогипофиза) и перивентрикулярная (в дорсальном и переднем гипоталамусе) дофаминергические системы участвуют в нейроэндокринной регуляции [11].

В процессе повреждения и гибели дофаминовых нейронов при старении участвуют механизмы, усиливающие развитие окислительного стресса:

- образование свободных радикалов с помощью моноаминоксидаз, что приводит к образованию токсичных продуктов дофаминового метаболизма;
- низкий уровень антиоксидантной защиты в мозге (особенно каталазы);
- низкая экспрессия нейротрофических факторов в области уязвимости дофаминовых нейронов (например, черная субстанция);
- высокий уровень ионов железа, связанный с возможным нарушением регуляции гема;
- обилие окисляемых ненасыщенных жирных кислот [14, 15].

Кроме того, фермент тирозингидроксилаза (ТГК), участвующий в образовании дофамина, может быть ингибирован окислением [16]. С увеличением возраста в дофаминовых нейронах черной субстанции также обнаружен высокий уровень мутаций в митохондриальной ДНК [17].

Уменьшение содержания дофамина и его предшественника тирозина обуславливает дегенеративные процессы аксонов, которые связывают с агрегацией фосфорилированной ТГК и альфа-синуклеина [18, 19].

Выявлено, что потеря дофаминовых нейронов опосредована воспалительными процессами в микроглии. Последняя может быть активирована нейротоксинами, патогенами, фрагментами белков и клетками с экспрессией маркеров апоптоза. Активированная микроглия элиминирует нейроны, в том числе с помощью продукции свободных радикалов и цитокинов [20, 21]. У пожилых людей (≈ 80 лет) выявлена значимая реактивность микроглии в черной субстанции головного мозга, что способствует гибели дофаминовых нейронов [22].

Синтез дофамина также с возрастом снижается. Вместе с тем падает активность ТГК, которая может быть и полностью утрачена. В результате в нейронах накапливается нейромеланин в качестве конечного продукта деградации дофамина. При этом работоспособность дофаминового транспортера с возрастом снижается более интенсивно, чем активность ТГК.

Первые морфологические признаки старения человеческого мозга наблюдают в белом веществе уже к 20–40 годам, а к 40–50 годам — и в сером веществе [23]. С увеличением возраста от 50 до 90 лет масса мозга снижается на 2–3 % за десятилетие. При оценке уровня пигментированных (нейромеланином) нейронов в зависимости от возраста установлено, что их потеря составляет примерно 10 % за десятилетие, что приводит к максимальному снижению в пожилом возрасте примерно на 80 %. Кроме того, наблюдается потеря маркеров дофамина (в том числе ТГК, дофаминового транспортера и дофаминовых рецепторов (ДР)), которая составляет 6–10 % за десятилетие с кульминацией 40–50 % потери в возрасте 88 лет [9, 22, 24]. Показано, что у людей от 44 до 88 лет происходит потеря ТГК-позитивных нейронов в черной субстанции. Однако выявлено существенно меньшее снижение уровня дофаминовых нейронов у лиц, переживших возраст 100 лет [25].

Применение физических упражнений, диетического ограничения, эстрогенов и пролактина приводит к увеличению активности ДР. В целом данные свидетельствуют о том, что меры, усиливающие передачу дофамина, предотвращают возрастное снижение двигательных и познавательных функций мозга [9].

Таким образом, все изложенное подтверждает мнение многих исследователей о том, что дофаминовые нейроны участвуют в «интриге», ограничивающей жизнь, в связи с чем они считаются главными биомаркерами старения [26].

Дофамин как эндогенный антидепрессант

Интерес к функционированию дофаминергической системы в последнее время связан также с ее вероятным участием в патогенезе депрессивных расстройств, которыми страдают 350 млн человек во всем мире или около 20 % населения земного шара.

Дофамин при этом характеризуется как эндогенный антидепрессант.

Потеря дофаминовых нейронов черной субстанции головного мозга была выявлена у пациентов при некоторых видах депрессии. А учитывая действие дофамина в качестве антидепрессанта при депрессивном синдроме (ДС), потерю данных нейронов классически связывают с расстройствами при психозах и токсикомании. Кроме того, получено подтверждение клинической эффективности терапии с использованием агонистов дофамина при депрессии. Возрастные депрессивные расстройства также можно объяснить с позиций гибели дофаминовых нейронов [26].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе ДС, можно рассматривать с точки зрения участия дофаминергической системы в плане объединения концепций ДС: моноаминергической, воспалительной, эпигенетической, нейротрофинной и антиапоптотической [27].

Моноаминергическая гипотеза полагает, что депрессия вызывается снижением моноаминергической функции головного мозга. Основными моноаминами мозга являются серотонин (5-НТ), дофамин и норадреналин. Взаимодействие 5-НТ и норадреналина способствует выделению дофамина. В частности, в ходе исследований, проведенных с участием животных, было выдвинуто предположение, что антидепрессанты изменяют активацию дофаминергической системы [28], т. е. можно допустить, что хорошее настроение требует соответствующего уровня дофамина. Очевидно, недостаток содержания дофамина сочетается с развитием ДС. Вызывает интерес мнение о том, что этот молекулярный механизм может обеспечивать ЦНС способностью развивать гибкое поведение в ответ на изменения окружающей обстановки [29]. Так, у мышей при нокаутированном транспортере дофамина выявлена неспособность приспосабливаться к окружающей среде (поведенческая негибкость), однако этот дефект уменьшился после введения галоперидола (блокатор ДР D2). С учетом того, что активация дофаминергической системы связана с мотивацией и жизнелюбием и что эти состояния утрачены при ДС, этот эффект может представлять лечебный потенциал антидепрессантных средств [30, 31].

Функции систем дофамина и норадреналина взаимодополняемы [32]. Транспортер норадреналина, который является мишенью для некоторых антидепрессантов, способен переносить и дофамин. С другой стороны, серотонинергическая и дофаминергическая системы взаимозаменяемы. Рецепторы 5-НТ экспрессируются дофаминовыми нейронами в среднем мозге, а окончания 5-НТ-нейронов способны выделять дофамин при активности интернейронов [27].

Различные изоформы 5-НТ-рецепторов образуют систему 5-НТ, которая необходима для регуляции выделения дофамина. В частности, блокировка 5-НТ_{1A} (метаболит серотонина) приводит к повышению уровня дофамина в структурах головного мозга и подавлению активности дофаминергической системы в префронтальной коре. Эти эффекты могут поддерживать гипотезу о том, что десенсибилизация 5-НТ_{1A} способна привести к активации в глубоких частях мозга дофаминергической системы, которая связана с хорошим настроением, чего не хватает пациентам с ДС.

С учетом взаимосвязи моноаминергических систем в настоящий период актуальным является создание антидепрессантов, нацеленных на дофаминергическую систему опосредованно через норадреналин и 5-НТ. Существуют свидетельства, что при наркозависимости антидепрессанты, включающие дофамины, действуют лучше по сравнению с другими. Например, дофамин-антидепрессант номифензин действует через модуляцию взаимодействий 5-НТ, норадреналина и дофамина, что считается ключевым моментом для лечебного эффекта. В результате последних исследований были предложены нейрелептики II поколения, препараты-модуляторы дофамина и 5-НТ в качестве потенциальных антидепрессантов быстрого действия [33, 34].

Таким образом, можно полагать, что события, управляемые дофаминовыми нейронами, лежат в основе эффекта антидепрессантов.

Нейротрофинная гипотеза. Нейротрофины являются широко распространенной группой молекул в ЦНС и периферической нервной системе, включая мозговой нейротрофический фактор (МНТФ), фактор роста нервов, нейротрофин-3, -4, -5 и -6, глиальный нейротрофический фактор, фактор роста фибробластов нейрокин (нейропоэтин). Нейрональный рост регулируется сложной и плохо расшифрованной сетью событий, в которой нейротрофины играют свою роль [35].

Как один из самых распространенных нейротрофинов МНТФ действует на центральные и периферические нейроны, способствуя их выживанию, повышает численность, а также дифференцировку новых нейронов и синапсов. В головном мозге МНТФ особенно активен в гиппокампе, коре и переднем мозге. Эти области отвечают за обучение и память. МНТФ важен также для долговременной памяти. При экспериментальном хроническом стрессе у животных (модель ДС) выявлен более высокий уровень МНТФ в прилежащем ядре по сравнению с группой контроля. Мыши с врожденным отсутствием способности синтеза МНТФ имеют явные нарушения чувствительной сферы и погибают вскоре после рождения. Вероятно, МНТФ играет важную роль в нормальном развитии нервной системы [36].

Активность нейротрофинов связана с различными психическими и нервными заболеваниями. С учетом способности нейротрофинов стимулировать образование новых нейрональных структур в ответ на внешние и внутренние раздражители была предложена нейротрофинная гипотеза ДС [37]. Согласно этой гипотезе экспрессия МНТФ подавлена во время депрессивных состояний, а лечение антидепрессантами может быть направлено на восстановление этого баланса [38]. Сочетанное применение диетических добавок и физических упражнений способствует повышению уровня МНТФ и mPFC в гиппокампе, а также содержания фактора роста эндотелия сосудов в сыворотке крови хронически стрессированных животных [39].

Установлено, что у старых крыс в медиальной префронтальной коре, участвующей в механизмах памяти, снижается экспрессия нейропептида Y. При этом введение фактора роста нервов предотвращает это нарушение. Последнее свидетельствует о том, что нейротрофические факторы способствуют сохранению когнитивных функций с увеличением возраста [40].

Лечение антидепрессантами усиливает передачу 5-НТ, что способствует восстановлению модуляции дофаминергической системы с установлением баланса дофамина для надлежащей секреции нейротрофинов, которая необходима для организации новых нейрональных структур в ответ на внутренние и внешние стимулы. Эти молекулярные механизмы могут лежать в основе эффективности антидепрессантов.

Теория воспаления. Уже более 70 лет известно, что иммунные медиаторы играют роль в патофизиологии психических заболеваний, однако молекулярные нарушения до сих пор малопонятны. Одним из наиболее известных аспектов теории является так называемая слабость поведения, что может представлять собой иммунологическую модель ДС. Кто когда-либо болел гриппом, знает, что при этом заболевании наступает слабость. Больной отказывается от еды и питья, теряет интерес к физической и социальной среде, что, в общем, напоминает симптомы ДС [41]. При использовании у добровольцев потенциальных активаторов, провоспалительных цитокинов было обнаружено, что они вызывают небольшую лихорадку, анорексию, беспокойство, подавленное настроение и когнитивные нарушения. Более того, уровни беспокойства, депрессии и когнитивные нарушения связаны с содержанием циркулирующих цитокинов [42]. Введение, например, интерферона α (в терапии гепатита С или злокачественной меланомы) может вызвать симптомы депрессии, включая суицидальные мысли [43, 44].

R.S. Smith один из первых указал на роль цитокинов в «макрофагальной теории депрессии», что

в дальнейшем поддерживалось несколькими авторами. Считалось, что депрессия связана с острой фазой воспаления, поскольку повышенные концентрации воспалительных биомаркеров в крови были обнаружены у пациентов с тяжелой депрессией. Согласно этой теории провоспалительные цитокины также вызывают клинические признаки депрессии, в том числе гиперактивность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (что тоже провоцируется выраженным стрессом), нарушенный метаболизм 5-НТ и нейровегетативные симптомы [45, 46]. Однако эта теория имеет некоторые ограничения: а) биомаркеры воспаления у депрессивных больных повышены не всегда; б) не всегда стимуляция иммунной системы вызывает похожее на депрессию расстройство; в) общего механизма между центральными эффектами цитокинов и нейробиологическими основами депрессии не найдено; г) уменьшение воспалительной реакции не снижает уровень депрессивных симптомов [47].

Тем не менее требуется выяснить внутриклеточные молекулярные механизмы, которые объединили бы воспаление и депрессию.

Эпигенетическая теория. Еще одна гипотеза развития ДС основывается на эпигенетике. Наблюдения о том, что ответ на антидепрессанты появляется не сразу, а через несколько недель, что они требуют длительного введения для достижения клинического эффекта, заставляют ученых исследовать долговременные эффекты антидепрессантов на молекулярном уровне. Была выдвинута гипотеза, что регуляция экспрессии генов может быть одним из механизмов, который опосредует стабильную и нестабильную адаптацию мозга. Вместе с тем изменения уровня мРНК были зарегистрированы в определенных областях мозга как на экспериментальных моделях психического заболевания животных, так и в мозге человека, что было связано с изменением поведения [48].

Известно, что хроматин существует в инактивированном, конденсированном состоянии (гетерохроматин), что препятствует транскрипции генов, а также в активированном состоянии (еухроматин), что способствует генной транскрипции. Активация хроматина связана с ацетилированием близлежащих гистонов, хотя до сих пор неясно, влияет ли это событие, прямо или косвенно, на активацию хроматина. С другой стороны, подавление этого состояния может быть связано с метилированием гистонов или другой их модификацией, что до сих пор также непонятно. Вместе с тем могут иметь место несколько более сложных промежуточных молекулярных этапов между двумя состояниями хроматина, моделирующих экспрессию гена во времени и пространстве [49].

Такие механизмы регулируют экспрессию специфических наборов нейрональных генов, связанных

с нейрональной активностью, выживанием и в конечном итоге — комплексной регуляцией сложного поведения. Так, показано, что материнская забота самок крыс, характеризующаяся усилением вылизывания и повышением ухоженности детенышей, приводит к подавлению глюкокортикоидных рецепторов промотора метилирования [50]. Это событие способствует эффекту снижения тревожности у взрослых крыс и является обратимым при инфузии метионина [51].

Вместе с тем работы на поведенческих экспериментальных моделях показали существенное эпигенетическое влияние на баланс дофамина. Было, например, выявлено, что кормление беременных мышей низкобелковой диетой приводило к изменению поведения рожденного потомства с гиперактивированной дофаминергической системой. Это событие эпигенетически связано с недостатком контроля экспрессии специфического белка, циклинзависимого ингибитора киназы 1С, чьи показатели метилирования хуже по сравнению с нормальным белком. Если подобные стрессорные факторы играют роль в развитии психических расстройств у человека, то такое молекулярное событие может быть существенным для выявления предрасположенности к болезни, выработки стратегии профилактики ДС и других психических нарушений [52].

Введение ингибитора гистонацетилазы вызывает антидепрессантный эффект в поведенческой модели депрессии на мышах с усилением его при дополнительном введении флюоксетина и повышением экспрессии МНТФ [53]. Более того, один из часто используемых стабилизаторов настроения вальпроевая кислота является ингибитором гистонацетилазы. Этот механизм может служить посредником при стабилизации эффекта настроения через усиление экспрессии МНТФ в головном мозге [54]. Показано также, что модификации гистонов приводят к долгосрочным эффектам регуляции генов, которые, скорее всего, ответственны за антидепрессантный эффект [49]. Таким образом, вероятно, несколько эпигенетических модификаций вместе участвуют как в механизме развития депрессии, так и в механизме воздействия антидепрессантов [48].

Антиапоптотическая гипотеза. Также была выдвинута гипотеза о вовлечении путей апоптоза в патофизиологические механизмы развития ДС и ответа на антидепрессанты [55]. Запрограммированная гибель клеток имеет существенное значение для гомеостаза тканей, оборота иммунных клеток и нейронов. В частности, апоптоз очень важен для нормального развития мозга и периферической нервной системы [56]. С учетом того, что нейроны образуются в избытке и конкурируют при этом за контакты друг с другом, факторы выживания вырабатываются для них ограниченно. Гибель, как правило, зависит от

функциональности клеток и уровня источников питания. Поэтому нейроны со сниженной электрической активностью и трофической поддержкой — первые кандидаты на гибель путем апоптоза. Биохимический путь апоптоза, как правило, является одним из двух — внешним или внутренним. Оба реагируют на разные стимулы, но в конечном итоге все завершается активацией протеаз и деградацией клеток [57].

Апоптоз нейронов гиппокампа может иметь значение в нейрогенезе, а также в патогенезе ДС [58]. В исследовании *post-mortem* у пациентов с ДС показано снижение экспрессии и активности фермента ERK1/2, который играет роль в нейропластичности и выживаемости клеток в области мозга, участвующей в патогенезе ДС [59]. Интересно, что подавление активности ERK1/2 непосредственно не приводит к апоптозу, но снижает статус фосфорилирования некоторых апоптотических медиаторов, например членов семейства BHLH, которые делают нейронную популяцию более восприимчивой к гибели [60, 61]. Вместе с тем генетические работы дополнили доказательства, поддерживающие роль апоптоза в генезе депрессии и реакциях на антидепрессанты. В частности, выявлена связь между ДС и различными вариантами гена *APAF1*, кодирующего белок, необходимый для обеспечения выживаемости нейронов [62].

Наряду с этим было выявлено, что антидепрессанты могут подавлять нейрональную гибель. Исследования на животных показали, что участие антидепрессантов в предотвращении гибели нервных клеток, вероятно, заключается в повышении высвобождения нейротрофинов и усилении экспрессии их рецепторов [63]. Введение флуоксетина, например, снижало гибель нейронов в зубчатой фасции гиппокампа (смерть нейронов была вызвана стрессом при разделении матерей и детенышей крыс) [64]. Тианепин также после стресса сократил количество апоптотических клеток в височной коре, гранулярном клеточном слое и зубчатой фасции гиппокампа древесной землеройки [65].

Можно предположить несколько механизмов, с помощью которых антидепрессанты могут подавлять гибель нейронов по пути апоптоза [55]. Во-первых, воздействие антидепрессантами может вызывать изменения на митохондриальном уровне, предотвращая активацию каспаз, как выявлено в исследованиях *in vitro* [66, 67]. Во-вторых, все больше данных свидетельствует о том, что антидепрессанты влияют на некоторые клеточные события, вызываемые хроническим стрессом. В частности, лечение антидепрессантами, вероятно, повышает трансдукцию субсемейства Bcl-2 белка, который обладает свойствами, способствующими выживанию, и предотвращает увеличение проницаемости митохондриальной мем-

браны, которое приводит к клеточной гибели в нескольких областях мозга, связанных с депрессией [68, 69]. Тем не менее конкретные клеточные механизмы, с помощью которых антидепрессанты усиливают экспрессию белков Bcl-2, являются до сих пор неизвестными. Однако, возможно, они активируют такой специфический фактор транскрипции, как FOXO3A. Кроме того, другие белки с антиапоптотическими свойствами (в основном фактора роста эндотелия сосудов) подвергаются модуляциям при лечении антидепрессантами [55]. Эти данные представляют некоторые доказательства эффективности антидепрессантов в предотвращении гибели нейронов по пути апоптоза.

Результаты последних исследований предполагают участие дофамина в процессе апоптоза нейронов в ЦНС. Связующим между дофамином и апоптозом является белок Par-4, участвующий в проапоптотических событиях и формирующий нейрональные структуры в ЦНС. Этот белок образует молекулярные комплексы дофаминовых нейронов с ДР D2, конкурируя с кальцием за связывание белка кальмодулина. Кроме того, у мышей с нарушенной системой Par-4/D2 появлялись депрессивные симптомы. В других исследованиях отмечено, что Par-4 был подавлен у 64 % пациентов с депрессией по сравнению с группой контроля (здоровые люди). Эти данные свидетельствуют о существенной роли Par-4/D2 в функционировании дофаминергической системы [70]. Таким образом, классический механизм гибели дофаминовых нейронов по типу апоптоза, происходящий в том числе и при болезни Паркинсона, может быть важным и для понимания основы ДС.

Наконец, еще одно взаимодействие дофаминовых нейронов и апоптоза можно рассматривать в связи с антипсихотическими препаратами. Известно, что соответствующая дофаминовая трансмиссия может поддерживать гибкость ЦНС, необходимую для должного поведения при ответе на изменения окружающей среды [71]. Было показано, что антипсихотические лекарственные средства (антагонисты ДР D2) могут модулировать апоптоз посредством фосфорилирования Akt/гликогенсинтазы-киназы-3 (GSK3 — белок, участвующий в нескольких функциях, среди которых апоптоз и синаптическая пластичность) [72]. Можно полагать, что ключевым моментом достижения модуляции являются сигналы дофамина. В самом деле, дофаминовая трансмиссия может привести к нарушению стабильности механизма апоптоза.

Таким образом, комплексный характер самой депрессии отражает гетерогенность заболевания. В конечном итоге следует учитывать вероятность того, что депрессия представляет собой результат множества независимых патофизиологических механизмов, являясь итогом взаимодействия разных эндогенных

и экзогенных факторов [73]. С этой точки зрения можно полагать, что изменения дофаминергической системы могут представлять собой конечный общий этап нескольких независимых патофизиологических механизмов ДС.

В итоге отметим, что механизм действия антидепрессантов остается в основном неизвестным, как и патофизиология депрессии и связанных с ней расстройств. Однако некоторый прогресс в этой области существует, поскольку наблюдается явная эффективность некоторых антидепрессантов. Внимательный

анализ множественных взаимодействий между системами может объединить, очевидно, разные теории. С этой целью мы сконцентрировались на дофаминергической системе. Современные достижения обстоятельных знаний патофизиологии расстройств и молекулярных механизмов действия антидепрессантов (в свете взаимодействий между 5-НТ-, норадреналин- и дофаминергическими системами) перспективны для более совершенного контроля заболевания, а в идеале — для его предотвращения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочарова О.А. Адгезионная концепция в биологии злокачественного роста. Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2014;(2):87–93. [Bocharova O.A. Adhesive concept in biology of malignant growth. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimentalnaya terapiya* = *Pathological Physiology and Experimental Therapy* 2014;(2):87–93. (In Russ.)].
2. Krizanova O., Babula P., Pacak K. Stress, catecholaminergic system and cancer. *Stress* 2016;19(4):419–28. DOI: 10.1080/10253890.2016.1203415.
3. Крыжановский Г.Н., Карабань И.Н., Магаева С.В. и др. Болезнь Паркинсона: этиология, патогенез, клиника, диагностика, лечение, профилактика. М.: Медицина, 2002. 372 с. [Kryzhanovskiy G.N., Karaban I.N., Magaeva S.V. *Parkinson's disease: etiology, pathogenesis, clinic, diagnosis, treatment, prevention*. M.: *Meditsina* = *Medicine*, 2002. 372 p. (In Russ.)].
4. Iversen S.D., Iversen L.L. Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 2007;30(5):188–93. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.002.
5. Гомазков О.А. Зачем мозгу нужны новые нервные клетки? М.: Икар, 2016. 140 с. [Gomazkov O.A. *Why the brain new nerve cells need?* Moscow: *Ikar*, 2016, 140 p. (In Russ.)].
6. Spalding K.L., Bergmann O., Alkass K. et al. Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans. *Cell* 2013;153(6):1219–27. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.002.
7. Ho N.F., Hooker J.M., Sahay A. et al. *In vivo* imaging of adult human hippocampal neurogenesis: progress, pitfalls and promise. *Mol Psychiatry* 2013;18(4):404–16. DOI: 10.1038/mp.2013.8.
8. Bjorklund A., Dunnet S.B. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neuroscience* 2007;30(5):194–202. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006.
9. Reeves S., Bench C., Howard R. Ageing and the nigrostriatal dopaminergic system. *Int J Geriatr Psychiatry* 2002;17(4):359–70. DOI: 10.1002/gps.606.
10. Evans M.D., Dizdaroğlu M., Cooke M.S. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mut Res* 2004;567(1):1–61. DOI: 10.1016/j.mrrev.2003.11.001.
11. Альперина Е.Л. Вклад дофаминергической системы в механизмы иммуномодуляции. Успехи физиологических наук 2014;45(3):45–56. [Alperina E.L. Involvement of the dopaminergic system in the mechanisms of immunomodulation. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk* = *Advances in Physiological Sciences* 2014;45(3):45–56 (In Russ.)].
12. Paladini C.A., Roeper J. Generating bursts (and pauses) in the dopamine midbrain neurons. *Neuroscience* 2014;282:109–21. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.032.
13. Rangel-Barajas C., Coronel I., Floran B. Dopamine receptors and neurodegeneration. *Aging Dis* 2015;6(5):349–68. DOI: 10.14336/AD.2015.0330.
14. Gao H.M., Liu B., Hong J.S. Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 2003;23(15):6181–7. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-15-06181.2003.
15. Halliwell B. Proteasomal dysfunction: a common feature of neurodegenerative diseases? Implications for the environmental origins of neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(11–12):2007–719. DOI: 10.1089/ars.2006.8.2007.
16. Borges C.R., Geddes T., Watson J.T., Kuhn D.M. Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation: potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J Biol Chem* 2002;277(50):48295–302. DOI: 10.1074/jbc.M209042200.
17. Parkinson G.M., Dayas C.V., Smith D.W. Increased mitochondrial DNA deletions in substantia nigra dopamine neurons of the aged rat. *Curr Aging Sci* 2014;7(3):155–60. DOI: 10.2174/1874609808666150122150850.
18. Cruz-Muros I., Afonso-Oramas D., Abreu P. et al. Aging of the rat mesostriatal system: Differences between the nigrostriatal and mesolimbic compartments. *Exp Neurol* 2007;204(1):147–61. DOI: 10.1016/j.expneurol.2006.10.004.
19. Gruden M.A., Yanamandra K., Kucheryanu V.G. et al. Correlation between protective immunity to α -synuclein aggregates, oxidative stress and inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2012;19(6):334–42. DOI: 10.1159/000341400.
20. Бочаров Е.В., Крыжановский Г.Н., Полещук В.В. и др. Нарушение иммунной и антиоксидантной защиты при болезни Паркинсона. Патогенез 2012;(2):11–4. [Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Poleshchuk V.V. et al. Immune and antioxidant disorders in Parkinson's disease. *Patogenez* = *Pathogenesis* 2012;(2):11–4. (In Russ.)].
21. Крыжановский Г.Н., Магаева С.В., Морозов С.Г. Актуальные проблемы нейроиммунопатологии. М.: Гениус Медиа, 2012:131–47. [Kryzhanovsky G.N., Magaeva S.V., Morozov S.G. *Actual problems of neuroimmunopathology*. Moscow: *Genius Media*, 2012: 131–47 (In Russ.)].
22. Beach T.G., Sue L.I., Walker D.G. et al. Marked microglial reaction in normal aging human substantia nigra: correlation with extraneuronal neuromelanin pigment deposits. *Acta Neuropathol* 2007;114(4):419–24. DOI: 10.1007/s00401-007-0250-5.
23. Пальцын А.А., Комиссарова С.В. Возрастные изменения мозга.

- Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2015;59(4):108–16. [Paltyn A.A., Komissarova S.V. Age-related changes of the brain. Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya = Pathological physiology and experimental therapy 2015;59(4):108–16. (In Russ.)].
24. Backman L., Nyberg L., Lindenberger U. et al. The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: Current status and future prospects. *Neurosci Biobehav Rev* 2006;30(6):791–807. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2006.06.005.
 25. Kubis N., Faucheux B.A., Ransmayr G. et al. Preservation of midbrain catecholaminergic neurons in very old human subjects. *Brain* 2000;123(20):366–73.
 26. Rollo C.D., Dopamine and aging: intersecting facets. *Neurochem Res* 2009;34(4):601–29. DOI: 10.1007/s11064-008-9858-7.
 27. Porcelli S., Drago A., Fabbri C., Serretti A. Mechanisms of antidepressant action: an integrated dopaminergic perspective. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011;35(7):1532–43. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2011.03.005.
 28. Friedman A., Deri I., Friedman Y. et al. Decoding of dopaminergic mesolimbic activity and depressive behavior. *J Mol Neurosci* 2007;32(1):72–9. DOI: 10.1007/s12031-007-0016-5.
 29. Collingridge G.L., Peineau S., Howland J.G., Wang Y.T. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2010;11(7):459–73. DOI: 10.1038/nrn2867.
 30. Morice E., Billard J.M., Denis C. et al. Parallel loss of hippocampal LTD and cognitive flexibility in a genetic model of hyperdopaminergia. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(10):2108–16. DOI: 10.1038/sj.npp.1301354.
 31. Wise R.A. Forebrain substrates of reward and motivation. *J Comp Neurol* 2005;493(1):115–21. DOI: 10.1002/cne.20689.
 32. Carboni E., Silvagni A. Dopamine reuptake by norepinephrine neurons: exception or rule? *Crit Rev Neurobiol* 2004;16(1–2):121–8. DOI: 10.1615/CritRevNeurobiol.v16.i1.130.
 33. Thase M.E. Bipolar depression: diagnostic and treatment considerations. *Dev Psychopathol* 2006;18(4):1213–30. DOI: 10.1017/S0954579406060585.
 34. Weisler R.H., Calabrese J.R., Thase M.E. et al. Efficacy of quetiapine monotherapy for the treatment of depressive episodes in bipolar I disorder: a post hoc analysis of combined results from 2 double-blind, randomized, placebo-controlled studies. *J Clin Psychiatry* 2008;69(5):769–82. DOI: 10.4088/JCP.v69n0510.
 35. Obara Y., Nakahata N. The signaling pathway of neurotrophic factor biosynthesis. *Drug News Perspect* 2002;15(5):290–98. DOI: 10.1358/dnp.2002.15.5.840042.
 36. Yamada K., Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 2003;91(4):267–70. DOI: 10.1254/jphs.91.267.
 37. Lang U.E., Jockers-Scherubl M.C., Hellweg R. State of the art of the neurotrophin hypothesis in psychiatric disorders: implications and limitations. *J Neural Transm* 2004;111(3):387–411. DOI: 10.1007/s00702-003-0100-0.
 38. Brunoni A.R., Lopes M., Fregni F. A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008;11(8):1169–80. DOI: 10.1017/S1461145708009309.
 39. Hutton C.P., Déry N., Rosa E. et al. Synergistic effects of diet and exercise on hippocampal function in chronically stressed mice. *Neuroscience* 2015;308:180–93. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.09.005.
 40. Pereira P.A., Millner T., Vilela M. et al. Nerve growth factor-induced plasticity in medial prefrontal cortex interneurons of aged Wistar rats. *Exp Gerontol* 2016;85:59–70. DOI: 10.1016/j.exger.2016.09.017.
 41. Dantzer R., Bluthé R.M., Gheusi G. et al. Molecular basis of sickness behavior. *Ann NY Acad Sci* 1998;856:132–8. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb08321.x.
 42. Reichenberg A., Kraus T., Haack M. et al. Endotoxin-induced changes in food consumption in healthy volunteers are associated with TNF-alpha and IL-6 secretion. *Psychoneuroendocrinology* 2002;27(8):945–56. DOI: 10.1016/S0306-4530(01)00101-9.
 43. Dieperink E., Ho S.B., Tetrack L. et al. Suicidal ideation during interferon-α2b and ribavirin treatment of patients with chronic hepatitis C. *Gen Hosp Psychiatry* 2004;26(3):237–40. DOI: 10.1016/j.genhosppsych.2004.01.003.
 44. Kraus M.R., Schafer A., Faller H. et al. Psychiatric symptoms in patients with chronic hepatitis C receiving interferon alfa-2b therapy. *J Clin Psychiatry* 2003;64(6):708–14. DOI: 10.4088/JCP.v64n0614.
 45. Maes M., Smith R., Scharpe S. The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology* 1995;20(2):111–6. DOI: 10.1016/0306-4530(94)00066-J.
 46. Parker K.J., Schatzberg A.F., Lyons D.M. Neuroendocrine aspects of hypercortisolism in major depression. *Horm Behav* 2003;43(1):60–6. DOI: 10.1016/S0018-506X(02)00016-8.
 47. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 2008;9(1):46–56. DOI: 10.1038/nrn2297.
 48. Tsankova N.M., Renthal W., Kumar A., Nestler E.J. Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 2007;8(5):355–67. DOI: 10.1038/nrn2132.
 49. Tsankova N.M., Kumar A., Nestler E.J. Histone modifications at gene promoter regions in rat hippocampus after acute and chronic electroconvulsive seizures. *J Neurosci* 2004;24(24):5603–10. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0589-04.2004.
 50. Weaver I.C., Cervoni N., Champagne F.A. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 2004;7(8):847–54. DOI: 10.1038/nn1276.
 51. Weaver I.C., Champagne F.A., Brown S.E. et al. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci* 2005;25(47):11045–54. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3652-05.2005.
 52. Vucetic Z., Kimmel J., Totoki K. et al. Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes. *Endocrinology* 2010;151(10):4756–64. DOI: 10.1210/en.2010-0505.
 53. Schroeder F.A., Lin C.L., Crusio W.E., Akbarian S. Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse. *Biol Psychiatry* 2007;62(1):55–64. DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.06.036.
 54. Yasuda S., Liang M.H., Marinova Z. et al. The mood stabilizers lithium and valproate selectively activate the promoter IV of brain-derived neurotrophic factor in neurons. *Mol Psychiatry* 2009;14(1):51–9. DOI: 10.1038/sj.mp.4002099.
 55. McKernan D.P., Dinan T.G., Cryan J.F. “Killing the Blues”: a role for cellular suicide (apoptosis) in depression and the antidepressant response? *Prog Neurobiol* 2009;88(4):246–63. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2009.04.006.
 56. Akhtar R.S., Ness J.M., Roth K.A. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(2–3):189–203. DOI: 10.1016/j.bbamer.2003.10.013.
 57. Mattson M.P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(2):120–9. DOI: 10.1038/35040009.
 58. Buss R.R., Sun W., Oppenheim R.W. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development.

- Annual Reviews 2006;29:1–35.
DOI: 10.1146/annurev.neuro.29.051605.112800.
59. Dwivedi Y., Rizavi H.S., Pandey G.N. Antidepressants reserve corticosterone-mediated decrease in brain-derived neurotrophic factor expression: differential regulation of specific exons by antidepressants and corticosterone. *Neuroscience* 2006;139(3):1017–29. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2005.12.058.
 60. Duman C.H., Schlesinger L., Kodama M. et al. A role for MAP kinase signaling in behavioral models of depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 2007;61(5):661–70. DOI: 10.1016/j.biopsych.2006.05.047.
 61. Pittenger C., Duman R.S. Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(1):88–109. DOI: 10.1038/sj.npp.1301574.
 62. Harlan J., Chen Y., Gubbins E. et al. Variants in Apaf-1 segregating with major depression promote apoptosome function. *Mol Psychiatry* 2006;11(1):76–85. DOI: 10.1038/sj.mp.4001755.
 63. Saarelainen T., Hendolin P., Lucas G. et al. Activation of the TrkB neurotrophin receptor is induced by antidepressant drugs and is required for antidepressant-induced behavioral effects. *J Neurosci* 2003;23(1):349–57. DOI: 10.1523/NEUROSCI.23-01-00349.2003.
 64. Kim D.H., Li H., Yoo K.Y. et al. Effects of fluoxetine on ischemic cells and expressions in BDNF and some antioxidants in the gerbil hippocampal CA1 region induced by transient ischemia. *Exp Neurol* 2007;204(2):748–58. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.01.008.
 65. Lucassen P.J., Fuchs E., Czeh B. Antidepressant treatment with tianeptine reduces apoptosis in the hippocampal dentate gyrus and temporal cortex. *Biol Psychiatry* 2004;55(8):789–96. DOI: 10.1016/j.biopsych.2003.12.014.
 66. Nahon E., Israelson A., Abu-Hamad S., Varda S.B. Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death. *FEBS Lett* 2005;579(22):5105–10. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.08.020.
 67. Stavrovskaya I.G., Narayanan M.V., Zhang W. et al. Clinically approved heterocyclics act on a mitochondrial target and reduce stroke-induced pathology. *J Exp Med* 2004;200(2):211–22. DOI: 10.1084/jem.20032053.
 68. Kosten T.A., Galloway M.P., Duman R.S. et al. Repeated unpredictable stress and antidepressants differentially regulate expression of the bcl-2 family of apoptotic genes in rat cortical, hippocampal, and limbic brain structures. *Neuropsychopharmacology* 2008;33(7):1545–58. DOI: 10.1038/sj.npp.1301527.
 69. Murray F., Hutson P.H. Hippocampal Bcl-2 expression is selectively increased following chronic but not acute treatment with antidepressants, 5-HT(1A) or 5-HT(2C/2B) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 2007;569(1–2):41–7. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.05.006.
 70. Glantz L.A., Gilmore J.H., Overstreet D.H. et al. Pro-apoptotic Par-4 and dopamine D2 receptor in temporal cortex in schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Schizophr Res* 2010;118(1–3):292–9. DOI: 10.1016/j.schres.2009.12.027.
 71. Collingridge G.L., Peineau S., Howland J.G., Wang Y.T. Long-term depression in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2010;11(7):459–73. DOI: 10.1038/nrn2867.
 72. Freyberg Z., Ferrando S.J., Javitch J.A. Roles of the Akt/GSK-3 and Wnt signaling pathways in schizophrenia and antipsychotic drug action. *Am J Psychiatry* 2010;167(4):388–96. DOI: 10.1176/appi.ajp.2009.08121873.
 73. Tanti A., Belzung C. Open questions in current models of antidepressant action. *Br J Pharmacol* 2010;159(6):1187–200. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00585.x.

Благодарность

Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией регуляции репаративных процессов НИИ общей патологии и патофизиологии профессору Александру Александровичу Пальцыну за конструктивное обсуждение рукописи.

The authors are grateful to the head of the Laboratory of Regulation of Reparation Processes of the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology Professor Alexander A. Paltsyn for constructive discussion of the manuscript.

Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна обзора, обобщение материала обзора;

Е.В. Бочаров: получение материала обзора, написание текста рукописи;

В.Г. Кучеряну: обзор публикаций по теме;

Р.В. Карпова: анализ материала обзора.

Authors' contributions

O.A. Bocharova: review design, literature summary;

E.V. Bocharov: acquirement of review materials, manuscript preparation;

V.G. Kucheryanu: literature review;

R.V. Karpova: analysis of review materials.

ORCID авторов/ORCID of authors

О.А. Бочарова/O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

Е.В. Бочаров/E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

В.Г. Кучеряну/V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

Р.В. Карпова/R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>

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: 09.01.2019. **Принята в печать:** 05.08.2019.

Article received: 09.01.2019. **Accepted for publication:** 05.08.2019.

РАЗЛИЧНЫЕ РОЛИ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ОНКОТЕРАПИИ

Е.М. Трещалина, И.Н. Михайлова, М.В. Киселевский

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

Контакты: Елена Михайловна Трещалина treshalina@yandex.ru

В обзоре рассмотрены и проанализированы данные литературы о функциях семейства толл-подобных рецепторов (ТПР), значимых для опухолевого процесса, кратко отражены такие важные аспекты, как строение ТПР, механизмы внутриклеточной передачи сигнала, известные специфические лиганды и агонисты ТПР. Кроме того, описаны эффекты воздействия на различные ТПР с точки зрения влияния на рост самой опухоли и реакций клеточного иммунитета. Приведено сравнение неоднозначных результатов экспериментального изучения и клинического применения агонистов и антагонистов ТПР. Сделан вывод о необходимости получения информации об отсутствии стимуляции опухолевого роста *in vivo* агонистов ТПР на этапе доклинического изучения.

Ключевые слова: толл-подобные рецепторы, агонисты, антагонисты, опухолевый процесс

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-15-22

THE DIFFERENT ROLES OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN ONCOTHERAPY

E.M. Treshalina, I.N. Mikhaylova, M.V. Kiselevskiy

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

The review considers and analyzes the literature data on the functions of the toll-like receptor family (TLR) in the development of malignant process. The structure of TLR, mechanisms of intracellular signal transduction, specific ligands antagonists and agonists of TLR are briefly reflected. Effects of various TLR from the point of view of influence on tumor growth and reactions of cellular immunity are given. The ambiguous results of experimental and clinical application of agonists and antagonists of TLR are compared. It is concluded that it is necessary to obtain additional information with the agonists of TLR at the stages of preclinical study.

Key words: toll-like receptors, agonists, antagonists, malignant process

Введение

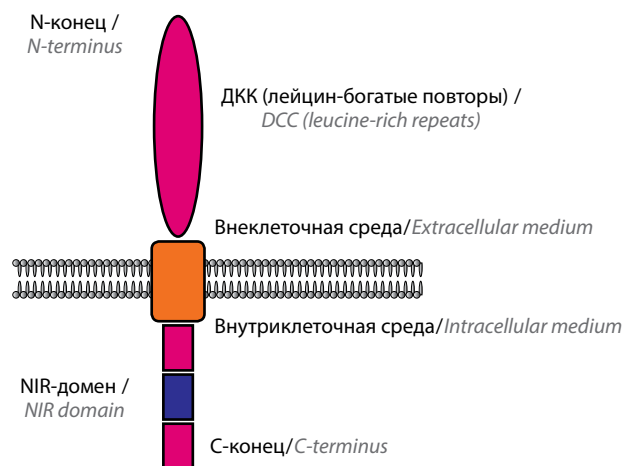
Биологические эффекты многочисленных лигандов толл-подобных рецепторов (ТПР), опосредованные врожденным и адаптивным иммунным ответом (активация дендритных клеток, провоспалительных цитокинов и цитотоксических лимфоцитов), широко изучаются [1]. В последние годы обсуждается разнонаправленное воздействие на различные подтипы ТПР, на стволовые и опухолевые клетки [2, 3].

Сведения о свойствах ТПР

Семейство ТПР человека представлено 10 видами. ТПР активируются различными лигандами — структурными компонентами бактерий, вирусов или грибов, а также продуктами разрушенных клеток. ТПР 1, 2, 4, 10 локализуются на клеточной мембране, а ТПР 3, 7, 8, 9 — в клеточных эндосомах. Набор ТПР варьирует в зависимости от типа клетки [4–6].

Структура ТПР изучена и описана в литературе довольно детально. Так, ТПР образованы 3 основными доменами: 1) богатым лейцином внеклеточным доменом; 2) трансмембранным доменом; 3) цитоплазматическим TIR-доменом, гомологичным подобному в рецепторе интерлейкина-1 (ИЛ-1), называемом толл/ИЛ-1-рецепторным (толл/интерлейкин-1-подобный рецептор, TIR) доменом. За узнавание ТПР-лиганда отвечает внеклеточный домен, который содержит 19–25 tandemных копий структурного мотива с так называемыми лейцин-богатыми повторами (LRR) (см. рисунок).

Внутриклеточный домен отвечает за образование гомо- и гетеродимеров между ТПР, т.е. с аналогичными белками или белками других ТПР. При образовании гетеродимеров их обозначают таким образом: ТПР1/2 (гетеродимер ТПР1 и ТПР2). Кроме того, внутриклеточный домен отвечает за взаимодействие



Строение ТЛР (адаптировано из [5])

The structure of a TLR (adapted from [5])

с белками-адаптерами, содержащими TIR-домены (толл/интерлейкин-1 подобный рецептор). Образование таких белковых комплексов приводит к активации ТЛР-сигнальных путей [5]. Внутриклеточная передача сигнала реализуется с участием нескольких адаптерных белков. Основным адаптером для ТЛР 1, 2, 4–10 является белок МyD88. В случае ТЛР3 адаптером служит TRIF (внутриклеточный адаптерный белок, содержащий TIR-домен, включающий интерферон β), связанный с синтезом интерферона (ИФН) 1-го типа. ТЛР-регулируемым сигнальным путем активации генов цитокинов и ИФН посвящено множество публикаций [7–17]. Механизмы, связывающие иммунные реакции и воспаление с развитием опухоли, изучены недостаточно. Известно, например, что протеогликан декорин (его растворимая форма), служащий эндогенным лигандом ТЛР2 и 4, стимулирует продукцию провоспалительных молекул, включая PDCD4 (белок программированной клеточной гибели 4) в макрофагах. Декорин также предотвращает трансляционную репрессию PDCD4 путем снижения активности трансформирующего фактора роста-β1 и обилия онкогенного miR-21, трансляционного ингибитора PDCD4. Растворимая форма внеклеточного матрикса декорина контролирует воспаление и рост опухоли через PDCD4 и miR-21 (микроРНК-21), а увеличение количества PDCD4 приводит к снижению высвобождения цитокина ИЛ-10, усиливая противовоспалительный профиль. Таким образом, декорин-сигналинг задерживает рост опухолевых ксенотрансплантатов [11].

Опухолевые эффекты ТЛР

На протяжении первого десятилетия XXI века были выявлены факты экспрессии ТЛР в клетках злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, репродуктивных органов, легкого, головы

и шеи, головного мозга, меланомы [18–24]. Ингибирование ТЛР с помощью siРНК или в сочетании с классическими цитостатиками и/или иммунокорректорами сопровождалось в ряде случаев ингибированием роста и/или снижением уровня клеточной злокачественности [24]. Активация ТЛР7, ТЛР8 специфическими агонистами приводила к промоции опухолевого роста, сопровождаемого повышенной экспрессией антиапоптотических белков [20]. В то же время воздействие ТЛР3 на полиинозин-полицитидиловую двуспиральную РНК запускало апоптоз в клетках рака молочной железы и меланомы [25]. Таким образом, можно заметить, что стимуляция ТЛР приводит к неоднозначной ответной реакции опухолевых клеток в зависимости от типа ТЛР.

Стимуляция иммунного ответа на опухолевые антигены вследствие снижения толерантности к аутоантигенам позволила отнести лиганды ТЛР к вакцинным адъювантам [26–29]. Стимулирующее действие ТЛР неизбирательно и может распространяться на опухолевый процесс. Исследования в этом направлении показали, что на фоне двойственного характера активационного действия можно получить промоцию опухолевого роста [30–35]. В клинических условиях выявлено прогрессирование опухолевого процесса при хроническом лимфолейкозе и различных солидных новообразованиях [36–39].

Эффекты, вызываемые ТЛР в клетках различных типов опухолей, суммированы в кратком обзоре 2013 г. (табл. 1). На основании приведенных данных авторы предлагают обосновывать выбор терапевтических агонистов ТЛР профилем вызываемых клеточных реакций и их функциональными последствиями для данного типа рака [37].

Таким образом, онкологическую направленность ТЛР определяют следующие эффекты: 1) арест клеточного цикла, подавление пролиферации, апоптоз, некроз; 2) подавление нейтрофильной инфильтрации, проницаемости и воспаления легкого, увеличение ICAM I, ИФН1-го типа и NO. Такая коллаборация обеспечивает контроль опухолевой прогрессии. На основании приведенных данных можно говорить о неоднозначности влияния активации ТЛР на опухоли. Показана стимулирующая роль ТЛР4 в опухолевой прогрессии за счет ускользания опухоли от иммунологического контроля, благодаря индукции иммуносупрессивных цитокинов и воспалительных реакций. Однако ТЛР3 и ТЛР5 на опухолевых клетках проявляют апоптотические эффекты и подавляют пролиферацию опухолей разных локализаций, поэтому можно говорить о возможностях использования их ингибиторных функций в онкотерапии.

В 2016 г. были проанализированы результаты клинического изучения взаимодействия ТЛР с различными лигандами с точки зрения влияния на опухолевый

Таблица 1. Эффекты, вызываемые ТПР в опухолевых клетках (адаптировано из [37])

Table 1. Effects caused by TLR in tumor cells (adapted from [37])

ТПР TLR	Локализация опухоли Tumor location	Направленность опухолевого эффекта Tumor effect	
		Стимуляция Stimulation	Ингибирование Inhibition
ТПР2 TLR2	Рак желудка Gastric cancer	Воспаление, васкуляризация, метастазирование, ↑ ИЛ-8, COX-2, PGE2 Inflammation, vascularization, metastasis, ↑ IL-8, COX-2, PGE2	—
ТПР3 TLR3	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	Иммуносупрессия, ↑ ИЛ-6, NO Immunosuppression, ↑ IL-6, NO	—
	Рак молочной железы Breast cancer		Апоптоз, ИФН 1-го типа Apoptosis, ↑ IFN type 1
	Рак кишечника Colon cancer		Апоптоз Apoptosis
	Рак шейки матки Cervical cancer		Апоптоз Apoptosis
	Рак головы и шеи Head and neck cancer		Апоптоз, некроз, ICAM 1 Apoptosis, necrosis, ↑ ICAM 1
	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma		Апоптоз Apoptosis
	Меланома Melanoma		Подавление пролиферации, апоптоз Proliferation suppression, apoptosis
ТПР4 TLR4	Миелома Myeloma	—	Апоптоз, ИФН 1-го типа Apoptosis, ↑ IFN type 1
	Рак легкого Lung cancer	Пролиферация и выживание Proliferation and survival	Апоптоз Apoptosis
	Рак предстательной железы Prostate cancer		Воспаление, апоптоз Inflammation, apoptosis
	Рак молочной железы Breast cancer	Жизнеспособность, иммунное ускользание, ↑ VEGF, NO, ИЛ-6, ИЛ-12, MMPs Viability, immune escape, ↑ VEGF, NO, IL-6, IL-12, MMPs	—
	Рак кишечника Colon cancer	Воспаление, рост новообразования, иммунное ускользание, ↑ B7–H2, B7–H2, Fas↓ Inflammation, tumor growth, immune escape, ↑ B7–H2, B7–H2, Fas↓	—
	Рак желудка Gastric cancer	Пролиферация Proliferation	—
	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	Канцерогенез Carcinogenesis	—
	Рак легкого Lung cancer	Иммуносупрессия, иммунное ускользание, подавление апоптоза, ↑ TGF-β, VEGF, ИЛ-8 Immunosuppression, immune escape, apoptosis suppression, ↑ TGF-β, VEGF, IL-8	Подавление проницаемости и воспаления легкого Suppression of lung permeability and pneumonia
	Меланома Melanoma	Канцерогенез Carcinogenesis	—

Окончание таблицы 1

The end of the table 1

ТПР TLR	Локализация опухоли Tumor location	Направленность опухолевого эффекта Tumor effect	
		Стимуляция Stimulation	Ингибирование Inhibition
ТПР5 TLR5	Рак молочной железы Breast cancer	—	Подавление пролиферации, нейтрофильной инфильтрации, некроз Suppression of proliferation and neutrophilic infiltration, necrosis
	Рак головы и шеи Head and neck cancer	—	Подавление пролиферации, апоптоз Proliferation suppression, apoptosis
	Рак кишечника Colon cancer	—	
	Рак желудка Gastric cancer	Пролиферация, ↑ИЛ-8, ТНФ-α, ИЛ-8 Proliferation, ↑IL-8, TNF-α, IL-8	—
ТПР7/8 TLR7/8	Рак легкого Lung cancer	Пролиферация, выживаемость, лекарственная резистентность, ↑метастазирование, ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12, ГМ-КСФ, VEGFR2, Bcl-2 Proliferation, survival, drug resistance, ↑metastasis, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, GM-CSF, VEGFR2, Bcl-2	—
ТПР9 TLR9	Рак молочной железы Breast cancer	Метастазирование, ↑ММР Metastasis, ↑MMP	—
	Рак желудка Stomach cancer	Метастазирование, ↑COX-2 Metastasis, ↑COX-2	—
	Глиобластома Glioblastoma	Метастазирование Metastasis	Арест клеточного цикла, NO Cell cycle arrest, NO
	Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	Пролиферация, выживаемость, лекарственная резистентность Proliferation, survival, drug resistance	
	Рак легкого Lung cancer	Пролиферация, выживаемость, ↑ИЛ-1, -6, -8 Proliferation, survival, ↑IL-1, IL-6, IL-8	—
	Нейробластома Neuroblastoma	—	Подавление пролиферации, апоптоз Proliferation suppression, apoptosis
	Рак яичников Ovarian cancer	Метастазирование Metastasis	—
	Рак предстательной железы Prostate cancer	Пролиферация, подавление апоптоза Proliferation, apoptosis suppression	—

Примечание. ИЛ — интерлейкин; COX-2 — селективные ингибиторы циклооксигеназы; PGE2 — простагландин E2; ИФН — интерферон; ICAM 1 — антитела к CD54; MMPs — матриксные металлопротеиназы; VEGF — фактор роста эндотелия сосудов; NO — окись азота; TGF-β — трансформирующий фактор роста β; ГМ-КСФ — гранулоцитарно макрофагальный колониестимулирующий фактор.

Note. IL — interleukin; COX-2 — selective cyclooxygenase inhibitors; PGE2 — prostaglandin E2; IFN — interferon; ICAM 1 — antibodies to CD54; VEGF — vascular endothelial growth factor; NO — nitrogen oxide; TGF-β — transforming growth factor-β; GM-CSF — Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

процесс (табл. 2) [40]. Показано, что стимуляция прогрессии новообразований регистрируется нечасто и при конкретных локализациях опухолей. Однако настораживает тот факт, что одни и те же эндогенные

лиганды оказывают на разные опухоли противоположные эффекты.

Лиганд ТПР4 — липополисахарид в случае гепатоцеллюлярной карциномы и рака шейки матки является

Таблица 2. Различная роль лигандов ТПР в опухолевой терапии (адаптировано из [40])

Table 2. Different role of TLR ligands in tumor therapy (adapted from [40])

ТПР TLR	Лиганд ТПР TLR ligand	Локализация опухоли Tumor location	Роль Role
ТПР2 TLR2	Нейтрофилактивирующий белок <i>H. pylori</i> (HP-NAP) Neutrophil-activating protein <i>H. pylori</i> (HP-NAP)	Рак яичка Ovarian cancer	Ингибитор Inhibitor
ТПР3 TLR3	Полиинозин-полицитидиловая двуспиральная РНК (Poly (I : C) – dsRNA) Polyinosinic-polycytidylic double-stranded RNA (Poly (I : C) – dsRNA)	Рак легкого Lung cancer	Ингибитор Inhibitor
		Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	
	Полиаденил-полиуридиловая двуспиральная РНК (Poly (A : U) – dsRNA) Polyadenylic-polycytidylic double-stranded RNA (Poly (A : U) – dsRNA)	Рак желудка Gastric cancer	Ингибитор Inhibitor
		Рак молочной железы Breast cancer	Ингибитор Inhibitor
ТПР 2/4 TLR 2/4	Сол-токсин Coly-toxin	Меланома Melanoma	Ингибитор Inhibitor
ТПР4 TLR4	Липополисахарид Lipopolysaccharide	В-клеточный гемобластоз B-cell hemoblastosis	Ингибитор Inhibitor
		Гепатоцеллюлярная карцинома Hepatocellular carcinoma	Стимулятор Stimulant
		Рак шейки матки Cervical cancer	
ТПР5 TLR5	Флагеллин (<i>H. pylori</i>) Flagellin (<i>H. pylori</i>)	Гепатобластома Gepatoblastoma	Ингибитор Inhibitor
		Рак молочной железы Breast cancer	Ингибитор Inhibitor
	СВЛБ502 из флагеллина Flagellin CBLB502	Рак желудка Stomach cancer	Стимулятор Stimulant
ТПР7/8 TLR7/8	Имиквимод Imiquimod	Рак легкого Lung cancer	Ингибитор Inhibitor
	852A	Рак кожи Skin cancer	Ингибитор Inhibitor
	МикроРНК MicroRNA	Гемобласты Hematological malignances	Ингибитор Inhibitor
ТПР9 TLR9	СрГ лигодезоксинуклеотид (ODN) CpG ligodeoxynucleotide (ODN)	Рак легкого Lung cancer	Стимулятор Stimulant
	Онколитический вирус СрГ Oncolytic CpG virus	Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	Ингибитор Inhibitor
		Рак легкого Lung cancer	Ингибитор Inhibitor

стимулятором опухолевого процесса, тогда как при гепатобластоме, напротив, тормозит рост опухоли.

Флагеллин (*H. pylori*) – лиганд ТПР5 при раке желудка способствует опухолевой промоции, а при раке легкого и молочной железы выступает как опухолевый ингибитор.

МикроРНК – агонист ТПР7/8 играет стимулирующую роль при раке легкого, но другие агонисты

этих рецепторов в клетках острого миелоидного лейкоза – имиквимод и 852A – являются ингибиторами.

Активация ТПР1/ТПР2 также приводила к индукции апоптоза через р38 МАРК-зависимый путь [15].

Было высказано предположение, что причиной такой двойственности эффектов бактериальных ТПР (липополисахарид – лиганд ТПР4, флагеллин – лиганд ТПР5 и липопротеины – лиганды ТПР2) может

служить их загрязнение белками теплового шока с образованием патогенассоциированных комплексов [41, 42]. Раскрытие механизмов двойственного характера действия ТПР на клетках опухолей разной локализации имеет ключевое значение для эффективного использования агонистов ТПР в терапии онкологических заболеваний.

Заключение

Сегодня можно подвести промежуточные итоги результатов модуляции активности ТПР в опухолях различной локализации и клеточного состава. Для окончательной оценки значимости ТПР в противоопухолевой терапии требуется получение дополнительной более однозначной информации на доклиническом этапе и в клинике. Краткий анализ данных литературы (публикации до 2018 г., суммированы в табл. 1 и 2), демонстрирует возможную связь ТПР3 и ТПР5 с противоопухолевыми эффектами. Напротив, активация ТПР4 чаще приводит к стимуляции опухолевого процесса. Накопленная информация об эффектах ТПР2 и ТПР9 в клетках и опухолях имеет неоднозначный характер. Механизмы ТПР-сигнальных реакций в опухолевых клетках включают синтез цитокинов, факторов пролиферации, апоптоза и клеточной дифференцировки, которые регулируются универсальным фактором транскрипции NF-κB [38, 42, 43]. В ТПР-индуцируемых процессах активно участвуют макрофаги и дендритные клетки, реакции которых подвержены иммуносупрессии со стороны опухолевых факторов. Профили экспрессии ТПР в опухолевых клетках различаются в зависимости от их происхождения и локализации. Поэтому для изучения эффектов агонистов ТПР важен выбор адекватной клеточной модели, которая позволит с большей вероятностью переносить результаты экспериментального изучения агонистов ТПР в клинику. Разнонаправленные эффекты одного вида ТПР заставляют внимательно относиться к оценке его терапевтической значимости.

Обязательно надо учитывать прогноз соотношения риска и пользы и выбирать чувствительную опухолевую модель при доклиническом изучении [44, 45]. Появившиеся за последние 2 года публикации [46–48] свидетельствуют об активном поиске таких моделей с углубленным анализом Т-клеточных реакций. В разных исследованиях подтверждается неоднозначная роль активации ТПР4 на иммунокомпетентных и опухолевых клетках [11, 12, 45, 49]. Модуляция ТПР4 растительным пептидогликаном иммуномаксом подавляет прогрессирование метастатического рака молочной железы. Дальнейшего изучения требует описанное подавление метастатической активности активированных липополисахаридом опухолевых клеток антагонистом ТПР2/4, действующим через p38 и ERK1/2 сигнальный путь [50–52]. Следует иметь в виду, что между разными видами ТПР возможны перекрестные взаимодействия, что может приводить к неожиданным эффектам.

Существует ряд нерешенных проблем с путями введения агонистов и антагонистов ТПР в организм. Так, агонист ТПР4, введенный интратуморально, индуцирует антиопухолевые иммунные ответы и вызывает опухолевую регрессию, но такой способ введения не всегда приемлем. Стимуляция гематогенного метастазирования при увеличении внутриопухолевого давления продемонстрирована на меланоме B16/F10 с гиперэкспрессией Т-катгерина и характерной васкулогенной мимикрией [49].

Мы поддерживаем сложившееся мнение [52, 53] о значимой роли ТПР в иммунологическом контроле онкологического заболевания и процессов клеточной регуляции (пролиферации, апоптоза, аутофагии и системы интерферона). Все это свидетельствует об обоснованном интересе к изучению терапевтических возможностей ТПР в онкологии. При этом двойственный и неоднозначный характер функций ТПР на опухолях различного происхождения диктует необходимость продолжения всестороннего экспериментального доклинического изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Чикилева И.О., Караулов А.В., Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В. Двойственная роль толл-подобных рецепторов в регуляции противоопухолевого ответа. Иммунология 2010;(1):52–5. [Chikileva I.O., Karaulov A.V., Anisimova N.Yu., Kiselevskiy M.V. The dual role of toll-like receptors in the regulation of the antitumor response. Immunology = Immunologiya 2010;(1):52–5. (In Russ.)].
2. Alvarado A.G., Thiagarajan P.S., Mulkearns-Hubert E.E. et al. Glioblastoma cancer stem cells evade innate immune suppression of self-renewal through reduced TLR4 expression. Cell Stem Cell 2017;20(4):450–61. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.001>.
3. Chen D., Wu M., Li Y. et al. Targeting BMI1 + cancer stem cells overcomes chemoresistance and inhibits metastases in squamous cell carcinoma. Cell Stem Cell 2017;20(5):621–34. DOI: [10.1016/j.stem.2017.02.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.02.003).
4. Jin M.S., Lee J.-O. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. Immunity 2008;29:182–91. DOI: [10.1016/j.immuni.2008.07.007](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.07.007).
5. Chistyakov D.V., Aleshin S., Sergeeva M.G. and Reiser G. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor β/δ expression and activity levels by toll-like receptor agonists and MAP kinase inhibitors in rat astrocytes. J Neurochem 2017;20(5):621–34.

- 2014;130(4):563–74.
DOI: 10.1111/jnc.12757.
6. Randhawa A.K., Hawn T.R. Toll-like receptors: their roles in bacterial recognition and respiratory infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6(4):479–95.
DOI: 10.1586/14787210.6.4.479.
7. Merline R., Moreth K., Beckmann J. et al. Signaling by the matrix proteoglycan decorin controls inflammation and cancer through PDCD4 and microRNA-21. *Sci Signal* 2011;4(199):75.
DOI: 10.1126/scisignal.2001868.
8. Gharbaran R. Advances in the molecular functions of syndecan-1 (SDC1/CD138) in the pathogenesis of malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015;94(1):1–17.
DOI: 10.1016/j.critrevonc.2014.12.003.
9. Shi X., Liang W., Yang W. et al. Decorin is responsible for progression of non-small-cell lung cancer by promoting cell proliferation and metastasis. *Tumour Biol* 2015;36(5):3345–54.
DOI: 10.1007/s13277-014-2968-8.
10. Суховских А.В., Григорьева Э.В. Тканеспецифичность экспрессии протеогликанов в различных типах опухолей человека. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(1):53–60.
DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-1-53-60. [Suhovskih A.V., Grigor'eva E.V. Tissue-specificity of proteoglycans expression in different cancers.. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in molecular oncology* 2016;(3):53–60. (In Russ.)].
11. Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С. и др. Действие интерферонов и индукторов интерферонов на экспрессию генов рецепторов TLR/RLR и дифференцировку опухолевых линий клеток THP-1 и HCT-116. *Российский биотерапевтический журнал* 2016(15):3:28–33.
DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-28-33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S. et al. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116. *Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(3):28–33 (In Russ.)].
12. He W., Liu Q., Wang L. et al. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol* 2007;(44):2850–9.
DOI: 10.1016/j.molimm.2007.01.022.
13. Bertin S., Pierrefite-Carle V. Autophagy and toll-like receptors: a new link in cancer cells. *Autophagy* 2008;4:1086–9.
DOI: 10.4161/auto.7138.
14. Nystrom S., Antoine D.J., Lundback P. et al. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *Embo J* 2013;32:86–99.
DOI: 10.1038/emboj.2012.344.
15. Narayanan K.B., Park H.H. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways. *Apoptosis* 2015;20(2):196–209.
DOI: 10.1007/s10495-014-1073-1.
16. Eriksson M., Peña-Martínez P., Ramakrishnan R. et al. Agonistic targeting of TLR1/TLR2 induces p38 MAPK-dependent apoptosis and NFκB-dependent differentiation of AML cells. *Blood Adv* 2017;1(23):2046–57.
DOI: 10.1182/bloodadvances.2017006148.
17. Sipos F., Kiss A.L., Constantinovits M. et al. Modified genomic self-DNA influences in vitro survival of HT29 tumor cells via TLR9- and autophagy signaling. *Pathol Oncol Res* 2018.
DOI: 10.1007/s12253-018-0544-z.
18. Szczepanski M.J., Czystowska M., Szajnik M. et al. Triggering of Toll-like receptor 4 expressed on human head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor development and protects the tumor from immune attack. *Cancer Res* 2009;69(7):3105–13.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3838.
19. Yang H., Zhou H., Feng P. et al. Reduced expression of Toll-like receptor 4 inhibits human breast cancer cells proliferation and inflammatory cytokines secretion. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29(1):92.
DOI: 10.1186/1756-9966-29-92.
20. Cherfils-Vicini J., Platonova S., Gillard M. et al. Triggering of TLR7 and TLR8 expressed by human lung cancer cells induces cell survival and chemoresistance. *J Clin Invest* 2010;120(4):1285–97.
DOI: 10.1172/JCI36551.
21. Sheyhidin I., Nabi G., Hasim A. et al. Overexpression of TLR-3, TLR-4, TLR-7 and TLR-9 in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011;17(32):3745–51.
DOI: 10.1007/s00262-011-1057-8.
22. Saint-Jean M., Knol A.C., Nguyen J.M. et al. TLR expression in human melanoma cells. *Eur J Dermatol* 2011;21(6):899–905.
DOI: 10.1684/ejd.2011.1526.
23. Petricevic B., Vrbancic D., Jakic-Razumovic J. et al. Expression of Toll-like receptor 4 and beta 1 integrin in breast cancer. *Med Oncol* 2012;29(2):486–94.
DOI: 10.1007/s12032-011-9885-0.
24. Ye K., Wu Yi., Sun Ya. et al. TLR4 siRNA inhibits proliferation and invasion in colorectal cancer cells by downregulating ACAT1 expression. *Life Sciences* 2016;155:133–9.
DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.0120024-3205.
25. Bianchi F., Pretto S., Tagliabue E. et al. Exploiting poly (I : C) to induce cancer cell apoptosis. *Cancer Biol Ther* 2017;18(10):47–756.
DOI: 10.1080/15384047.2017.1373220.
26. Haining W.N., Davies J., Kanzler H. et al. CpG oligodeoxynucleotides alter lymphocyte and dendritic cell trafficking in humans. *Clin Cancer Res* 2008;14(17):5626–34.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0526.
27. Katsuda M., Iwahashi M., Matsuda K. et al. Peptide vaccine therapy with TLR-9 agonist for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Gan to Kagaku Ryoho* 2011;38(12):1942–4.
28. Rapoport A.P., Aquino N.A., Stadtmayer E.A. et al. Combination immunotherapy after ASCT for multiple myeloma using MAGE-A3/Poly-ICLC immunizations followed by adoptive transfer of vaccine-primed and costimulated autologous T cells. *Clin Cancer Res* 2014;20(5):1355–65.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2817.
29. Волков М.Ю. Роль Toll-подобных рецепторов и их эндогенных лигандов в патогенезе ревматоидного артрита. *Научно-практическая ревматология* 2016;54(1):78–85. DOI: 10.14412/1995-4484-2016-78-85. [Volkov M.Yu. Role of Toll-like receptors and their endogenous ligands in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya* = *Rheumatology Science and Practice* 2016;54(1):78–85 (In Russ.)].
30. Weigel B.J., Cooley S., DeFor T. et al. Prolonged subcutaneous administration of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced hematologic malignancies. *Am J Hematol* 2012;87(10):953–6.
DOI: 10.1002/ajh.23280.
31. Kazma R., Mefford J.A., Cheng I. et al. Association of the innate immunity and inflammation pathway with advanced prostate cancer risk. *PLoS One* 2012;7(12):51680.
DOI: 10.1371/journal.pone.0051680.
32. Li C., Li H., Jiang K. et al. TLR4 signaling pathway in mouse Lewis lung cancer cells promotes the expression of TGF-β1 and IL-10 and tumor cells migration. *Biomed Mater Eng* 2014;24(1):869–75.
DOI: 10.3233/BME-130879.
33. Zhang X., Xu J., Ke X. et al. Expression and function of Toll-like receptors in peripheral blood mononuclear cells from patients with ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2015;64(3):275–86. DOI: 10.1007/s00262-014-1632-x.
34. Palani C.D., Ramanathapuram L., Lam-Ubol A., Kurago Z.B. Toll-like receptor 2

- induces adenosine receptor A2a and promotes human squamous carcinoma cell growth via extracellular signal regulated kinases 1/2. *Oncotarget* 2017;9(6):6814–6829. DOI: 10.18632/oncotarget.23784.
35. Liang P., Guo J., Li S. et al. Prevention of prostate tumor development by stimulation of antitumor immunity using a standardized herbal extract (Deep Immune®) in TRAMP mice. *Evid Based Complement Alternat Med* 2018;9707543. DOI: 10.1155/2018/9707543.
 36. Geller M.A., Cooley S., Argenta P.A. et al. Toll-like receptor-7 agonist administered subcutaneously in a prolonged dosing schedule in heavily pretreated recurrent breast, ovarian, and cervix cancers. *Cancer Immunol. Immunother* 2010;59(12):1877–84. DOI: 10.1007/s00262-010-0914-1.
 37. Falke J., Lammers R.J., Arentsen H.C. et al. Results of a phase I dose escalation study of intravesical TMX-101 in patients with nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2013;189(6):2077–82. DOI: 10.1016/j.juro.2012.11.150.
 38. Isambert N., Fumoleau P., Paul C. et al. Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* 2013;13:172. DOI: 10.1186/1471-2407-13-172.
 39. Kaczanowska S., Joseph A.M., Davila E. TLR agonists: our best frenemy in cancer. *Immunotherapy J Leukoc Biol* 2013;93:847–63. DOI: 10.1189/jlb.1012501.
 40. Shi M., Chen X., Ye K. et al. Application potential of toll-like receptors in cancer immunotherapy: Systematic review. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(25):3951. DOI: 10.1097/MD.0000000000003951.
 41. Tsan M.F., Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol* 2009;85(6):905–10. DOI: 10.1189/jlb.0109005.
 42. Лазанович В.А., Маркелова Е.В., Смирнов Г.А., Смолина Т.П. Клиническая значимость экспрессии Toll2, Toll4, CD14, HLA-DR на моноцитах у пациентов с сепсисом. *Медицинская иммунология* 2015;17(3):221–228. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-3-221-228. [Lazanovich V.A., Markelova E.V., Smirnov G.A., Smolina T.P. Clinical significance of Toll2, Toll4, CD14, and HLA-DR expression on the monocytes in patients with sepsis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2015;17(3):221–8 (In Russ.)].
 43. Барышников М.А., Косоруков В.С. Адьюванты в вакцинотерапии опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(4):36–44. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-36-44. [Baryshnikova M.A., Kosorukov V.S. Cancer vaccine adjuvants *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(4):36–44. (In Russ.)].
 44. Бережная Н.М. Toll-лике рецепторы и онкогенез. *Онкология* 2013;15(2):76–86. [Berezhnaya N.M. Toll-like receptors and oncogenesis. *Onkologiya = Oncology* 2013;15(2):76–86 (In Russ.)].
 45. Stone G.W., Barzee S., Snarsky V. et al. Nanoparticle-delivered multimeric soluble CD40L DNA combined with Toll-Like Receptor agonists as a treatment for melanoma. *PLoS One* 2009;4(10):7334. DOI: 10.1371/journal.pone.0007334.
 46. Ghochikyan A., Pichugin A., Bagaev A. et al. Targeting TLR-4 with a novel pharmaceutical grade plant derived agonist, Immunomax®, as a therapeutic strategy for metastatic breast cancer. *J Transl Med* 2014;12:322. DOI: 10.1186/s12967-014-0322-y.
 47. Klein J.C., Moses K., Zelinskyy G. et al. Combined toll-like receptor 3/7/9 deficiency on host cells results in T-cell-dependent control of tumour growth. *Nat Commun* 2017;8:14600. DOI: 10.1038/ncomms14600.
 48. Zahm C.D., Colluru V.T., McIlwain S.J. et al. TLR Stimulation During T-cell Activation Lowers PD-1 Expression on CD8+ T Cells. *Cancer Immunol Res* 2018;6(11):1364–74. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-18-0243.
 49. Bhatia S., Miller N.J., Lu H. et al. Intratumoral G100, a TLR4 agonist, induces antitumor immune responses and tumor regression in patients with Merkel cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2018. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0469.
 50. Rubina K.A., Surkova E.I., Semina E.V. et al. T-Cadherin Expression in Melanoma Cells Stimulates Stromal Cell Recruitment and Invasion by Regulating the Expression of Chemokines, Integrins and Adhesion Molecules. *Cancers (Basel)* 2015;7(3):1349–70. DOI: 10.3390/cancers70308400.
 51. Florea I.D., Karaoulani Ch. Epigenetic Changes of the Immune System with Role in Tumor Development. Ch.11. In: *Cancer Epigenetics for Precision Medicine: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Eds.: R.G. Dumitrescu, M. Verma, Springer Science + Business Media, LLC. 2018;1856:203–17. DOI: 10.1007/978-1-4939-8751-1_11.
 52. Tang Y.M., Cao Q.Y., Guo X.Y. et al. Inhibition of p38 and ERK1/2 pathways by Sparstolonin B suppresses inflammation-induced melanoma metastasis. *Biomed Pharmacother* 2018;98:382–9. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.047.
 53. Tartey S., Takeuchi O. Pathogen recognition and Toll-like receptor targeted therapeutics in innate immune cells. *Int Rev Immunol* 2017;36(2):57–73. DOI: 10.1080/08830185.2016.1261318.

Вклад авторов

Е.М. Трещалина: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
И.Н. Михайлова: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных;
М.В. Киселевский: анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

E.M. Treshalina: reviewing of publications of the article's theme, article writing;
I.N. Mikhaylova: developing the research design. obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
M.V. Kiselevskiy: analysis of the obtained data, reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.М. Трещалина/E.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>
И.Н. Михайлова/I.N. Mikhaylova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>
М.В. Киселевский/M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 19.02.2019. Принята в печать: 05.08.2019.

Article received: 19.02.2019. Accepted for publication: 05.08.2019.

ВЫЯВЛЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ МУТАНТНЫХ НЕОАНТИГЕНОВ В ГЕНОМЕ МЕЛАНОМЫ МЫШЕЙ

В.С. Косоруков¹, М.А. Барышникова¹, Е.Н. Кособокова¹, Д.Ю. Яковичина², А.С. Ершова², Ю.А. Пеков²

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

²ООО «Ксивелью»; Россия, 119049 Москва, Ленинский проспект, 30А

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ta_ba@mail.ru

Введение. Одним из перспективных подходов к иммунотерапии рака является создание персонализированных противоопухолевых вакцин, направленных на усиление распознавания иммунной системой мутантных опухолевых неоантигенов.

Цель исследования — разработка биоинформатического подхода для анализа данных NGS-секвенирования образцов меланомы и нормальной ткани и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10.

Материалы и методы. Секвенировали экзом и транскриптом опухолевой ткани меланомы B16F10 и нормальной ткани мышей линии C57Bl/6. Процедура секвенирования библиотек была произведена на платформе Illumina HiSeq 2500, анализ качества всех полученных библиотек был выполнен с помощью программ FastQC и MultiQC. Полученные файлы были использованы для дальнейшего биоинформатического анализа. Для поиска мутаций в образцах опухоли использовали программы GATK MuTect2 и Strelka.

Результаты. В образцах материала, полученного от нескольких мышей, проведен поиск соматических мутаций, присутствующих только в опухолях и отсутствующих в нормальной ткани, показано, что мутации в разных образцах опухоли значительно перекрываются, но не идентичны. Предсказание коротких пептидов, аффинных к главному комплексу гистосовместимости (МНС) мыши H-2, было проведено с использованием модели netMHCpan (версия 3.0), использующей глубокие искусственные нейронные сети. Для предсказания коротких пептидов, способных вызвать иммунный ответ, использовались мутации типа миссенс и фреймшифт. Для подтверждения, что мутированные аллели экспрессируются в опухоли, использовали транскриптомные данные. С помощью пайплайна Vaxrank были предсказаны иммуногенные пептиды длиной 25–27 аа, представлены параметры их синтезируемости и растворимости.

Выводы. Разработан биоинформатический подход для предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10.

Ключевые слова: биоинформатический анализ, неоантиген, противоопухолевая вакцина, меланома

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30

IDENTIFICATION OF IMMUNOGENIC MUTANT NEOANTIGENS IN THE GENOME OF MURINE MELANOMA

V.S. Kosorukov¹, M.A. Baryshnikova¹, E.N. Kosobokova¹, D. Yu. Yakovishina², A.S. Ershova², Yu.A. Pekov²

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

²Ksivalue LLC; 30A Leninskiy Prospekt, Moscow 119049, Russia

Introduction. One of the promising approaches to cancer immunotherapy is the generation of personal antitumor vaccines that provides immune system recognition of mutant tumor neoantigens.

The aim of this study was to develop bioinformatic approaches for melanoma NGS-sequencing data analysis. On the basis of data obtained, to predict the peptides capable of inducing an immune response against B16F10 mouse melanoma.

Materials and methods. Exom and transcriptom of B16/F10 melanoma tumor tissue and normal tissue of C57BL/6 mice were sequenced. Library sequencing procedure was performed on Illumina HiSeq 2500 platform, quality analysis of all obtained libraries was performed using FastQC and MultiQC. The obtained files were used for further bioinformatics analysis. The GATK MuTect2 and Strelka were used for searching the mutations in tumor samples.

Results. Identification of somatic mutations specific for tumor was based on the analysis of few mice tumors. Here we show that mutations in different tumor samples significantly overlap, but are not identical. Prediction of short peptides affinity to the mouse main histocompatibility complex (MHC) H2 was performed using netMHCpan version 3.0. Mutations such as missense and frameshift were used to predict short peptides that could trigger an immune response. Transcriptome data confirm that mutated alleles are expressed in tumors. Vaxrank pipeline predicted immunogenic peptides with a length of 25–27. We also present the synthesis and solubility of these peptides.

Conclusion. A bioinformatic approach has been developed to predict peptides capable of increasing immune response of mouse melanoma B16/F10.

Key words: bioinformatic analysis, neoantigen, antitumor vaccine, melanoma

Введение

Одним из быстро развивающихся подходов к лечению меланомы является иммунотерапия, к которой относится противоопухолевая вакциноterapia. Исследования последних лет показали, что опухолевые клетки имеют опухоль-специфические неоантигены, образующиеся как результат соматических мутаций, которые могут служить мишенью для клеток иммунной системы [1]. Такие неоантигены обладают высокой иммуногенностью, поскольку они экспрессируются только в опухолевых клетках и не экспрессируются в нормальных [2]. Благодаря развитию методов секвенирования нового поколения и биоинформатического анализа появилась возможность создания персонализированных противоопухолевых вакцин, направленных на усиление распознавания клетками иммунной системы мутантных опухолевых неоантигенов [3, 4].

Такие противоопухолевые вакцины представляют собой химически синтезированные неоантигенные пептиды, отобранные в результате биоинформатического прогнозирования высокоаффинного связывания мутантных неоантигенов с аутологичными молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС), вызывающие активацию иммунного ответа [5].

Цель исследования — разработка биоинформатического подхода для анализа данных секвенирования нового поколения (NGS) образцов меланомы и нормальной ткани и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10.

Обзор методов прогнозирования возможности связывания пептидов с МНС показал, что большая часть существующих подходов решает задачу предсказания аффинности пептидов только к HLA-комплексам людей. В целом можно выделить 3 группы методов. К 1-й группе относятся SYFPEITHI и ProPred [6], основанные на статистическом анализе профилей выровненных последовательностей. Ко 2-й группе — методы, использующие скоринговые матрицы, в частности PSSM и RANKPEP [7]. RANKPEP реализует такой подход для человеческих и мышинных МНС, достигая точности порядка 80 %. К 3-й группе относятся методы машинного обучения. Наиболее совершенным и популярным из них является netMHCpan, использующий глубокие искусственные нейронные сети и обладающий высокой специфичностью и чувствительностью [8]. По этой причине именно этот метод был выбран в нашей работе для поиска пептидов, обладающих высокой аффинностью к МНС.

В основе метода лежит нейронная сеть с двумя полносвязными слоями, обученная на данных об аффинности более чем 180 тыс. пептидов к 172 молекулам МНС различных организмов (в частности, человека, нескольких приматов, свиней, крупного

рогатого скота и мышей). Таким образом, netMHCpan позиционируется как инструмент широкого спектра применения [9, 10]. Тем не менее многократное преобладание человеческих данных над мышинными в обучающей выборке может негативно отразиться на производительности метода при предсказании связывания пептидов с H2-комплексом. Это обстоятельство усугубляется тем, что МНС разных видов связываются с пептидами разной длины. Поскольку из всех версий netMHCpan только версия 3.0 напрямую моделирует длину пептида и сопровождается детальным анализом качества предсказания аффинности пептидов разной длины к H2-комплексам мышей, мы решили использовать именно эту версию, несмотря на то что последней на сегодняшний день является версия 4.0.

Материалы и методы

В работе использовали мышей самок линии C57Bl/6 с подкожно перевитой меланомой B16F10, полученной из банка клеточных культур НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Для выделения ДНК и РНК у мышей удаляли опухоли, а в качестве образцов нормальной ткани использовали селезенки.

Выделение ДНК проводили с помощью набора DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) по модифицированному протоколу производителя, контроль качества полученной ДНК осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле. Выделение РНК проводили с помощью реагента ExtractRNA (Евроген), контроль качества полученной РНК был выполнен с помощью капиллярного электрофореза на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Все полученные образцы ДНК и РНК были признаны пригодными для дальнейшей пробоподготовки. Подготовку библиотек и обогащение проводили с использованием набора SureSelect XT Mouse All Exon Kit (Agilent) согласно протоколу производителя. Контроль качества полученных библиотек фрагментов ДНК осуществляли на приборе LabChip GX Touch 24 по протоколу производителя. Процедуру секвенирования 10 библиотек проводили на платформе Illumina HiSeq 2500 с глубиной покрытия экзона не менее $\times 100$.

Из тотальной РНК синтезировали кДНК с использованием набора Mint-2 (Евроген) согласно протоколу производителя. Из полученной кДНК были приготовлены библиотеки с набором Qiaseq FX DNA Library kit (Qiagen) согласно протоколу производителя и проведен контроль качества полученных библиотек фрагментов кДНК на приборе Bioanalyzer 2100 (Agilent). Процедура секвенирования библиотек была проведена на платформе Illumina HiSeq 2500, 100PE с получением не менее 30 млн ридов на каждый

образец. Полученные FASTQ-файлы были использованы для дальнейшего биоинформатического анализа. Анализ качества всех полученных библиотек был выполнен с помощью программ FastQC и MultiQC.

Для поиска мутаций в образцах опухоли использовали две различные программы — GATK MuTect2 и Strelka. Для дальнейшей работы были использованы только мутации, предсказанные обеими программами.

Предсказание коротких пептидов, аффинных к МНС H-2 мыши, было проведено с применением модели netMHCpan, использующей глубокие искусственные нейронные сети. Алгоритм netMHCpan обладает высокой специфичностью и чувствительностью (площадь под ROC кривой = 0,96), что подтверждается валидацией на экспериментальных данных [9].

На вход netMHCpan требует последовательности пептидов и аллель МНС. Интерфейс позволяет регулировать версию netMHCpan, длину последовательности, задавать множественные последовательности МНС, длину пептида и способ предсказания. Для наших целей использовались длины пептида 25 и 27. Важно отметить, что особенностью МНС-генов лабораторных чистых линий мышей является то, что набор аллелей и гаплотип для них предопределены, и поэтому (в отличие от человеческих HLA-генов) не требуют предварительного гаплотипирования. Гены *H2-K* и *H2-D* чистой линии C57BL/6 имеют гаплотип b — *H2-Kb* и *H2-Db*.

В работе был использован программный комплекс Vaxrank [11], который инкапсулирует предобработку данных и вызовы netMHCpan.

В пайплайне Vaxrank длина желаемого пептида передается как внешний параметр. Тем не менее в выводе присутствуют пептиды длины меньше заданной, что указывает на то, что предсказать пептид желаемой длины удастся не всегда. Основываясь на рекомендациях, предложенных в работах J. C. Castle, S. Kreiter и соавт. и A. Rubinsteyn, J. Kodysh и соавт., было решено использовать длины 25–27 aa [3, 12]. Дополнительно пайплайном производили расчет синтезируемости всех предложенных пептидов по нескольким параметрам и для каждого пептида приводили финальный рейтинг, по которому выполняется ранжирование пептидов.

Параметры синтезируемости, обрабатываемые в пайплайне Vaxrank:

- мера гидрофобности 7-мера на конце;
- максимальная мера гидрофобности по всем 7-мерам;
- число пролинов в С-конце;
- число цистеинов в С-конце;
- число аспарагинов в N-конце;
- число глутаминов, глутаминовых кислот и цистеинов в N-конце;

- число аспарагинпролиновых связей;
- общее число цистеинов в пептиде.

GRAVY-Score — мера гидрофобности боковых цепей пептида, образованная как сумма индексов гидрофобности каждого из остатков. Самые гидрофобные имеют самые большие значения (изолейцин (4,5) и валин (4,2)), а самые гидрофильные — самые отрицательные (аргинин (–4,5) и лизин (–3,9)) [13].

Дополнительно с помощью сервера, описанного в работе M. Hebditch и соавт. и доступного по ссылке: <https://www.protein-sol.manchester.ac.uk/>, была проведена оценка растворимости пептидов [14].

Соответствующие мутации были подтверждены методом прямого секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение

Для исследования экзосом и транскриптома нормальной ткани и опухоли у 6 мышей C57BL/6 удалили селезенки и заранее подкожно перевитые опухоли меланомы B16F10. После секвенирования был проведен контроль качества полученных экзомных и транскриптомных библиотек, показавших, что данные секвенирования подходят для биоинформатического анализа.

Детекция соматических точечных мутаций является ключевым шагом в характеристике генома опухоли. Для поиска мутаций в образцах опухоли использовали 2 различные программы: Strelka и MuTect2.

Strelka представляет собой программу для детекции соматических вариантов и инделей на основе сравнения выровненных секвенированных прочтений парных образцов рака и нормы. Strelka основана на Байесовском подходе, где частоты аллелей в образце рака и нормы рассматриваются как непрерывные значения, при этом образцы нормы представлены как смесь мутаций в половых клетках и шума, а образцы рака представляют собой смесь нормального образца с раковыми клетками, содержащими соматические мутации. Более высокая точность алгоритма Strelka достигается за счет поиска инделей и перевыравнивания прочтений в контексте обоих образцов. Эта модель структурирована для учета любого уровня вариации частоты аллелей в образце опухоли без необходимости оценки чистоты образца [15].

В MuTect2 [16] для образцов рака оцениваются и сравниваются 2 модели: модель дикого типа M0, которая подразумевает, что все риды, не совпадающие с референсом, являются техническим артефактом, и мутационная модель Mf, подразумевающая, что аллельный вариант представлен с некоторой неизвестной частотой f. Логарифм отношения правдоподобия (LOD score) вычисляется для выбора более подходящей модели. В потенциальных сайтах мутаций (точки с высоким LOD score) модель M0 сравнивается с гетерозиготной моделью M0.5. Если M0 оказывается

Таблица 1. Количество общих и уникальных мутаций, найденных при сравнении образцов экзомов

Table 1. Common and unique mutations found when comparing exome samples

Сравниваемая пара образцов Compared samples		Мутации, уникальные для 1-го образца Unique mutations for the 1-st sample	Мутации, уникальные для 2-го образца Unique mutations for the 2-d sample	Мутации, общие для 2 образцов Common mutations for 2 samples
1	2	510	462	1473
1	3	454	501	1529
2	3	435	530	1500

предпочтительнее, чем M0.5, вариант считается соматической мутацией.

В работе M. Löwer и соавт. было показано, что в меланоме B16F10 тремя различными алгоритмами поиска соматических мутаций (GATK, SAMtools and SomaticSniper) было обнаружено 5338, 8672 и 8220 соответственно мутаций в экзонах [17]. Далее была проведена процедура фильтрации мутаций, в ходе которой были оставлены только точечные замены, встречающиеся во всех образцах меланомы и не встречающиеся во всех образцах нормы, при этом соответствующие участки в образцах нормы секвенированы с высоким качеством. После такой обработки было отобрано 4078 мутаций. При этом всеми тремя алгоритмами одновременно было найдено 33 % мутаций (1335 из 4078). Интересно, что в другой статье тех же авторов при анализе 2 реплик меланомы B16F10 тремя различными алгоритмами поиска соматических мутаций (GATK, SAMtools and SomaticSniper) было выявлено 908 соматических мутаций [18]. По-видимому, такие различия объясняются быстрым накоплением новых мутаций в опухоли или высокой гетерогенностью опухолевой ткани.

Нами был проведен поиск соматических мутаций, которые присутствуют только в образцах опухолей и не найдены в образцах нормальной ткани, при этом гены, несущие данные мутации, экспрессируются в образцах опухоли. В образце 1 было найдено 1983 мутации, в образце 2 — 1935 мутаций, в образце 3 — 2030 мутаций.

Сравнение найденных мутаций из различных образцов экзомов показало, что список мутаций, полученных при анализе различных образцов меланомы B16F10, значительно перекрывается, но не идентичен, как видно из табл. 1.

Предсказание коротких неоантигенных пептидов, аффинных к МНС H-2 мыши, было проведено с использованием модели netMHCpan. Для предсказания коротких пептидов использовали мутации типа миссенс и фреймшифт. Транскриптомные данные использовали для подтверждения, что мутированные аллели экспрессируются в опухоли. С помощью пайплайна Vaxrank были предсказаны пептиды длиной 25–27 aa, которые впоследствии были проранжиро-

ваны по внутренней метрике. Предсказание выполнялось отдельно для каждого из экспериментальных образцов, а затем полученные наборы пептидов были объединены. Из всего получившегося набора пептидов для последующего исследования были выделены пептиды, обладающие максимальным значением рейтинга (табл. 2). Для них представлены параметры синтезируемости, оцененные Vaxrank, и растворимости, оцененные с помощью сервера, описанного в работе M. Hebditch и соавт. [14].

В качестве положительного контроля выбраны пептиды, описанные в исследованиях J.C. Castle, S. Kreiter и соавт. [3, 19]. В этих работах мышей иммунизировали подкожно пептидами с адьювантом Poly (I : C), в результате показано, что наибольшую противоопухолевую активность проявили пептиды, содержащие мутации Tubb3 (G402A) и Kif18b (K739N). При иммунизации группы мышей пептидом, содержащим мутацию K739N в Kif18b, наблюдалась выживаемость 40 % мышей, в то время как в контрольной группе все мыши погибли в течение 44 дней.

Среди наших пептидов, выбранных для проверки, есть пептид, содержащий мутацию в гене *Pbk*. Он почти полностью совпадает с пептидом из работы S. Kreiter и соавт., кроме того, что не содержит 2 остатков (DS) на N-конце и, наоборот, содержит 2 остатка ЕК на С-конце. Из 21 пептида, исследованного в работе S. Kreiter, в наш список попали 8. Последовательности пептидов, выбранные в результате нашего исследования, отличаются 1–2 концевыми остатками, в 2 случаях — 4–5 остатками.

Полученные последовательности пептидов были переданы на многопоточный синтез и очистку.

Заключение

В результате проведенной работы нами был разработан биоинформатический подход для предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10. Данные пептиды в дальнейшем будут использованы для создания пептидной неоантигенной вакцины против меланомы мыши B16F10.

Прототипом нашей работы послужили исследования J.C. Castle, A. Rubinstein, J. Kodysh, S. Kreiter и соавт. В работе J.C. Castle и соавт. было найдено 962 гена, содержащих мутации, ассоциированные с меланомой B16F10, из которых авторы отобрали 50 для верификации [3]. Из отобранных нами мутаций 14 пересекаются с 50 экспериментально изученными и 49 — с исходным списком из 962 генов. Сравнение на уровне последовательностей отобранных пептидов проводить нецелесообразно, поскольку в работе J.C. Castle и соавт. пептиды были сконструированы как 27-аминокислотные последовательности с центром в точке мутации, а в нашей работе выбор последовательности,

которая содержит мутацию и при этом имеет наибольшее сродство к комплексу МНС-I, осуществлялся с помощью программы NetMHCpan как шаг пайплайна Vaxrank.

Таким образом, несмотря на значительные различия в программах и подходах для поиска мутаций, в нашей работе и в исследовании J.C. Castle и соавт., где данные образцы были проанализированы впервые, полученные результаты пересекаются в 70 % (49 из 67) случаев с ранее полученными данными, что позволяет говорить о применимости предложенного подхода не только для поиска мутаций в образцах мышины меланомы, но и для поиска иммуногенных мутаций меланомы человека.

Таблица 2. Перечень отобранных пептидов, а также пептидов, которые могут быть использованы в качестве положительного контроля
Table 2. Selected peptides, as well as those that can be used as a positive control

Ген Gene	Замена Substitution	Последовательность Sequence	Рейтинг Score
<i>Ctsd</i>	p. G403S	DVFIGSYYTVFDRDNNRV_S_FANAVVL*	105,82
<i>Sdcbp</i>	p. I219M	SSGHVGFIFKSGK_M_TSIVKDSSAARNG	49,72
<i>Dennd5a</i>	p. D1250A	PITAHMYE_A_VALIKDHTLVNSLIRVLQ	13,86
<i>Gm4951</i>	p. D267Y	FMFSLPNIT_Y_SVIEKKRNFLRWKTWLE	12,98
<i>Herc2</i>	p. C4450F	GGLAGPDGTKSVFGQM_F_AKMSSFSPDS	9,98
<i>Enpp2</i>	p. P755Q	PEAKYDAFLVTNMV_Q_MYPAFKRVWTFYF	8,09
<i>Arpc1b</i>	p. S117F	WAPNENKFAVGSG_F_RVISICYFEQEND	6,57
<i>Olfr776</i>	p. D178A	CALNIIDHFSC_A_YFPILQLSCSDTRLL	6,05
<i>Aqp4</i>	p. L202W	GFSVAIGH_W_FAINYTGASMNPARSFGP	5,28
<i>Klhl28</i>	p. P110A	GTVFISQDTVESLL_A_AANLLQIKLVLK	5,23
<i>Ampd2</i>	p. Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_YLYLAQIG	5,19
<i>B3gal16</i>	p. R228L	LVHYLRSL_L_EYLRWHSEDVSLGTWLA	5,15
<i>Pcmd1</i>	p. P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPPC	4,88
<i>Smc4</i>	p. D767N	SGGGSKVMRGRMGSSVI_N_EISVEEVNK	4,47
<i>2210408I21Rik</i>	p. D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLLNSFPDLEFK	4,44
<i>Lins1</i>	p. K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLLYFQL	3,89
<i>Pole</i>	p. L1847F	TLHNMMKK_F_FLQLIAEFKRLGSSVVA	3,58
<i>Olfr706</i>	p. I174F	TVYTMFYFPFCMSQE_F_RHLLCEILPLLK	3,55
<i>Atp6v1h</i>	p. K147T	VHMAARIA_T_LAAWGKELMEGSDLNYY	3,44
<i>Nsun2</i>	p. K138M	AWHTNLSRKILR_M_SPLLAKFHQFLVSE	3,32
<i>Pbk</i>	p. V145D	GSPFPAVILR_D_ALHMARGGLKYLHQEK	3,09
<i>Pbk</i>	p. V145D	GSPFPAVILR_D_ALHMARGGLKYLHQEK	3,09
<i>Nckip5d</i>	p. K492N	MQTDTQDHQ_N_LCYSAVLAMVFSMGEA	2,86
<i>Hpdl</i>	p. P144A	AGYRGSFL_A_GFRPLPCTPGPGVWSHVD	2,81

Окончание табл. 2

The end of the table 2

Ген Gene	Замена Substitution	Последовательность Sequence	Рейтинг Score
<i>Vps52</i>	p. H448R	YDAIAVFLCI_R_IVLRFRNIAAKRDVPA	2,62
<i>Poll</i>	p. H509N	ALLYFTGSA_N_FNRSMRALAKTKGMSLS	2,51
<i>Orc2</i>	p. F278V	RVDQKTLHNLLRK_V_VPSFSAEIERLNQ	2,51
<i>3110043021Rik</i>	p. Q297H	VQGLLKDATGSFVLPFR_H_VMYAPYPTT	2,39
<i>Apb1</i>	p. C654Y	ASLSEAVQAA_Y_MLRYQKCLDARSQTST	2,19
<i>Arsj</i>	p. R509M	FNITADPYERVDLSS_M_YPGIVKKLLRR	2,17
<i>Krt75</i>	p. G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLGGTRRVSIG	2,09
<i>Mrm2</i>	p. R134T	TFLCPADVTDP_T_TFQKILELLPSRRAD	1,87
<i>2810474019Rik</i>	p. N687T	SYNSQIAEIF_T_SVQTEPQKPSPNQVID	1,73
<i>Arfggf2</i>	p. E538V	VVDIYVNYDCDLNAANIF_V_RLVNDL	1,72
<i>Gm7298</i>	p. C48R	YTETPEKI_R_LHLYHLNETVTITASLVS	1,45
<i>Angel2</i>	p. D166N	RNVDSTCEDREDKF_N_FSVMSYNILSQD	1,40
<i>St6galnac3</i>	p. D30E	LLLAMRLVN_E_ATFPLLLNCFGQPKTKW	1,34
<i>Cd55</i>	p. D254A	SDSYTYSQVVITYSC_A_KGFILVGNASIY	1,31
<i>Wipi2</i>	p. T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_VRLPFCGHKNI	1,30
<i>Adgrv1</i>	p. Y5165F	KITTIP_F_TTEVFAPVTETVTVSAIP	1,17
<i>Taar9</i>	p. C190W	NEEGIEELVVALTCVGG_W_QAPLNQNWV	1,14
Положительный контроль Positive control			
<i>Tnpo3</i>	p. G504A	VDRNPQFLDPVL_A_YLMKGLCEKPLASA	4,16
<i>Actn4</i>	p. F855V	SGLVTFQAFID_V_MSRETTDTDTADQVI	6,59
<i>Tm9sf3</i>	p. Y382H	PAMVCGTAFFINFIAIY_H_HASRAIPFG	2,11
<i>Ppp1r7</i>	p. L170P	RNIEGIDKLTQLKK_P_FLVNNKINKIEN	0,00
<i>Mthfd1l</i>	p. F294V	WIPSGTTILNCFHD_V_LSGKLSGGSPGV	0,42
<i>Tubb3</i>	p. G402A	FRRKAFLHWYTGE_A_MDEMEFTEAESNM	0,00
<i>Sema3b</i>	p. L663V	LRRLVLHV_V_SAAQAERLARAEEAAPA	0,00
<i>Kif18b</i>	p. K739N	PSKPSFQEFVDWE_N_VSPELNSTDQPFL	NA**
<i>Obsl1</i>	p. T1764M	REGVELCPGNKYEMRRRHGTTHSLVIHD	NA
<i>Sema3b</i>	L663V	GFSQPLRRLVLHVVSAAQAERLARAEE	NA
<i>Tm9sf3</i>	Y382H	CGTAFFINFIAIYHHASRAIPFGTMVA	NA

*«_» — несинонимичная замена аминокислоты; **NA — пептид не был предсказан при нашем анализе.

*«_» — nonsynonymous substitution of the amino acid; **NA — the peptide was not predicted in our analysis.

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

1. Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-7-2-6-14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):5–14. (In Russ.)].
2. Robbins P.F., El-Gamil M., Li Y.F. et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. J Exp Med 1996;183:1185–92. DOI: 10.1084/jem.183.3.1185.
3. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 2012;75(5):1081–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722.
4. Robbins P.F., Lu Y.C., El-Gamil M. et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. Nat Med 2013;19(6):747–52. DOI: 10.1038/nm.3161.
5. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. Nature 2017;547:217–21. DOI: 10.1038/nature22991.
6. Singh H., Raghava G.P. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. Bioinformatics 2003;19(8):1009–14. DOI: 10.1093/bioinformatics/btg108.
7. Reche P.A., Glutting J.P. Enhancement to the RANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles. Immunogenetics 2004;56(6):405–19. DOI: 10.1007/s00251-004-0709-7.
8. McGranahan N., Furness A.J., Rosenthal R. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. Science 2016;351(6280):1463–9. DOI: 10.1126/science.aaf1490.
9. Jurtz V., Paul S., Andreatta M. et al. NetMHCpan-4.0: Improved peptide-MHC class I interaction predictions integrating eluted ligand and peptide binding affinity data. J Immunol 2017;199(9):3360–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1700893.
10. Lundegaard C., Lamberth K., Harndahl M. et al. NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8–11. Nucleic Acids Res 2008;36(Web Server issue):509–12. DOI: 10.1093/nar/gkn202.
11. Rubinsteyn A., Hodes I., Kodysh J., Hammerbacher J. Vaxrank: A computational tool for designing personalized cancer vaccines. available at: <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/10/18/142919>
12. Rubinsteyn A., Kodysh J., Hodes I. et al. Computational pipeline for the PGV-001 neoantigen vaccine trial. Front Immunol 2018;8:1807. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01807.
13. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 1982;157(1):105–32. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90515-0.
14. Hebditch M., Carballo-Amador M.A., Charonis S. et al. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. Bioinformatics 2017;33(19):3098–100. DOI: 10.1093/bioinformatics/btx345.
15. Saunders C.T., Wong W.S., Swamy S. et al. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. Bioinformatics 2012;28(14):1811–7. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts271.
16. Cibulskis K., Lawrence M.S., Carter S.L. et al. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. Nat Biotechnol 2013;31(3):213–9. DOI: 10.1038/nbt.2514.
17. Löwer M., Renard B.Y., de Graaf J. et al. Confidence-based somatic mutation evaluation and prioritization. PLoS Comput Biol 2012;8(9):1002714. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1002714.
18. Castle J.C., Löwer M., Boegel S. et al. Mutated tumor alleles are expressed according to their DNA frequency. Sci Rep 2014;4:4743. DOI: 10.1038/srep04743.
19. Kreiter S., Vormehr M., van de Roemer N. et al. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer. Nature 2015;520(7549):692–6. DOI: 10.1038/nature14426.

Вклад авторов

В.С. Косоруков: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи;

М.А. Барышникова: концепция и дизайн, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;

Е.Н. Кособокова: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

Д.Ю. Яковичина: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;

А.С. Ершова: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных;

Ю.А. Пеков: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных.

Author's contributions

V.S. Kosorukov: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article, approval of the final version;

M.A. Baryshnikova: concept and design, data collection and processing, article preparation;

E.N. Kosobokova: data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

D.Yu. Yakovishina: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;

A.S. Ershova: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation;

Yu.A. Pekov: data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation.

ORCID авторов/ORCID of authors

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

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

Е.Н. Кособокова/E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

Д.Ю. Яковичина/D.Yu. Yakovishina: <https://orcid.org/0000-0003-1557-7593>

А.С. Ершова/A.S. Ershova: <https://orcid.org/0000-0002-1014-7677>

Ю.А. Пеков/Yu.A. Pekov: <https://orcid.org/0000-0001-9285-0309>

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

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках экспериментальной научной разработки № АААА-А18-118032290146-5.
Financing. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the experimental scientific development No АААА-А18-118032290146-5.

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: 22.07.2019. Принята в печать: 12.08.2019.
Article received: 22.07.2019. Accepted for publication: 12.08.2019.

ПОИСК ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СРЕДСТВ СРЕДИ НОВЫХ УГЛЕВОДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ МОЧЕВИН

Б.К. Эрназарова¹, А.З. Джуманазарова², А.Е. Бармашов³, Г.Н. Апрышко³

¹Жалал-Абадский государственный университет; Кыргызская Республика, 715600 Жалал-Абад, ул. Ленина, 57;

²Институт химии и фитотехнологий НАН КР; Кыргызская Республика, 720071 Бишкек, проспект Чуй, 267;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Бактыгуль Кочкорбаевна Эрназарова nausa_07@mail.ru

Введение. В последние годы создание и использование препаратов для таргетной противоопухолевой терапии, улучшивших качество жизни и выживаемость онкологических пациентов, стало переломным событием в развитии онкологии. Известно, что производные мочевины входят в класс препаратов, обладающих антиангиогенными свойствами. Присоединение же углеводного остатка к производным мочевины способствует улучшению растворимости, адресной доставки лекарств в организме (таргетности), устранению побочных эффектов. С целью поиска новых соединений с антиангиогенными свойствами нами синтезирован ряд соединений, часть из которых — ранее неизвестные производные мочевины.

Цель исследования — синтез производных мочевины на основе переамидирования нитрозокарбамидов сахаров, а также оценка методами *in silico* и *in vitro* возможности создания новых противоопухолевых лекарств на основе новых гликозидных производных мочевины.

Материалы и методы. Доэкспериментальное прогнозирование биологической активности проводили с помощью компьютерной системы PASS. Цитотоксическую активность определяли методом МТТ. Для постановки МТТ-теста клетки раскладывали в 198 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные планшеты. Через сутки в каждую лунку добавляли исследуемые соединения в концентрации 100 мкМ. Через 72 ч в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ. Интенсивность окрашивания среды измеряли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций Multiskan EX при $\lambda = 540$ нм.

Результаты. Для 5 виртуальных соединений из ряда исследованных предсказаны высокая вероятность противоопухолевой активности и низкая вероятность цитотоксической активности *in silico*. Синтезированы соединения: N-(β -D-галактопиранозилкарбомойл-1)-2-изоникотин-семикарбазид, 1-[(N- β -D-галактопиранозил)карбомойл]-3,5-диметилпиразол, N-(β -D-галактопиранозилкарбомойл)-п-бромфенилмочевина, N-(β -D-галактопиранозил)-п-хлорфенилмочевина, N-(β -D-глюкопиранозил)-п-хлорфенилмочевина. Соединения не проявляли цитотоксическую активность *in vitro*.

Выводы. Для исследованных соединений виртуально спрогнозированы низкая вероятность проявления цитостатической активности (что подтверждено экспериментально) и высокая вероятность проявления противоопухолевой активности.

Ключевые слова: противоопухолевое соединение, цитотоксический тест, производное мочевины

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-31-38

SEARCH FOR NEW ANTICANCER DRUGS AMONG NEW CARBOHYDRATE DERIVATIVES UREA

B.K. Ernazarova¹, A.Z. Dzhumanazarova², A.E. Barmashov³, G.N. Apryshko³

¹Jalal-Abad State University; 57 Lenin St., Jalal-Abad 715600, Kyrgyz Republic;

²Institute of Chemistry and Phytotechnology of the NAS KR; 267 Chui Prospekt, Bishkek 720071, Kyrgyz Republic;

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

Introduction. In recent years, the creation and use of drugs for antitumor therapy, which have improved the quality of life and survival of cancer patients, has become a crucial event in the development of oncology. It is known that urea derivatives are included in the class of drugs with anti-angiogenic properties. The addition of a carbohydrate residue to urea derivatives helps to improve the solubility, targeted drug delivery in the body (targeting), and the elimination of side effects. In order to search for new compounds with anti-angiogenic properties, we have synthesized a number of compounds, some of which are previously unknown urea derivatives.

Purpose of the study — synthesis of urea derivatives based on sugary nitrosocarbamidetransamidation. To evaluate using *in silico* and *in vitro* methods, there is the ability to create new anticancer drugs based on new glycosidic urea derivatives.

Materials and methods. Pre-experimental prediction of biological activity was performed using a computer system PASS.

Cytotoxic activity was determined by the MTT method. For the MTT assay, cells were dropped into 198 μ l of RPMI-1640 complete medium in 96-well plates. After one day, the test compounds were added to each well in concentration 100 μ mol. After 72 hours, 20 μ l of MTT solution was added to each well. The intensity of the medium staining was measured on a Multiskan EX photometric immunoassay analyzer at $\lambda = 540$ nm.

Results. From the number of virtual compounds studied, for 5 compounds a high probability of antineoplastic activity and a low probability of cytotoxic activity *in silico* are predicted. Compounds were synthesized: *N*-(β -D-galactopyranosylcarbamoyl-1)-2-isonicotin-semicarbazide, 1-[(*N*- β -D-galactopyranosyl)-carbamoyl]-3,5-dimethylpyrazole, *N*-(β -D-galactopyranosylcarbamoyl)-*p*-bromophenylurea, *N*-(β -D-galactopyranosyl)-*p*-chlorophenylurea, *N*-(β -D-glucopyranosyl)-*p*-chlorophenylurea. The compounds did not show cytotoxic activity *in vitro*.

Conclusion. For the studied compounds, a low probability of cytostatic activity manifestation (as confirmed experimentally) and a high probability of antitumor activity manifestation are virtually predicted.

Key words: anticancer drug, cytotoxic assay, derivatives urea

Введение

В последние годы создание и использование препаратов для таргетной противоопухолевой терапии, улучшивших качество жизни и выживаемость онкологических пациентов, стало переломным событием в развитии онкологии.

Рост всех солидных опухолей зависит от ангиогенеза. В опухолевых тканях, особенно в тканях злокачественных опухолей, ангиогенез протекает постоянно и очень интенсивно [1, 2]. Это является одной из причин быстрого роста злокачественных опухолей, поскольку они активно снабжаются кровью и получают значительное количество питательных веществ. Кроме того, усиленный ангиогенез в опухоли является одним из механизмов ее быстрого метастазирования, так как опухолевые клетки имеют свойство располагаться вдоль стенок кровеносных сосудов или разносятся по всему организму с током крови. Антиангиогенная терапия по определению не направлена на излечение, так как не обладает способностью воздействовать на опухолевые клетки. Однако подавление опухолевого ангиогенеза и регрессия уже образованных опухолевых сосудов потенциально могут перевести опухоль в «спящее» состояние, при котором не происходит дальнейшего увеличения ее размеров (все вновь образованные клетки гибнут от гипоксии), и даже привести к уменьшению опухоли и ее метастазов до минимального размера. Подавление ангиогенеза может приводить и к «нормализации» внутриопухолевой сосудистой сети. В связи с этим создание антиангиогенных препаратов является одним из наиболее активно развиваемых и перспективных направлений в области лечения злокачественных новообразований.

Известно, что производные мочевины входят в класс препаратов, обладающих антиангиогенными свойствами [3]. Присоединение же углеводного остатка к производным мочевины способствует улучшению растворимости, адресной доставки лекарств в организме, устранению побочных эффектов [4, 5]. С целью поиска новых соединений с антиангиогенными свойствами нами синтезирован ряд новых соединений.

Для 5 синтезированных соединений предсказаны высокая вероятность противоопухолевой (antineo-

plastic) активности и низкая вероятность цитотоксической активности *in silico*. Соединения *N*-(β -D-галактопиранозилкарбомойл)-*p*-бромфенилмочевина (III), *N*-(β -D-галактопиранозил)-*p*-хлорфенилмочевина (II), *N*-(β -D-глюкопиранозил)-*p*-хлорфенилмочевина описаны в ряде работ, тогда как соединения *N*-(β -D-галактопиранозилкарбомойл-1)-2-изоникотин-семикарбазид (IV), 1-[(*N*- β -D-галактопиранозил)-карбомойл]-3,5-диметилпиразол (VI) ранее были неизвестны [6, 7].

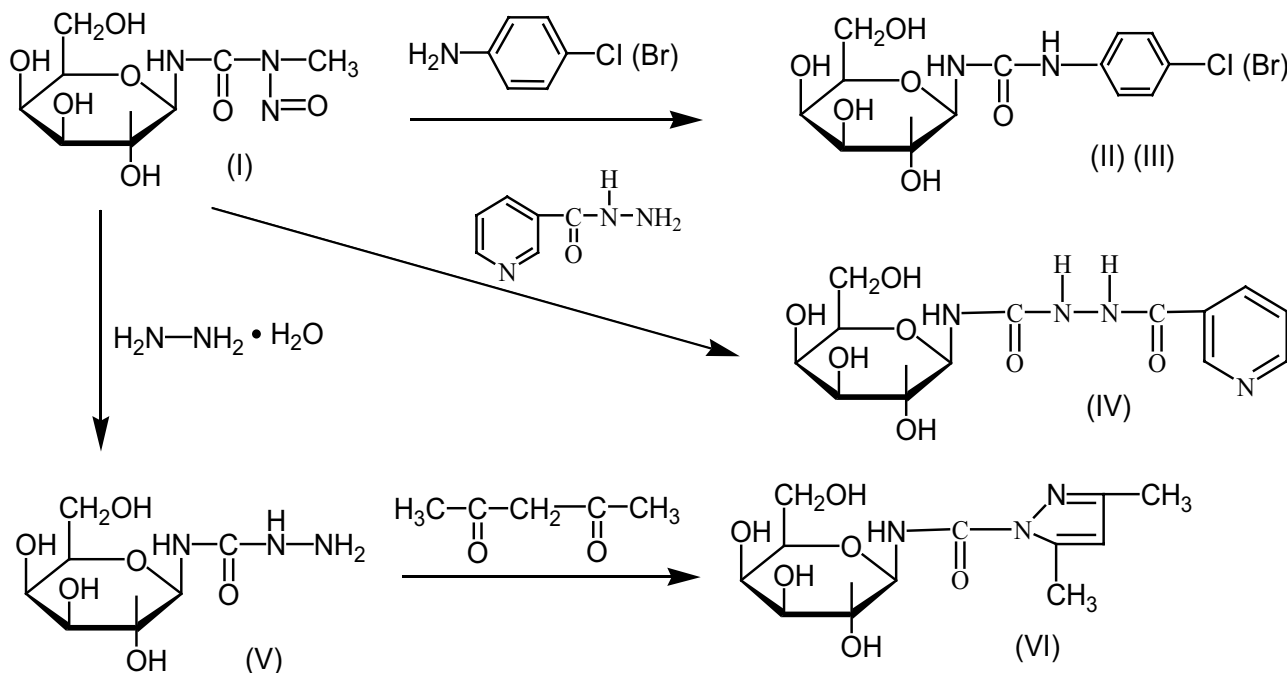
Цель исследования — синтез производных мочевины на основе переамидирования нитрозокарбамидов сахаров. Оценить методами *in silico* и *in vitro* возможность создания новых противоопухолевых лекарств на основе новых гликозидных производных мочевины.

Материалы и методы

Гликозил-нитрозометилмочевина была избрана ключевым соединением для разработки методов получения новых углеводных аналогов медицинских препаратов. Этот класс соединений обладает высокой реакционной способностью, и на его основе нами были синтезированы углеводные производные мочевины. Установлено, что при непродолжительном нагревании эквимолекулярных количеств реагентов в водно-спиртовых средах гликозил-нитрозометилмочевина гладко вступают в реакцию конденсации с аминами (см. рисунок).

Результаты экспериментальных исследований показывают, что в ходе реакции образования промежуточных интермедиатов за счет присоединения амина и разрыва одной из связей группы, по-видимому, не происходит. Вероятнее всего, реакция протекает по синхронному механизму с одновременным разрывом старой и образованием новой связи C—N. Реакция нуклеофильного замещения для протекания процесса образования конечных продуктов не требует в большинстве случаев добавок катализирующих агентов. Это свидетельствует о том, что введение нитрозогруппы само по себе оказывает достаточно сильное активирующее действие, которое сводится главным образом к разрыхлению связи C—N (N0).

С целью облегчения поиска среди синтезированных нами соединений веществ с нужным эффектом



Реакция получения углеводов производных мочевины

Synthesis of carbohydrate derivatives of urea

проведено доэкспериментальное прогнозирование биологической активности, для чего их структурные формулы сгенерированы с помощью компьютерной системы PASS, разработанной и постоянно совершенствуемой сотрудниками Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича [8–11]. Используемая версия PASS 12.06.22 прогнозирует биологическую активность 6400 видов химических веществ на основе сравнения структурных формул исследуемых соединений со структурными формулами соединений из массива данных, содержащего формулы и сведения по биологической активности 313 345 химических соединений.

Структурные формулы исследуемых соединений вводятся в систему в виде файлов формата MOL или SDF. Средняя ошибка прогноза составляет 4,9 %. Результаты прогнозирования рассчитывают в виде вероятности проявления определенной биологической активности (p_a) соединением и вероятности не проявлять эту активность (p_i). Обычно для новых химических соединений порогом отбора перспективных соединений считают значение $p_a > 0,5$.

После контроля корректности сгенерированные структурные формулы исследуемых соединений вводили в базу данных формата ISISBASE, из которой экспортировали в файлы формата SDF для ввода в систему PASS. В качестве перспективных для экспериментального изучения потенциальных противоопухолевых веществ были квалифицированы соединения, для которых при компьютерном прогнозировании

получены значения вероятности проявления противоопухолевой активности $p_a \geq 0,5$.

Цитотоксическую активность определяли методом МТТ.

Для постановки МТТ-теста клетки раскапывали в 198 мкл полной среды RPMI-1640 в 96-луночные плоскодонные планшеты (Costar, USA).

Через сутки в каждую лунку добавляли исследуемые соединения в концентрации 100 мкМ и инкубировали с клетками в течение 72 ч в 5 % CO_2 при 37 °С. Каждое соединение ставили в триплет. Соединения растворяли в диметилсульфоксиде так, чтобы концентрация диметилсульфоксида в лунке не превышала 1 %. В качестве контроля использовали лунки с клетками с 1 % диметилсульфоксидом в полной ростовой среде.

Через 72 ч в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ [3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид] (маточный раствор 5 мг/мл, конечная концентрация 1 мг/мл) и инкубировали 4 ч при 37 °С в 5 % CO_2 .

После образования формазана надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли в 150 мкл диметилсульфоксида. Далее планшеты помещали на 5–7 мин в термостат при температуре 37 °С, затем встряхивали на шейкере для равномерного растворения кристаллов формазана, после чего интенсивность окрашивания среды измеряли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций Multiskan EX при $\lambda = 540$ нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Определяли процент ингибирования роста клеток (И, %) по формуле:

$$И = (1 - (O_o / O_k)) \times 100 \%,$$

где O_k — оптическая плотность в контрольных лунках, O_o — оптическая плотность в опытных лунках.

Соединение считали цитостатически активным, если оно вызывало подавление роста клеток $>50 \%$.

Результаты

Для 5 из 57 исследованных виртуальных соединений (нумерация и названия которых приведены в табл. 1) предсказаны высокая вероятность проти-

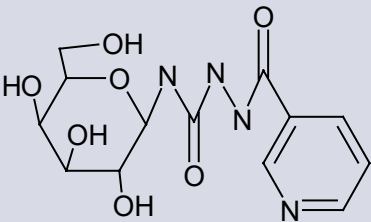
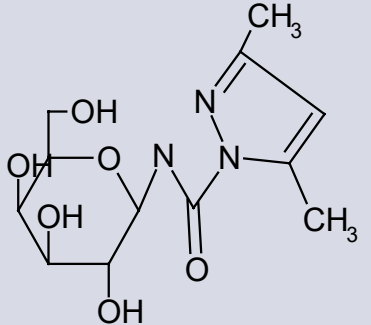
воопухолевой (antineoplastic) активности и низкая вероятность цитотоксической активности. В табл. 1 для этих соединений представлены также результаты прогнозирования 9 видов биологической активности (противоопухолевой, цитотоксической, общей токсичности, антиметастатической активности и ряда механизмов действия противораковых лекарств) в виде значений вероятности наличия (p_a) или отсутствия (p_i) у соединения противоопухолевой активности.

Объект исследования — соединения, содержащие углеводные фрагменты (II–VI), формулы которых представлены на рисунке.

Реакция протекает гладко в спиртовой среде. Выход продуктов составляет $\approx 55 \%$. Идентификацию

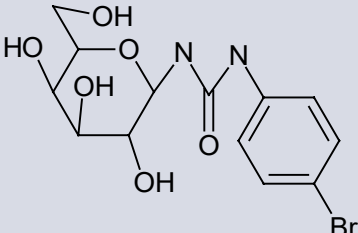
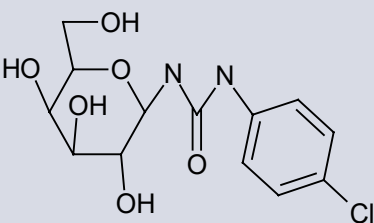
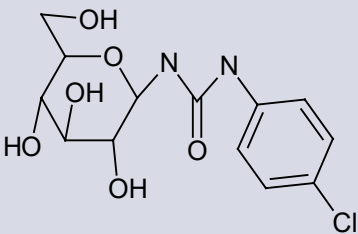
Таблица 1. Результаты прогнозирования биологической активности гликозидов мочевины

Table 1. Prediction results of the biological activity of urea glycosides

№ соединения Compound №	Название соединений Compound name	Химическая структура Chemical structure	Прогноз активности Predicted activity		Активность Activity
			P_a	P_i	
1	N-(β-D-галактопиранозил-карбомойл-1)-2-изоникотин-семикарбазид N-(β-D-galactopyranosylcarbomoyl-1)-2-isonicotinemicarbazide		0,779	0,014	Противоопухолевая Antineoplastic
			0,613	0,010	Ингибитор ангиогенеза Angiogenesis inhibitor
			0,384	0,051	Антиметастатическая Antimetastatic
			0,297	0,128	Агонисты апоптоза Apoptosis agonist
			0,162	0,099	Антилейкемическая Antileukemic
			0,173	0,156	Цитостатическая Cytostatic
			0,084	0,199	Цитотоксическая Cytotoxic
			0,078	0,384	Токсическая Toxic
			0,020	0,598	Антимитотическая Antimitotic
2	1-[(N-β-D-галактопиранозил)карбомойл-3,5-диметилпиразол] 1-[(N-β-D-galactopyranosyl)carbomoyl-3,5-dimethylpyrazole]		0,622	0,040	Противоопухолевая Antineoplastic
			0,539	0,016	Ингибитор ангиогенеза Angiogenesis inhibitor
			0,502	0,019	Антиметастатическая Antimetastatic
			0,254	0,167	Токсическая Toxic
			0,245	0,168	Агонисты апоптоза Apoptosis agonist
			0,182	0,148	Цитостатическая Cytostatic
			0,148	0,130	Цитотоксическая Cytotoxic
			0,041	0,314	Антилейкемическая Antileukemic
			0,034	0,463	Антимитотическая Antimitotic

Окончание табл. 1

The end of the table 1

№ соединения Compound №	Название соединений Compound name	Химическая структура Chemical structure	Прогноз активности Predicted activity		Активность Activity
			P_a	P_i	
3	N-(β-D-галактопиранозилкарбомойл)- п-бром-фенилмочевина N-(β-D-galactopyranosyl-carbomoyl)-p-bromophenylurea		0,784	0,014	Противоопухолевая Antineoplastic
			0,750	0,005	Ингибиторы ангиогенеза Angiogenesis inhibitor
			0,422	0,040	Антиметастатическая Antimetastatic
			0,344	0,101	Агонисты апоптоза Apoptosis agonist
			0,241	0,100	Цитостатическая Cytostatic
			0,198	0,096	Цитотоксическая Cytotoxic
			0,149	0,108	Антилейкемическая Antileukemic
			0,208	0,198	Токсическая Toxic
			0,027	0,524	Антимитотическая Antimitotic
4	N-(β-D-галактопиранозил)-п-хлор- фенилмочевина N-(β-D-galactopyranosyl)-p-chlorophenylurea		0,733	0,021	Противоопухолевая Antineoplastic
			0,689	0,006	Ингибиторы ангиогенеза Angiogenesis inhibitor
			0,459	0,030	Антиметастатическая Antimetastatic
			0,313	0,119	Агонисты апоптоза Apoptosis agonist
			0,233	0,105	Цитостатическая Cytostatic
			0,197	0,097	Цитотоксическая Cytotoxic
			0,243	0,174	Токсическая Toxic
			0,113	0,141	Антилейкемическая Antileukemic
			0,017	0,657	Антимитотическая Antimitotic
5	N-(β-D-глюкопиранозил)-п-хлор- фенилмочевина N-(β-D-glucopyranosyl)-p-chlorophenylurea		0,733	0,021	Антинеопластическая Antineoplastic
			0,689	0,006	Ингибиторы ангиогенеза Angiogenesis inhibitor
			0,459	0,030	Антиметастатическая Antimetastatic
			0,313	0,119	Агонисты апоптоза Apoptosis agonist
			0,233	0,105	Цитостатическая Cytostatic
			0,197	0,097	Цитотоксическая Cytotoxic
			0,243	0,174	Токсическая Toxic
			0,113	0,141	Антилейкемическая Antileukemic
			0,017	0,657	Антимитотическая Antimitotic

синтезируемых соединений осуществляли с помощью методов тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol, спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), ИК-, ^{13}C -, ^1H -спектроскопии и элементного анализа.

Спектры ^{13}C ЯМР были сняты на приборе Bruker AM-300, SF = 75,47 МГц с рабочей частотой 126 МГц при температуре 295 °К, где в качестве внутреннего стандарта использовался ТМС. Спектры сняты в дейтерированных растворителях — ДМСО- d_6 . ^1H -ЯМР-спектры были сняты на приборе Bruker AM-300, SF = 300,13 МГц с рабочей частотой 500 МГц при температуре 293 °К, где в качестве внутреннего стандарта использовали ТМС. Спектры сняты в дейтерированных растворителях ДМСО- d_6 .

Инфракрасные спектры исследуемых соединений были получены на спектрофотометрах Specord M-80 с программой Soft Spectra в области 500–4000 cm^{-1} (прессование с KBr).

Температуру плавления синтезируемых соединений измеряли на микронагревательном столике Boetuis. Скорость подъема температуры на столике составляла 4 °С в минуту. Элементный состав полученных соединений определен кулонометрическим методом и методами Дюма—Прегля и Шёнигера на приборах BM-20.

Синтез N-(β -D-галактопиранозил-1)-2-изоникотиноил-семикарбазида (IV)

В колбу, снабженную магнитной мешалкой, помещают 3,568 г гидразида изоникотиновой кислоты, растворяют в 30 мл этилового спирта и охлаждают смесь до –2 °С, затем в течение 30 мин при перемешивании добавляют 7,136 г N-метил-N-(β -D-галактопиранозил)-N-нитрозомочевина (I). Помешивая, смесь нагревают на водяной бане при 55–60 °С в течение 1 ч, при этой температуре выпадают кристаллы. Выпавшие кристаллы перекристаллизовывают из водного спирта, отфильтровывают и высушивают на воздухе.

Выход: 5,377 г (58,38 %), $T_{\text{пл}} = 212\text{--}213$ °С, *Rf = 0,3, **Rf = 0,5 (*хлороформ : этанол (1 : 1)), (**этанол : хлороформ : ацетон (2 : 1 : 1)).

Инфракрасный спектр (KBr, cm^{-1}): 892, 906, 1051, 1091, 1134 cm^{-1} (колебания углеводного кольца), 3000–3500 cm^{-1} (ОН-группы углеводного кольца), 1548 cm^{-1} (амид I, N–H), 1601 cm^{-1} (амид II, C = O), 473, 545, 583, 626, 675, 705 cm^{-1} (валентные колебания изониазида).

ЯМР ^1H (d, м. д.): 4,7 (уш. с., 8H, C–H), 3,55–4 (м., 4OH), 5,4 (с., 1H, N–H), 4,8 (д., 1H, NH–C–O), 7,5–8,8 (м., 4H, C–H аром.).

ЯМР ^{13}C (d, м. д.): 81,34 (C_1); 69,43 (C_2); 73,39 (C_3); 68,67 (C_4); 76,43 (C_5); 60,97 (C_6) 159,15 (C = O); 152,1 (C_7); 127,9 (C_8); 136,4 (C_9); 124,28 (C_{10}); 147,5 (C_{11}).

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_7$ 342,30

Вычислено, %: C – 45,61; H – 5,30; N – 16,36.

Найдено, %: C – 45,90; H – 5,59; N – 16,65.

1-[(N- β -D-галактопиранозил)карбоамил]-3,5-диметилпиразол (VI)

К 2,07 г (0,01 моль) галактопиранозилсемикарбазида (V) прибавили 1 мл (0,01 моль) ацетилацетона и 15 мл метанола. Реакционную смесь нагревали на кипящей водяной бане до полной гомогенизации. Выпавший осадок отфильтровали, промыли холодным спиртом, перекристаллизовали из водного спирта. Сушили на воздухе.

Выход: 1,8 г (60 %), т. пл. 180 °С, Rf = 0,5 TCX (хлороформ : метанол – 3 : 1), $[\alpha]_D^{20} = +24,8^\circ$ (с 1, H_2O).

Инфракрасный спектр (KBr, cm^{-1}): 900, 950, 1030, 1080, 1110 cm^{-1} (колебания углеводного кольца), 1130, 1168, 1220 cm^{-1} (колебания пиразольного кольца), 1300–1360 cm^{-1} (–N) 1545 cm^{-1} (амид I, N–H), 1710 cm^{-1} (амид II, C = O), 1260–1290 cm^{-1} (–C–N=), 1350 cm^{-1} (–CH–).

ЯМР ^1H (d, м. д., $\text{Py}-d_3$): 2,04 (уш. с., 3H, CH_3), 2,4 (уш. с., 3H, CH_3), 3,85–4,75 (м., 6H, CH-углеводные протоны), 5,45–5,9 (м., 1H, CH), 6,0–7,6 (м., 4H, OH), 9,13 (д., 1H, CONH).

$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6$ 301,28

Вычислено, %: C – 47,83; H – 6,36; N – 13,95.

Найдено, %: C – 47,95; H – 6,10; N – 13,80.

Экспериментальное изучение цитотоксической активности

Дальнейшее экспериментальное исследование цитостатической активности этих 5 соединений (N-(β -D-галактопиранозилкарбоамил)-п-бромфенилмочевина, N-(β -D-галактопиранозилкарбоамил-1)-2-изоникотинсемикарбазида, 1-[(N- β -D-галактопиранозил)карбоамил]-3,5-диметилпиразола, N-(β -D-галактопиранозил)-п-хлорфенилмочевина, N-(β -D-глюкопиранозил)-п-хлорфенилмочевина) проводили на базе лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Цитотоксическую активность исследовали на 5 клеточных линиях опухолей человека: аденокарциномы предстательной железы PC-3, карциномы толстой кишки HCT-116, T-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, аденокарциномы молочной железы MCF-7, карциномы легкого A549.

Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ HEPES (Sigma, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США), 40 нг/мл гентамицина (ICN, США), аминокислоты и витамины (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 . Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня. Для открепления с пластика адгезионных культур использовали раствор Версена.

Провели цитотоксическое исследование данных соединений методом МТТ. Ни одно из исследуемых

Таблица 2. Цитотоксическая активность исследуемых соединений в концентрации 100 мкМ (ингибирование роста клеток в %)

Table 2. Cytotoxic activity of the studied compounds at a concentration of 100 μ M (inhibition of cell growth in %)

№	Концентрация, 100 мкМ Concentration, 100 μ M	A549	PC3	Jurkat	HCT-116	MCF-7
1	N-(β -D-галактопиранозилкарбомойл-1)- 2-изоникотинсемикарбазид N-(β -D-galactopyranosylcarbomoyl-1)- 2-isonicotinsemicarbazide	26	0	6	0	0
2	1-[(N- β -D-галактопиранозил)карбомойл]- 3,5-диметилпиразола 1-[(N- β -D-galactopyranosyl)carbomoyl]-3,5-dimethylpyrazole	0	17	16	0	0
3	N-(β -D-галактопиранозилкарбомойл)- п-бромфенилмочевина N-(β -D-galactopyranosylcarbomoyl)-p-bromophenylurea	31	0	10	0	0
4	N-(β -D-галактопиранозил)-п-хлорфенилмочевина N-(β -D-galactopyranosyl)-p-chlorophenylurea	0	2	20	0	0
5	N-(β -D-глюкопиранозил)-п-хлорфенилмочевина N-(β -D-glucopyranosyl)-p-chlorophenylurea	0	19	2	0	0

МТТ-тестом соединений не проявило цитотоксическую активность. Результаты представлены в табл. 2.

Заключение

Для большинства исследованных виртуальных соединений получены низкая вероятность проявления цитостатической активности и высокая вероятность проявления противоопухолевой активности,

обусловленная согласно прогнозу, предположительно, антиангиогенными свойствами. Целесообразны их исследования на экспериментальных опухолях *in vivo* даже при отрицательных результатах анализа цитотоксичности на культурах клеток, а также дальнейший поиск потенциальных противоопухолевых соединений из класса гликозидных производных мочевины.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971;285(21):1182–6. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.
- Dvorak H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986;315(26):1650–9. DOI: 10.1056/NEJM198612253152606.
- Производные мочевины и их применение в качестве ингибиторов белка, связывающего жирные кислоты. Доступно по: <http://www.findpatent.ru/patent/264/2642454.html>. [Derivatives of urea and their use as inhibitors of a protein that binds fatty acids. Available by: <http://www.findpatent.ru/patent/264/2642454.html>. (In Russ.)].
- Лурье С.И., Шемьякин М.М. Глюкозиды сульфамидов. Журнал общей химии 1944;10(8):935–9. [Lurie S.I., Shemyakin M.M. Glucosides of sulfamides. *Zhurnal obshchey khimii* = Russian Journal of General Chemistry 1944;10(8):935–9. (In Russ.)].
- Прогресс химии углеводов. М.: Наука, 1985. С.: 230. [Progress in the chemistry of carbohydrates. Moscow: Nauka, 1985. P.: 230. (In Russ.)].
- Бакирова А.А., Эрназарова Б.К. Синтез N-арилзамещенных гликозилмочевин. Известия НАН КР 2012;1:41–5. [Bakirova A.A., Ernazarova B.K. Synthesis of N-aryl substituted glycosyl urea. *Izvestiya NAN KR* = News NAN KR 2012;1:41–5. (In Russ.)].
- Эрназарова Б.К., Дермугин В.С., Джаманбаев Ж.А. Синтез сахаросодержащих производных пиразола. Сб. научных трудов. Проблемы и перспективы развития химии и химической технологий в Кыргызской Республике 2002. С. 271–5. [Ernazarova B.K., Dermugin V.S., Dzhamanbaev J.A. Synthesis of sugar-containing derivatives of pyrazole. *Sb. nauchnykh trudov. Problems and prospects of development of chemistry and chemical technologies in the Kyrgyz Republic* 2002. P.: 271–5. (In Russ.)].
- Аширматов М.А., Джаманбаев Ж.А., Садыбакасов Б.К., Афанасьев В.А. Расчет структуры и оценка реакционной способности N-метил-N'-(β -D-ксилопиранозил)-нитрозо-мочевины в условиях кислотно-основного катализа. Теоретическая и экспериментальная химия 1985;5:596–9. [Ashirmatov M.A., Dzhamanbaev J.A., Sadybakasov B.K., Afanasyev V.A. Calculation of the structure and evaluation of the reactivity of N-methyl-N'-(β -D-xylopyranosyl)-nitroso-urea under acid-base catalysis. *Teoreticheskaya i eksperimentalnaya himiya* = Theoretical and Experimental Chemistry 1985;5:596–9 (In Russ.)].
- Filimonov D.A., Poroikov V.V. Prediction of biological activity spectra for organic compounds. *Chem Heterocycl* 2006;50(2):66–75.
- Filimonov D.A., Poroikov V.V. In.: Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening. Eds.: A. Varnek, A. Tropsha. Probabilistic approach in activity prediction 2008. C.: 182–216.
- Filimonov D.A., Lagunin A.A., Gloriovova T.A. et al. Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the PASS online web resource. *Chem Heterocycl* 2014;50(3):444–57.

Вклад авторов

Б.К. Эрназарова: постановка и проведение исследований по синтезу, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

А.З. Джуманазарова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, редактирование текста рукописи;

А.Е. Бармашов, Г.Н. Апрышко: постановка и проведение цитотоксической активности, получение данных и их анализ, интерпретация результатов.

Authors' contributions

B.K. Ernazarova: formulation and conduct of synthesis studies, obtaining data for analysis, article writing;

A.Z. Dzhumanazarova: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, manuscript text editing;

A.E. Barmashov, G.N. Apryshko: statement and carrying out cytotoxic activity, data acquisition and analysis, interpretation of results.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.З. Джуманазарова/A.Z. Dzhumanazarova: <https://orcid.org/0000-0001-6966-4188>

Б.К. Эрназарова/B.K. Ernazarova: <https://orcid.org/0000-0001-8154-0911>

А. Бармашов/A. Barmashov: <https://orcid.org/0000-0002-7440-6404>

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: 26.02.2019. Принята в печать: 05.08.2019.

Article received: 26.02.2019. Accepted for publication: 05.08.2019.

СОЗДАНИЕ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ АНАЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ НА БАЗЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ СЕРИИ ICO С ФИКОЭРИТРИНОМ – ФЛУОРОФОРОМ ГРУППЫ ФИКОБИЛИПРОТЕИНОВ

А.С. Гриневич, М.Н. Краева, Е.Н. Захарова, Д.Ю. Блохин, П.К. Иванов

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

Контакты: Анатолий Станиславович Гриневич agrinevich@mail.ru

Введение. Флуоресцентные зонды на основе моноклональных антител (МКА) широко используются в научных и клинических исследованиях в области онкологии, гематологии, иммунологии, эпидемиологии. Уникальные спектральные свойства природного белка фикоэритрина (РЕ) сделали его доминирующим флуорофором, широко используемым для создания флуоресцентных зондов на основе МКА.

Цель работы – создание иммунофлуоресцентных зондов (ИФЗ) на основе МКА и флуоресцентного красителя фикоэритрина двумя альтернативными методами белковой химии.

Материалы и методы. В работе были использованы антитела к антигенам Т-лимфоцитов (клон ICO-86, клон ICO-31), флуоресцентный краситель фикоэритрин и бифункциональные агенты SPDP и SMCC. Для выделения и очистки МКА использовали методы жидкостной хроматографии: на I этапе – аффинное выделение иммуноглобулинов на иммобилизованном белке G или в качестве альтернативы – анионообменную колоночную хроматографию. Для очистки конъюгатов (ИФЗ) от исходных компонентов реакции использовали гель-фильтрацию на колонке PD-10. Концентрацию и плотность мечения ИФЗ определяли спектрофотометрически.

Результаты. Конъюгирование МКА с РЕ проводили при молярном отношении компонентов 1 : 2. Мы использовали 2 метода белковой химии для получения конъюгатов на основе МКА с РЕ. Для этого оба компонента реакции конъюгации – РЕ и МКА – предварительно были раздельно модифицированы. Показано, что для создания ИФЗ на базе МКА серии ICO применимы оба приведенных метода конъюгирования МКА с РЕ, однако метод II, при котором химической модификации бифункциональным агентом SMCC подвергается только молекула РЕ по ее свободным аминогруппам, а молекула иммуноглобулина сохраняется в максимально нативном состоянии, исключая дозированное восстановление части дисульфидных групп, является предпочтительным.

Заключение. Способы, описанные в статье, позволяют получать ИФЗ на основе МКА серии ICO и РЕ, сравнимые по своим аналитическим характеристикам с зарубежными коммерческими аналогами.

Ключевые слова: моноклональное антитело, иммунофлуоресцентный зонд, фикоэритрин, конъюгат МКА

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-39-47

THE CREATION OF IMMUNOFLUORESCENCE PROBES BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES SERIES ICO AND PHYCOERYTHRIN – FLUOROPHORE OF PHYCOBILIPROTEIN GROUP FOR ANALYSIS OF CELL POPULATIONS BY FLOW CYTOMETRY

A.S. Grinevich, M.N. Kraeva, E.N. Zakharova, D. Yu. Blokhin, P.K. Ivanov

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

Introduction. Fluorescent probes based on monoclonal antibodies (MAb) are widely used in scientific and clinical research in the field of oncology, hematology, immunology, epidemiology. The unique spectral properties of the natural protein, phycoerythrin (PE), made it the dominant dye widely used for the preparation of fluorescent probes based on MAb.

Objective. To create of fluorescent probes based on the MAb and the fluorescent dye PE by two alternative methods of protein synthesis.

Materials and methods. MAb to T lymphocyte antigen (clone ICO-86, clone ICO-31), fluorescent dye PE and bifunctional agents SPDP and SMCC were used in the work. Liquid chromatography methods were used for isolation and purification of MAb: in the first step, affinity isolation of immunoglobulins on the immobilized protein G or anion exchange column chromatography. Gel filtration on a PD-10 column was used to purify the conjugates (immunofluorescent probes, IFP) in the second step, the concentration and labeling density of the IFP were determined spectrophotometrically.

Results. Conjugation of MAb with PE was carried out at a molar ratio of components of 1 : 2. For this both components of the conjugation reaction (PE and MAb) were separately modified. For the creation of IFP on the basis of the MAb of the ICO series, both methods of conjugation of MAb with PE are applicable, but method II, in which the chemical modification by the bifunctional SMCC agent is exposed only to the PE molecule by its free amino groups, and the immunoglobulin molecule is conserved in the maximally native state is preferred. **Conclusion.** The methods described in the article allow to obtain immunofluorescent probes based on antibodies of the ICO series that are comparable in their analytical characteristics to foreign commercial analogs.

Key words: monoclonal antibody, immunofluorescence probe, phycoerythrin, conjugate of MAb

Введение

Аналитические характеристики метода проточной цитометрии, широко используемого для мультипараметрического анализа клеточных суспензий, неразрывно связаны с выбором адекватных средств и методов флуоресцентной маркировки клеточных биомолекул. При этом важны как собственно оптические свойства используемых флуорофоров (спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции, квантовый выход и др.), так и адресность этой маркировки, обеспечивающая избирательное мечение целевых биомолекул, и количественная пропорциональность такой маркировки исходному содержанию целевого субстрата — стехиометрическое соотношение. Таким требованиям отвечают флуоресцентные зонды, которыми в зависимости от задачи исследования могут быть как собственно флуорофоры с определенными свойствами (пропидия йодид избирательно и количественно связывается с двуспиральной молекулой ДНК), так и специально созданные надмолекулярные конструкции, в которых молекулы специфического лиганда, играющего роль вектора для адресной маркировки определенных биомолекул (белок аннексин специфически связывается с фосфатидилсерином), предварительно маркируются активным флуорофором. Применение в качестве вектора молекул высокоспецифичных моноклональных антител (МКА), адресно связывающихся с искомыми антигенными детерминантами на поверхности или в цитоплазме анализируемых клеток, практически безгранично расширяет возможности метода цитометрического анализа клеточных популяций. На базе конъюгированных с соответствующими флуорофорами МКА создают иммунофлуоресцентные зонды (ИФЗ) для использования во флуоресцентной, в том числе конфокальной, микроскопии и проточной цитометрии. Однако, несмотря на огромное количество способных к флуоресценции веществ, список флуорофоров, пригодных к использованию в качестве метки в ИФЗ для проточной цитометрии, резко ограничен жесткими требованиями к их физико-химическим и биохимическим свойствам. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции таких веществ должны совпадать с оптическими диапазонами, предусмотренными для этого в конструкции

цитометра; их конъюгирование с МКА не должно существенно изменять их собственных оптических характеристик, а также биологической активности и антигенной специфичности МКА. Желательным, хотя и необязательным, свойством таких веществ должна быть их способность к необратимому (чаще всего ковалентному) связыванию с молекулой МКА. Этим свойством обладают промышленно выпускающиеся активные формы флуорофоров в виде изотиоцианатных производных (FITC), сукцинимидных или малеимидных эфиров (Cy³, Imd-306, Imd-506, Alexa flour), опыт применения которых для создания ИФЗ описан нами ранее [1].

Уникальные спектральные свойства природных белков — фикобилипротеинов фикоэритрина (РЕ) и аллофикоцианина (АРС) сделали их доминирующими маркерами, широко применяющимися для получения ИФЗ на основе МКА [2]. Фикобилипротеины — группа красных и синих пигментов, содержащихся в красных водорослях и цианобактериях и участвующих в процессах фотосинтеза у этих организмов [3]. Хромофорная группа пигмента, называемая фикобилином, ковалентно связана с водорастворимым белком типа глобулина и представляет собой структуру, состоящую из 4 пиррольных колец, но не замкнутых, как в молекуле хлорофилла, а имеющих вид развернутой цепи, не содержащей металла. Молекулы фикобилипротеинов состоят из 2 нековалентно связанных и неидентичных субъединиц α и β , к каждой из которых ковалентно присоединены хромофорные группы: фикоэритробилин или фикоцианолин. Они отличаются рекордными коэффициентами экстинкции и независимостью оптических характеристик от присутствия в растворе тушителей флуоресценции. Квантовый выход флуоресценции у этих веществ очень высок — у В-РЕ он близок к 1,0. Способность фикобилипротеинов к флуоресценции устойчива к «выгоранию», а прямая пропорциональность интенсивности флуоресценции количеству молекул флуорофора создает надежную базу для выполнения количественных измерений. По своей оптической эффективности фикобилипротеины превосходят флуоресцеин в 30 раз, а родамин — в 100 раз (в одинаковых спектральных диапазонах), их флуоресценция мало зависит от pH. Практическое

увеличение чувствительности по сравнению с FITC-мечеными антителами составляет 5–10 раз [4]. PE поглощает сине-зеленый и зеленый свет, а APC — оранжевый и красный свет [5]. Пик абсорбции R-PE — 565 нм, дополнительный пик абсорбции — 498 нм, максимум эмиссии — 573 нм, что позволяет возбуждать флуоресценцию световым лучом стандартного для проточных цитометров аргонного лазера (488 нм) и регистрировать сигнал в канале FL2 (575–595 нм). APC имеет пик абсорбции 652 нм и добавочный пик 625 нм, максимум эмиссии — 657,5 нм. Флуоресценция возбуждается светом гелий-неонового и диодного лазеров (633–635 нм), сигнал регистрируется в канале FL4 (650–670 нм).

В отличие от низкомолекулярных флуорофоров (FITC, Cy³, Alexa fluor) эти природные белки обладают значительной молекулярной массой (ММ), не только сравнимой, но даже превосходящей массу иммуноглобулиновых (Ig) молекул МКА, а также невозможностью их коммерческого выпуска в активной форме, способной к самостоятельному конъюгированию с МКА, в связи с чем для создания конъюгатов «МКА — фикобилипротеин» используются методы белковой химии. Основным подходом для получения таких конъюгатов является использование так называемых бифункциональных агентов. В научной литературе и коммерческих наборах для получения флуоресцентных конъюгатов (фирмы AnaSpec, Biotmax, Abnova и др.) описывается применение 2 основных бифункциональных агентов: сукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата (SMCC) и N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионата (SPDP) [6, 7]. На белковых молекулах при этом в реакцию вовлекаются аминокислоты лизина и аргинина, а также восстановленные до сульфгидрильных групп «дисульфидные мостики» IgG в области «моста» — месте сшивки между собой 2 тяжелых цепей IgG.

Метод I: МКА и молекулу фикобилипротеина модифицируют низкомолекулярными реагентами таким образом, что при совместной инкубации полученных производных образуется комплекс, в котором модифицирующие на I этапе реагенты выступают в роли мостика — спейсера. На I этапе молекулу PE модифицируют по белковым аминокислотам SPDP. На следующем этапе полученный продукт обрабатывают дитиотреитолом (DTT), что приводит к образованию на поверхности молекулы PE сульфгидрильных групп. Параллельно с этим антитела модифицируются SMCC, что приводит к формированию на их поверхностях малеимидных групп. На заключительном этапе полученные производные совместно инкубируются, малеимидные и сульфгидрильные группы взаимодействуют, образуя ковалентную связь (рис. 1).

Метод II: в этой методике химической модификации бифункциональным агентом SMCC подвергается молекула фикобилипротеина по ее свободным аминокислотам. Образовавшееся производное имеет свободные малеимидные группировки, способные ко взаимодействию с сульфгидрильными группами. Для получения таких групп молекулы IgG МКА обрабатывают DTT. Совместная инкубация обоих модифицированных белков приводит к образованию ковалентного конъюгата фикобилипротеина с IgG (рис. 2).

Среди продуктов последней стадии реакции, кроме конъюгата, присутствуют не вступившие в реакцию молекулы фикобилипротеина и МКА, присутствие которых абсолютно недопустимо для последующего использования конъюгата в качестве ИФЗ, поскольку свободный IgG будет конкурентно ингибировать связывание ИФЗ с адресным антигеном, снижая интенсивность флуоресцентного сигнала. Поскольку исходные компоненты реакции конъюгирования имеют собственные ММ 180 кДа (МКА) и 250 кДа (фикобилипротеины), а образовавшийся конъюгат ММ >400 кДа, разделение белковых молекул традиционно проводят методом гель-фильтрации.

Цель настоящей работы — создание ИФЗ на базе конъюгатов МКА серии ICO с фикобилипротеином R-PE двумя альтернативными методами белковой химии.

Материалы и методы

Материалы и оборудование

Флуоресцирующий белок R-PE, бифункциональные агенты SPDP и SMCC, DTT, диметилсульфоксид (DMSO), N-этилмалеимид (Sigma-Aldrich, США); жидкостный хроматограф ÄKTA Purifier-10 и хроматографические колонки для аффинной (HiTrap rProtein G), анионообменной (Mono Q 10/100) и гель-эксклюзионной (Superdex 200 10/300) хроматографии (GE Healthcare Life Sciences, США), мембранные микрофильтры с порами 0,45 и 0,22 мкм, центрифужные мембранные концентраторы Centricon-30, гель-фильтрационные микроколонки PD-10 (Millipore, США); спектрофотометр Ultraspec 3100 pro (Amersham Biosciences, Великобритания); проточный цитометр FACSCalibur (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest, контрольный препарат МКА a-CD4/PE (BD Biosciences, США).

Методы

Моноклональные антитела серии ICO-86 к антигену CD4 и ICO-31 к антигену CD8 Т-лимфоцитов человека выделяли из асцитной жидкости мышей, которым внутрибрюшинно инокулированы продуцирующие эти антитела гибридные клетки, ранее полученные методами гибридомной технологии

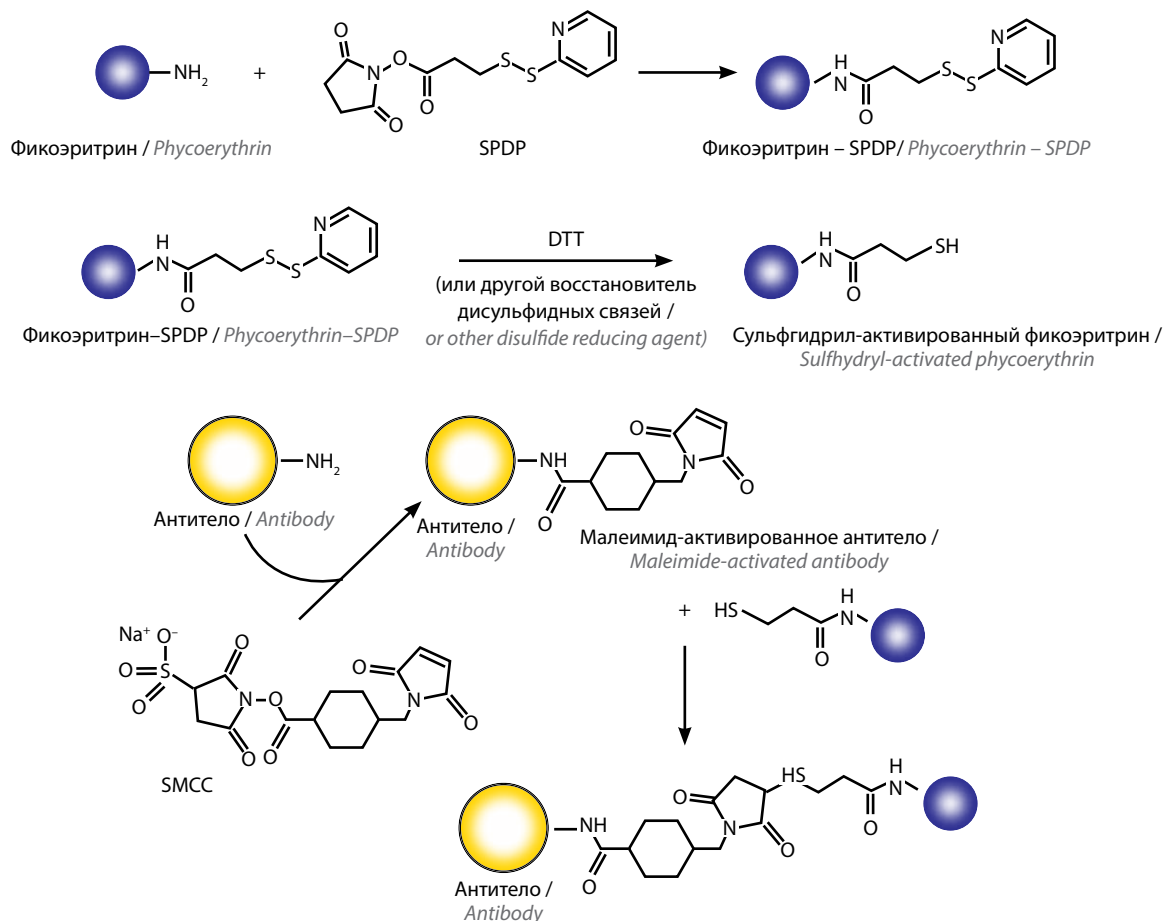


Рис. 1. Получение конъюгата МКА (IgG) с PE по методу I. SPDP – *N*-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат, DTT – дитиотреитол, SMCC – сукцинимидил-4-[*N*-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилат.

Fig. 1. Preparation of Mab conjugates (IgG) with PE by the method I. SPDP stands for *N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate, DTT – dithiothreitol, SMCC – succinimidyl-4-[*N*-maleimidomethyl]cyclohexane-1-carboxylate.

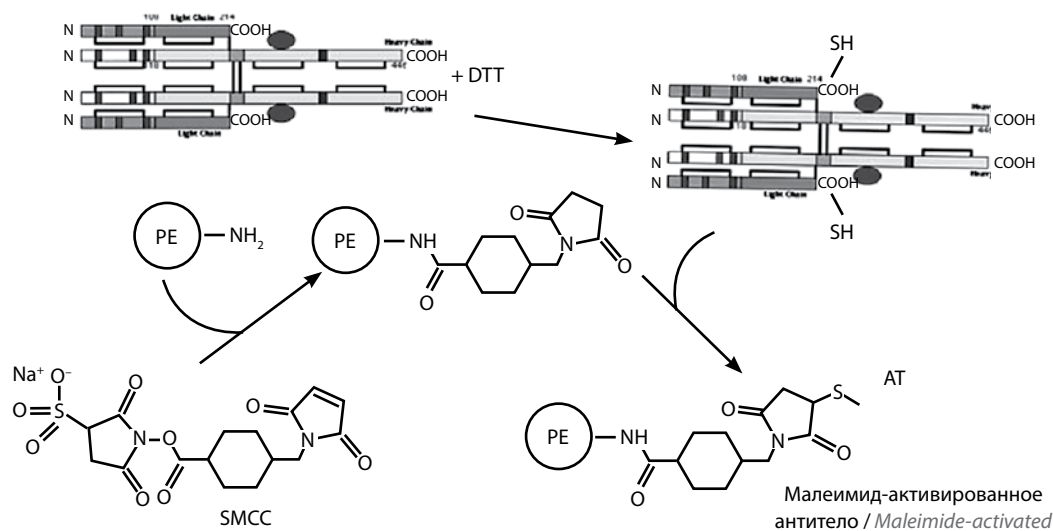


Рис. 2. Получение конъюгата МКА (IgG) с PE по методу II

Fig. 2. Preparation of Mab conjugates (IgG) with PE by the method II

и клонирования. Поскольку для конъюгирования с РЕ требуются высокоочищенные препараты Ig, в настоящей работе для выделения и очистки МКА использовали методы жидкостной хроматографии: на I этапе — аффинное выделение Ig на иммобилизованном белке G или в качестве альтернативы — анионообменную колоночную хроматографию, а на II — освобождение от неполно-сборных фрагментов и молекулярных агрегатов гель-эксклюзионной хроматографией (гель-фильтрацией).

Очистка МКА на иммобилизованном белке G

Центрифугированием 60 мин при угловом ускорении 350 g осветляли 5–10 мл асцитной жидкости, супернатант разводили равным объемом 0,1 М фосфатно-солевого буфера с 0,15 М NaCl, pH 7,4 (PBS) и оставляли на ночь при +4 °C. Надосадочную жидкость после повторного центрифугирования при тех же режимах пропускали через фильтр 0,45 мкм и наносили на колонку HiTrap rProtein G, уравновешенную PBS. Нанесенный на колонку материал тщательно отмывали PBS до значений оптической плотности элюата на выходе из колонки >0,002 ОЕ. После окончания отмывки элюацию Ig проводили буфером 0,1 М глицин-HCl, pH 3,0, собирали выходящие из колонки белковые фракции, немедленно защелачивая их до pH 7,5–8,0 добавлением 1 М Трис-HCl буфера, pH 9,0. Собранные фракции объединяли, переводили в PBS с 1 mM ЭДТА, концентрировали до содержания белка 8–12 мг/мл и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм.

Очистка МКА на анионообменном сорбенте Mono Q

Центрифугированием 60 мин при ускорении 350 g осветляли 5–10 мл асцитной жидкости, к супернатанту при постоянном перемешивании по каплям добавляли равный объем насыщенного при +4 °C водного раствора аммония сульфата и выдерживали 15–20 мин для формирования преципитата. Осадок отделяли центрифугированием 30 мин при ускорении 350 g, растворяли в буфере 0,1 М Трис-HCl с 0,15 М NaCl, pH 8,0 (TBS) и повторяли процедуру высаливания так, как это описано выше. Осадок растворяли в 10 mM Трис-HCl буфере pH 7,8 и наносили на колонку Mono Q 10/100, уравновешенную тем же буфером. Хроматографию проводили на хроматографе ÄKTA Purifier-10 со скоростью потока 1 мл/мин, выход белковых продуктов оценивали денситометрией элюата при 280 нм. После отмывки колонки от не связавшейся белковой фракции на колонку подавали градиент 0–40 % 1 М раствора NaCl в буфере 10 mM Трис-HCl, pH 7,8. Собирали фракции объемом по 1 мл для их последующего анализа методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли на на-

личие IgG и оценки степени чистоты препарата. Фракции, имеющие молекулярную гомогенность >95 %, объединяли, переводили в PBS с 1 mM ЭДТА, концентрировали до содержания белка 8–12 мг/мл и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм.

Очистка препаратов МКА от фрагментов и молекулярных агрегатов гель-эксклюзионной хроматографией

Препараты МКА, полученные описанными выше методами, очищали на гель-эксклюзионной колонке среднего давления Superdex 200 10/300, предварительно откалиброванной с помощью маркеров ММ. На колонку наносили 0,6–1,0 мл раствора МКА в PBS с 1 mM ЭДТА и проводили разделение при скорости потока PBS с 1 mM ЭДТА 0,5 мл/мин. Выход белковых продуктов оценивали денситометрией элюата при 280 нм. Фракции, соответствующие гомогенному препарату IgG, объединяли, концентрировали до содержания белка 8–12 мг/мл и стерилизовали фильтрованием через фильтр 0,22 мкм.

Выделенные и очищенные до гомогенного состояния МКА тестировали в непрямой реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в диапазоне концентраций от 0,1 до 100 мкг/мл для оценки степени сохранения ими иммунологической реактивности и специфичности, после чего использовали иммунореактивные МКА для их конъюгирования с РЕ одним из 2 альтернативных методов. Полученные в результате конъюгирования продукты после их очистки (см. *Результаты*) тестировали в прямой РИФ для оценки качества полученных ИФЗ.

Прямая реакция иммунофлуоресценции

Для выполнения прямой РИФ к образцам (100 мкл) венозной крови здоровых доноров добавляли 20 мкл раствора полученного ИФЗ, инкубировали в течение 20 мин при 18–25 °C, лизировали эритроциты раствором FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США), осаждали клетки центрифугированием (5 мин, 300 g), ресуспендировали и дважды промывали PBS, фиксировали полученные препараты PBS с добавлением 0,4 % формальдегида.

Проточная цитометрия

В работе использован проточный двулучевой цитометр FACS Calibur (BD Bioscience, США) с программным пакетом CellQuest. Возбуждение флуоресценции происходило при прохождении клеткой фокального пятна аргонового лазера (мощность 15 mW, длина волны 488 нм). Флуоресценцию учитывали в спектральном диапазоне 575–595 нм (FL2), соответствующем спектру эмиссии РЕ. Для анализа клеточных популяций учитывали также показатели прямого малоуглового (FSC) и бокового (SSC) светорассеивания,

на основании которых выполняли процедуру гейтирования — программного «выделения» субпопуляции лимфоцитов и дискриминацию из анализа иных клеточных субпопуляций. В каждом образце анализировали 5000 событий в гейте лимфоцитов. Обработку файлов первичных цитометрических данных проводили с использованием программного пакета WinMDI 2.8, находящегося в свободном доступе в сети Интернет. Настройка рабочего протокола анализа выполнена по рекомендациям С.В. Хайдукова [8].

Результаты

Конъюгирование МКА с РЕ выполняли при молярном соотношении компонентов 1 : 2. Для этого отдельно модифицировали оба компонента реакции конъюгирования — РЕ и МКА.

Получение конъюгатов МКА и РЕ с применением I метода синтеза

В 500 мкл раствора PBS с 1 mM ЭДТА растворяли 0,75 мг РЕ, к полученному раствору добавляли 16 мкл раствора SPDP в DMSO с концентрацией 1,33 мг/мл, реакционную смесь инкубировали 2,5 ч при комнатной температуре в обернутой фольгой пробирке на роторном смесителе при постоянном помешивании, после чего в пробирку с реакционной смесью добавляли 30 мкл 0,5 M раствора DTT в PBS с 1 mM ЭДТА и продолжали инкубацию в тех же условиях еще 30 мин.

К 120 мкл раствора МКА в PBS с 1 mM ЭДТА (2,5 мг/мл) добавляли 5 мкл раствора SMCC в DMSO (1,75 мг/мл), реакционную смесь инкубировали 1 ч в темноте при комнатной температуре с периодическим встряхиванием.

После завершения инкубации обоих компонентов модифицированные РЕ и МКА освобождали от непрореагировавших реагентов и низкомолекулярных продуктов гель-фильтрацией на колонках PD-10 (Sephadex-25), элюируя их PBS с 1 mM ЭДТА. Полученные растворы дериватов РЕ и МКА объединяли в 1 пробирку и инкубировали при +4 °C в темноте в течение 16 ч, постоянно помешивая на роторном смесителе. Реакцию конъюгирования останавливали добавлением 40 мкл 0,1 mM раствора N-этилmaleимида в DMSO с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 45 мин. Полученный продукт концентрировали на центрифужном мембранном концентраторе Centricon-30 до объема ≈0,5 мл.

Получение конъюгатов МКА с РЕ с применением II метода синтеза

0,75 мг РЕ растворяли в 500 мкл р-ра PBS с 1 mM ЭДТА, к полученному раствору добавляли 12 мкл раствора SMCC в DMSO с концентрацией 10 мг/мл, реакционную смесь инкубировали 1 ч при комнатной

температуре в обернутой фольгой пробирке на роторном смесителе.

К 60 мкл раствора МКА в PBS с 1 mM ЭДТА (5 мг/мл) добавляли 4 мкл 0,5 M раствора DTT в том же буфере и инкубировали 30 мин при комнатной температуре с периодическим встряхиванием.

После завершения периода инкубации реакцию модифицирования РЕ и МКА останавливали, разделяя ее компоненты гель-фильтрацией на колонках PD-10, оба деривата объединяли в одной пробирке и инкубировали в темноте в течение 16 ч при +4 °C, как это подробно описано выше. Реакцию конъюгирования останавливали добавлением N-этилmaleимида, продукт концентрировали на мембранном концентраторе до объема ≈0,5 мл.

Разделение продуктов конъюгации

Материал, полученный на предыдущих этапах по I и II методикам конъюгирования, наносили на гель-эксклюзионную колонку Superdex 200 10/300, уравновешенную PBS, и проводили хроматографическое разделение продуктов реакции при скорости потока 0,5 мл/мин, детектируя выход продуктов денситометрией при длинах волн 280 и 565 нм. Фракцию, содержащую конъюгат МКА с РЕ (на рис. 3 выделена голубым фоном), собирали и рассчитывали «плотность метки» МКА по формуле:

$$D/P = C_{PE}/C_{IgG},$$

где $C_{PE} = OD_{565}/1960000$,
 $C_{IgG} = (OD_{280} - 0,18 * OD_{565})/203000$.

Оптимальная «плотность метки» должна составлять 0,8–1,6.

После разделения очищенные конъюгаты стабилизируют добавлением раствора бычьего сывороточного альбумина до конечной концентрации 10 мг/мл, консервируют добавлением азида натрия (до 0,1 %) и стерилизуют фильтрацией через фильтр 0,22 мкм.

На рис. 3 показаны хроматографические профили продуктов реакции конъюгирования МКА а-CD4 (IC0-86), выполненной двумя альтернативными методами, полученные при двухволновом режиме детектирования. Видно, что при использовании метода I образуются более высокомолекулярные продукты, что вызывает асимметрию соответствующего хроматографического пика. Соответственно, и средняя «плотность метки» конъюгата, полученного по методу I, составляет 1,4, в то время как для конъюгата, полученного по методу II, она составила 1,1, что приближается к эквимольному соотношению — на 1 молекулу Ig привязана 1 молекула флуорофора.

Для оценки специфической иммунореактивности полученных конъюгатов были произведены серийные

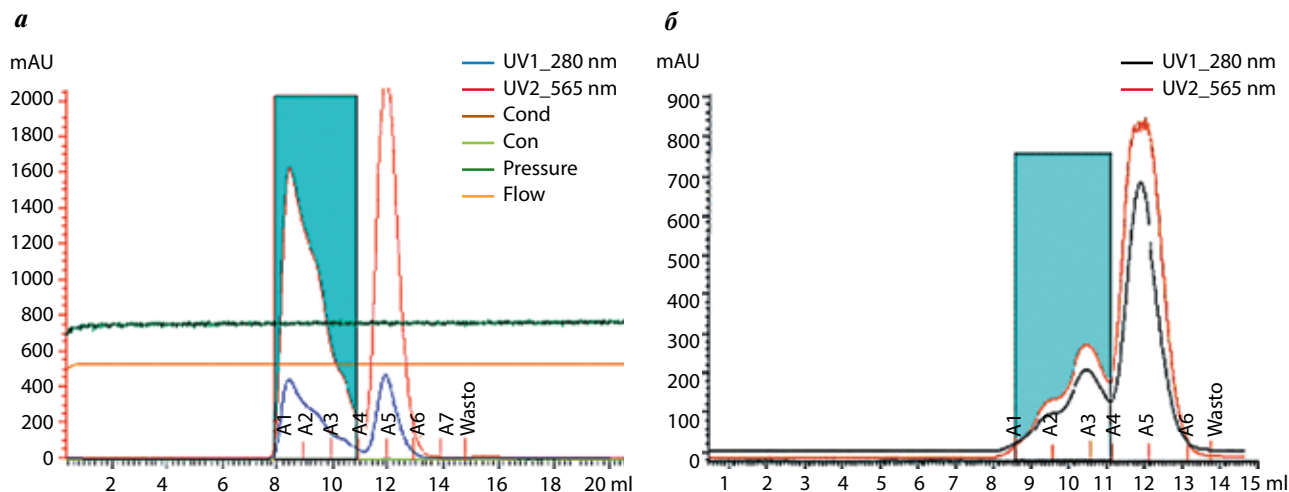


Рис. 3. Хроматограммы разделения продуктов конъюгирования МКА α -CD4 (ICO-86) с PE по методам I (а) и II (б). Голубая область соответствует фракциям, взятым для дальнейшего цитометрического исследования

Fig. 3. Separation chromatograms of ICO-86 conjugation products with PE by the method I (a) and the method II (b). The blue area corresponds to the fractions taken for cytometric analyses (ICO-86-1 and ICO-86-2 respectively)

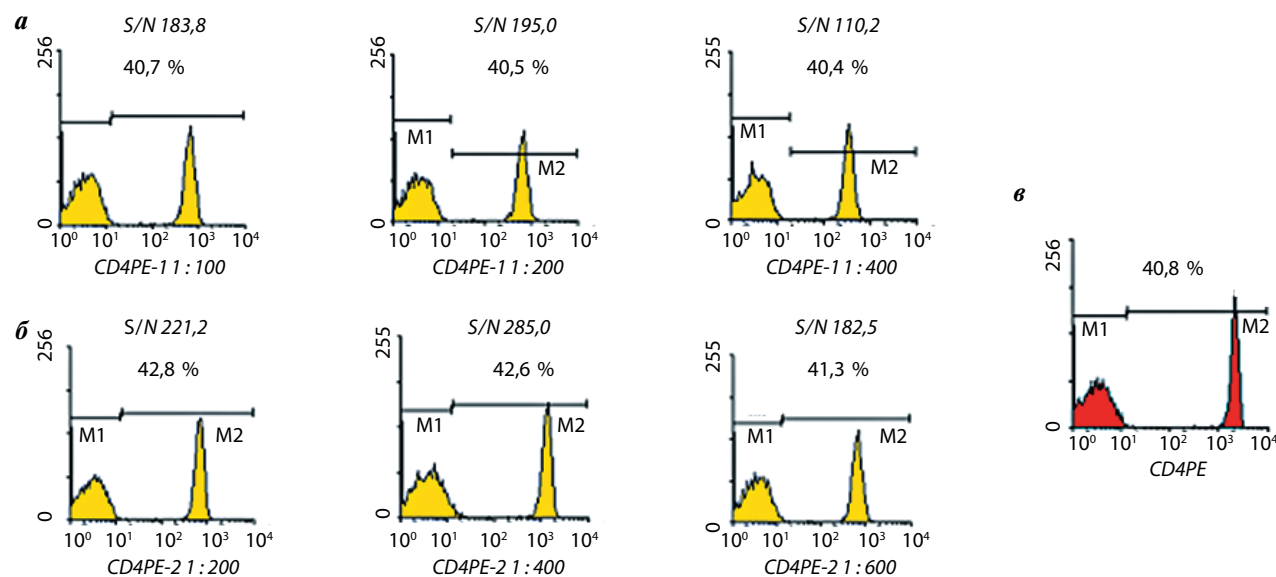


Рис. 4. Гистограммы CD4 положительных клеток, полученные с помощью конъюгатов: а – ICO-86-1 в разведениях 1 : 100, 1 : 200 и 1 : 400; б – ICO-86-2 в разведениях 1 : 200, 1 : 400 и 1 : 600; в – анти-CD4-PE конъюгатом фирмы BD Biosciences в рабочем разведении

Fig. 4. Histograms of CD4 positive cells obtained by conjugates: а – ICO-86-1 in 1 : 100, 1 : 200 and 1 : 400 dilutions; б – ICO-86-2 in 1 : 200, 1 : 400 and 1 : 600 dilutions; в – with anti-CD4-PE conjugat BD Biosciences in the working dilution

разведения обоих препаратов, и полученные растворы использованы для выполнения прямой РИФ с образцами крови здорового донора. На рис. 4 представлены результаты РИФ, учтенные методом проточной цитометрии, для разных разведений исходных конъюгатов, полученных по методам I (обозначено на рисунке как CD4PE-1) и II (CD4PE-2). Видно, что смещение пика специфической флуоресценции (правый пик на каждой гистограмме) влево и, соответственно, снижение соотношения сигнал/шум (обозначено S/N XXX в верхней части каждой гистограммы)

наблюдаются для конъюгатов CD4PE-1 при разведениях $>1 : 200$, а для конъюгатов CD4PE-2 – для разведений $>1 : 400$, следовательно, именно такие значения предельных разведений, после которых результаты цитометрического анализа начинают искажаться (снижается регистрируемая интенсивность специфической флуоресценции), следует принимать за рабочий титр соответствующих реагентов. В нижней части рис. 4 представлена гистограмма цитометрического анализа того же образца крови с использованием в качестве ИФЗ контрольного

препарата МКА а-CD4/РЕ (BD Biosciences, США) — количественные результаты измерения доли CD4-позитивных клеток, выявленные с применением созданных в рамках настоящей работы ИФЗ и контрольного коммерческого реагента, полностью совпадают.

Таким образом, оба метода конъюгирования МКА с РЕ позволяют получать ИФЗ, пригодные для исследований клеточных популяций методом проточной цитометрии, однако по полученным результатам (более низкий уровень включения метки, близкий к эквимолярному, более высокий иммунометрический титр конечного продукта, более высокое соотношение сигнал/шум) позволяет отдать предпочтение методу II.

Поскольку описанная методика получения ИФЗ с использованием РЕ в качестве флуорофора представляется значительно более громоздкой в сравнении с применением для тех же целей низкомолекулярных активных флуоресцентных красителей, возникает вопрос о целесообразности столь тщательной предварительной очистки МКА перед выполнением реакции конъюгирования.

Для оценки важности тщательной очистки исходных МКА перед их конъюгированием с РЕ использовали МКА а-CD8 (ICO-31), выделенные из асцитной жидкости мышей методом сульфатного осаждения с последующей анионообменной хроматографией на колонке Mono Q. В результате реализации предпочтительного метода II конъюгирования на выходе процесса получили продукт с невысокой

«плотностью метки» ($<0,8$) и показывающий низкий рабочий титр ИФЗ ($<1 : 50$). Те же самые препараты МКА, дополнительно очищенные гель-эксклюзионной хроматографией на колонке Superdex 200 10/300, так же как МКА того же клона, выделенные из асцитной жидкости на аффинном сорбенте HiTrap rProtein G, после выполнения конъюгирования с РЕ по методике II показали сопоставимые результаты: «плотность метки» конъюгатов составила 1,1 и 1,2 соответственно, а рабочий титр обоих реагентов был равен $1 : 200$.

Вместе с тем отдельные из используемых нами клонов МКА не выдерживали процедуры аффинной очистки на белке G, утрачивая специфическую иммунореактивность в процессе кислотной элюции, что следует учитывать при выборе метода для работы с каждым конкретным клоном МКА.

Заключение

Для создания ИФЗ на базе МКА серии ICO применимы оба приведенных метода конъюгирования МКА с РЕ, однако метод II, при котором химической модификации бифункциональным агентом SMCC подвергается только молекула РЕ по ее свободным аминогруппам, а молекула Ig сохраняется в максимально нативном состоянии, исключая дозированное восстановление части дисульфидных групп, является предпочтительным. Предварительная тщательная многостадийная очистка МКА позволяет в лабораторных условиях получить продукт, не уступающий по своим аналитическим характеристикам зарубежным коммерческим аналогам.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Копырулина М.Е., Захарова Е.Н., Заботина Т.Н. и др. Технология создания и свойства иммунофлуоресцентных зондов с меткой Alexa-488 для анализа клеточных популяций методом проточной цитометрии. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):70–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-70-75. [Kopyulina M.E., Zakharova E.N., Zabolina T.N. et al. The technology of creation and quality testing of immunofluorescent probes with dye Alexa-488 for analysis of cellular populations by flow cytometry. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):70–5/ (In Russ.)].
2. Parks D.R., Herzenberg L.A. Fluorescence-activated cell sorting: theory, experimental optimization, and application in lymphoid cell biology. Methods Enzymol 1984;108:197–241. DOI: 10.1016/s0076-6879(84)08086-1.
3. Oi V.T., Glazer A.N., Stryer L. Fluorescent phycobiliprotein conjugates for analyses of cells and molecules. J Cell Biol 1982;93(3):981–6. DOI: 10.1083/jcb.93.3.981.
4. Kronick M.N., Grossman P.D. Immunoassay techniques with fluorescent phycobiliprotein conjugates. Clin Chem 1983;29(9):1582–6.
5. Haugland R.P. Handbook of fluorescent probes and research products. 9th edn. Eugene, OR. Molecular Probes 2002; 1.3.
6. Hardy R.R., Weir D.M., Herzenberg L.A. et al. Purification and coupling of fluorescent proteins for use in flow cytometry. In: Handbook of Experimental Immunology, 4th edn. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1986.
7. Mahmoudian J., Jeddi-Tehrani M., Hodjattallah Rabbani H. Conjugation of r-phycoerythrin to a polyclonal antibody and f(ab')₂ fragment of a polyclonal antibody by two different methods. Avicenna J Med Biotechnol 2010;2(2):87–91.
8. Хайдуков С.В. Подходы к стандартизации метода проточной цитометрии для иммунофенотипирования. Настройка цитометров и подготовка протоколов для анализа. Медицинская иммунология 2007;9(6):569–74. [Khaidukov S.V. Approaches to standardization of the flow cytometry method for cells immunophenotyping. Cytometers adjustment and preparation of protocols for analysis. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2007;9(6):569–74. (In Russ.)].

Вклад авторов

А.С. Гриневич: получение иммунофлуоресцентных зондов, обзор публикаций по теме статьи;

М.Н. Краева: получение препаратов очищенных моноклональных антител;

Е.Н. Захарова: оценка специфической активности иммунофлуоресцентных зондов методом проточной цитометрии, обзор публикаций по теме статьи, написание рукописи статьи;

Д.Ю. Блохин: анализ данных, написание рукописи статьи;

П.К. Иванов: разработка дизайна исследования.

Author's contributions

A.S. Grinevich: preparation of immunofluorescent probes, literature review;

M.N. Kraeva: preparation of purified monoclonal antibodies;

E.N. Zakharova: evaluation of specific activity of immunofluorescent probes using flow cytometry, literature review, manuscript preparation;

D.Yu. Blokhin: data analysis, manuscript preparation;

P.K. Ivanov: study design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Е.Н. Захарова/E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

Д.Ю. Блохин/D.Yu. Blokhin: <https://orcid.org/0000-0002-4322-8430>

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: 22.02.2019. Принята к печати: 05.08.2019.

Article received: 22.02.2019. Accepted for publication: 05.08.2019.

ЭКСПРЕССИЯ БЕТА-III ТУБУЛИНА В ТКАНИ РАКА ПИЩЕВОДА И ОКРУЖАЮЩЕЙ МОРФОЛОГИЧЕСКИ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ

И.А. Мамичев¹, Т.А. Богущ¹, Е.А. Богущ¹, А.Н. Гришанина¹, Н.О. Вихлянцева¹,
Н.С. Сапрыкина¹, А.А. Каменский²

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

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские Горы, 1

Контакты: Иван Андреевич Мамичев Mamichev99@gmail.com

Введение. Белок микротрубочек бета-III тубулин (TUBB3) в норме не экспрессируется в эпителиальных клетках, но присутствует во многих опухолях эпителиального происхождения. Мы предположили, что выявление экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной ткани за пределами первичной опухоли может использоваться для молекулярной диагностики местной распространенности опухолевого процесса, что особенно важно для локально рецидивирующих опухолей, в частности, для рака пищевода.

Цель исследования — количественная оценка экспрессии TUBB3 в опухолевой и окружающей морфологически нормальной ткани пищевода, прилежащей к опухоли и отдаленной от нее.

Материалы и методы. Методом проточной иммуноцитофлуориметрии исследована экспрессия белка TUBB3 в хирургических биопсийных образцах рака пищевода и морфологически нормальной ткани органа 40 оперированных больных.

Результаты. Экспрессия TUBB3 выявлена в 35 из 40 исследованных образцов рака пищевода, в 10 из 13 образцов прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани пищевода и в 25 из 40 образцов максимально удаленной от опухоли ткани пищевода вблизи края резекции. В подавляющем большинстве случаев уровень и интенсивность экспрессии TUBB3 у каждого больного в опухоли превышали те же показатели в отдаленной морфологически нормальной ткани. Показано, что в ряду «норма → норма вблизи опухоли → опухоль» экспрессия TUBB3 растет, т.е. прослеживается положительный градиент уровня и интенсивности экспрессии белка по мере приближения к опухоли.

Заключение. Экспрессия ассоциированного с опухолевым ростом белка TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на молекулярную вовлеченность в опухолевый процесс визуально нормальной ткани органа и может использоваться в качестве дополнительного показателя при стадировании заболевания и определении тактики послеоперационного ведения пациентов.

Ключевые слова: рак пищевода, бета-III тубулин, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-48-52

BETA-III TUBULIN EXPRESSION IN ESOPHAGEAL CANCER AND ADJACENT MORPHOLOGICALLY NORMAL TISSUE

I.A. Mamichev¹, T.A. Bogush¹, E.A. Bogush¹, A.N. Grishanina¹, N.O. Vikhlyantseva¹, N.S. Saprykina¹, A.A. Kamenskiy²

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

²Lomonosov Moscow State University; GSP-1, Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Introduction. Beta-III tubulin (TUBB3), the structural protein of microtubules, is not expressed in normal epithelium, but is frequently present in different epithelial tumors. We suggested that the screening for TUBB3 in morphologically normal tissue outside the tumor may be used for the molecular diagnostics of the local spread of cancer, which is particularly significant in case of the tumors with a high rate of local recurrence, like esophageal cancer.

Objective. The quantitative assessment of TUBB3 expression in tumor and morphologically normal esophageal tissue adjacent and remote from the tumor.

Materials and methods. The expression of TUBB3 in surgical biopsy specimens of tumor and morphologically normal tissue derived from 40 patients after radical surgery for esophageal cancer was measured by immunocytometry.

Results. TUBB3 expression was detected in 35 out of 40 studied samples of esophageal cancer, as well as in 10 out of 13 samples of morphologically normal esophagus tissue adjacent to the tumor, and in 25 out of 40 samples of esophagus tissue most distant from the tumor near the resection edge. It was shown that the expression of TUBB3 in tissue specimens increases as follows: “normal tissue → adjacent normal tissue → tumor”, which basically means the existence of a positive gradient of TUBB3 expression level and intensity towards the tumor.

Conclusion. The expression of TUBB3, a protein associated with tumor growth, outside the primary tumor may indicate that the tissue appearing to be normal is already affected by the malignancy. It can be used as an additional factor in tumor staging and post-operative patient management.

Key words: esophageal cancer, β III-tubulin, flow cytometry

Введение

Бета-тубулины — семейство белков, входящих в состав микротрубочек: у позвоночных известно как минимум 9 изоформ бета-тубулина, которые кодируются разными генами и экспрессируются в разных тканях.

В злокачественных опухолях часто экспрессируются нетипичные для исходной ткани изоформы бета-тубулина. В частности, белок бета-III тубулин (TUBB3), который в норме присутствует только в нейронах, меланоцитах, эндотелиоцитах и макрофагах, экспрессируется многими опухолями эпителиального происхождения [1]. TUBB3 связан с устойчивостью к препаратам из группы таксанов [2], а также обеспечивает выживание опухолевых клеток в неблагоприятном микроокружении и, возможно, увеличивает метастатический потенциал опухоли [3].

Поскольку TUBB3 в норме отсутствует в большинстве тканей, мы предположили, что выявление его в морфологически нормальной ткани за пределами опухоли может быть использовано для молекулярной диагностики местной распространенности опухолевого процесса. Обнаружение TUBB3-позитивных клеток за пределами опухоли будет указывать на большую распространенность болезни [4].

Молекулярная диагностика локальной распространенности особенно важна для опухолей, характеризующихся частым местным рецидивированием, в частности, для рака пищевода — высокоагрессивной опухоли с крайне неблагоприятным прогнозом. Даже после радикальной операции в течение года у 20 % больных диагностируются местные рецидивы опухоли [5].

Цель исследования — количественная оценка экспрессии ассоциированного с опухолевым ростом белка TUBB3 в опухолевой и окружающей морфологически нормальной ткани пищевода, прилежащей к опухоли и отдаленной от нее.

Материалы и методы

Изучены хирургические биопсийные образцы рака пищевода и морфологически нормальной ткани 40 больных. У каждого больного охарактеризована экспрессия TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани, удаленной от первичного очага. Дополнительно у 13 пациентов исследован материал ткани пищевода, непосредственно прилежащей к опухоли. Суммарно исследовано 93 образца.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии TUBB3 проведен с помощью непрямой реакции иммунофлуоресценции на проточном цитофлуориметре. Ранее метод проточной цитофлуориметрии, традиционно применяемый в исследованиях биологических жидкостей и клеток *in vitro*, был адаптирован для изучения солидных опухолей человека. Кратко: в процессе пробоподготовки хирургические биопсийные образцы переводят в одноклеточную суспензию и фиксируют 10 % раствором нейтрального формалина [6].

Для определения TUBB3 использованы первичные мышинные моноклональные антитела (ab7751, клон TU-20, Abcam, Великобритания), специфичные к фрагменту aa441–448 последовательности белка TUBB3 в конечной концентрации 0,16 мкг/мл. В качестве вторичных антител использованы козы антимышинные поликлональные антитела, конъюгированные с красителем DL650 (ab98729, Abcam, Великобритания) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Инкубацию клеток с антителами проводили в темноте при 4 °C в течение 15–20 ч (ночь). После инкубации суспензию клеток отмывали 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) в фосфатном буфере (pH 7,4), добавляли вторичные антитела и инкубировали в течение 1,5 ч при 4 °C. Для выведения из анализа дебриса и эритроцитов после завершения инкубации с вторичными антителами клетки инкубировали в течение 15 мин со специфическим красителем ДНК Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, США) в концентрации 1,2 мкг/мл. После окончания инкубации пробы дважды отмывали раствором BSA.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США) с применением программного обеспечения Navios Software. Исследованы 2 показателя экспрессии белка: 1) уровень экспрессии — доля специфически флуоресцирующих клеток, выраженная в процентах, и 2) интенсивность экспрессии — средняя интенсивность флуоресценции всех клеток за вычетом автофлуоресценции (Δ MF1, в у. е.). Для попарных сравнений использован одновыборочный критерий Вилкоксона с поправкой на множественные сравнения.

Результаты и обсуждение

Экспрессия TUBB3 зарегистрирована в большинстве исследованных образцов рака пищевода. При этом отмечена значительная гетерогенность уровня

Количественные показатели нормальной и злокачественной ткани пищевода

Quantitative data of TUBB3 expression in normal and malignant esophageal tissue

Группы сравнения Comparison groups	Минимум Minimum	Нижний квартиль Lower quartile	Медиана Median	Верхний квартиль Upper quartile	Максимум Maximum
	Уровень экспрессии TUBB3 (%) TUBB3 expression level (%)				
Норма, $n = 40$ Norm, $n = 40$	3	13	21	31,5	75
Норма вблизи опухоли, $n = 13$ Norm near the tumor, $n = 13$	6	15,5	31	45	56
Опухоль, $n = 40$ Tumor, $n = 40$	7	22	36	51	60
	Интенсивность экспрессии TUBB3 (у. е.) TUBB3 expression intensity (conventional unit)				
Норма, $n = 40$ Norm, $n = 40$	3	7	15,5	22	65
Норма вблизи опухоли, $n = 13$ Norm near the tumor, $n = 13$	2	7,5	13	32,5	76
Опухоль, $n = 40$ Tumor, $n = 40$	0	19	31	56	184

экспрессии маркера в опухоли у разных пациентов: минимальное значение уровня экспрессии TUBB3 – в 7 % клеток, максимальное – в 60 %, медиана – 36 %, а половина всех значений заключена в интервале от 22 до 51 %. Та же закономерность проявляется при анализе интенсивности экспрессии TUBB3 (см. таблицу).

Неожиданным оказалось обнаружение TUBB3 в морфологически нормальной ткани пищевода, как удаленной от первичной опухоли, так и непосредственно прилежащей к ней. Экспрессия TUBB3 в этих группах также оказалась неоднородной: минимальный уровень экспрессии – в 3 % клеток, максимальный – 75 %, медиана – 21 %, половина всех значений заключена в интервале от 13 до 31,5 %. Полностью количественные характеристики экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани пищевода приведены в таблице.

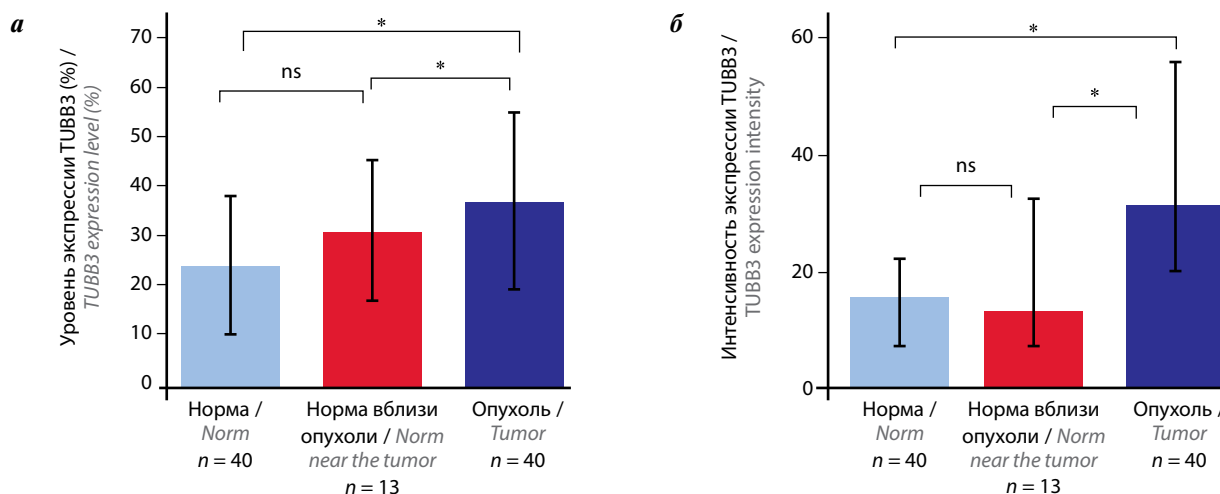
Отдельная проблема, требующая пристального внимания, – определение пороговых значений экспрессии TUBB3 в опухоли, ниже которых ее можно считать негативной. Как уже упоминалось, белок TUBB3 не выявляется в большинстве нормальных клеток пищевода, однако существуют данные, согласно которым белок экспрессируется в базальных клетках [7]. Эти клетки, несомненно, присутствуют в исследуемых суспензионных образцах, и при этом известно, что в ткани пищевода на базальный слой у человека приходится около 15 % всей толщины эпителия [8]. В связи с этим мы приняли пороговый уровень экспрессии TUBB3 равным 15 %.

С учетом выбранного порогового значения экспрессии TUBB3 выявлена в 87,5 % исследованных образцов рака пищевода (35 из 40). В прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани пищевода экспрессия TUBB3 выявлена в 76,9 % образцов (10 из 13). В удаленной от опухоли морфологически нормальной ткани пищевода – в 62,5 % образцов (25 из 40).

Важно отметить, что у 95 % больных (38 из 40) уровень экспрессии TUBB3 в опухоли был выше, чем в нормальной ткани, а в 90 % случаев (36 из 40) в опухоли была выше и интенсивность экспрессии маркера.

Чтобы оценить статистическую силу наблюдаемых различий экспрессии TUBB3 в опухолевом узле и морфологически нормальной ткани на разном отдалении от него, проведено попарное сравнение показателей экспрессии TUBB3 в 3 связанных группах с введением поправки на множественные сравнения. Результаты представлены на рисунке.

Видно, что в ряду «норма → норма вблизи опухоли → опухоль» экспрессия TUBB3 растет, т. е. прослеживается положительный градиент уровня и интенсивности экспрессии белка по мере приближения к опухоли. Статистически значимые различия по уровню и интенсивности экспрессии TUBB3 выявлены как между опухолевой и отдаленной морфологически нормальной тканью пищевода, так и между опухолью и непосредственно прилежащей к ней нормальной тканью. В то же время разница показателей экспрессии TUBB3 в морфологически нормальной



Количественные показатели экспрессии TUBB3 в нормальной и опухолевой ткани пищевода: а – уровень экспрессии; б – интенсивность экспрессии. *Различия статистически значимы; ns – различия статистически незначимы

Quantitative indicators of TUBB3 expression in normal and tumor tissue of the esophagus: а – expression level; б – expression intensity. *Differences are statistically significant; ns – differences are not statistically significant

ткани на разном отдалении от опухоли оказалась статистически незначимой. Последнее, впрочем, может быть обусловлено малым количеством образцов прилежащей к опухоли морфологически нормальной ткани, и результаты требуют дальнейшего уточнения.

Заключение

Впервые с использованием строго количественного метода показано, что в морфологически нормальной ткани пищевода, пораженного опухолевым процессом, выявляется ассоциированный с опухолевым ростом молекулярный маркер TUBB3. Экспрессия белка в морфологически нормальной ткани пищевода всегда ниже, чем в опухоли, и варьирует в широких пределах: от 3 до 75 % клеток, экспрессирующих TUBB3.

Учитывая, что экспрессия TUBB3 в норме нехарактерна для ткани пищевода, полученные данные свидетельствуют о наличии малигнизированных кле-

ток за пределами первичной опухоли – в окружающей морфологически нормальной ткани. Это может отражать наличие «опухолевого поля», т. е. множественных фокусов трансформированных клеток по всему органу, не выявляемых под микроскопом [9], что в свою очередь указывает на молекулярную вовлеченность в опухолевый процесс морфологически нормальной ткани органа. Аналогичные результаты были получены нами ранее при сравнительной оценке количественных показателей экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого и окружающей морфологически нормальной ткани органа [10].

Мы считаем, что экспрессия TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на молекулярную вовлеченность в опухолевый процесс визуально нормальной ткани органа и может использоваться в качестве дополнительного показателя при стадировании заболевания и определении тактики послеоперационного ведения пациентов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003;55(2):77–96. DOI: 10.1002/cm.10116.
- Jordan A., Hadfield J.A., Lawrence N.J. et al. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 1998;18(4):259–96. DOI: 10.1002/(SICI)1098-1128(199807)18:4<259::AID-MED3>3.0.CO;2-U.
- Ludueña R.F. A hypothesis on the origin and evolution of tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;302:41–185. DOI: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9.
- Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А. и др. Белок микротрубочек βIII-тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках. Антибиотики и химиотерапия 2018;63(7–8):79–90. [Mamichev I.A., Bogush T.A., Bogush E.A. et al. Microtubule Protein βIII-Tubulin: Structure, Expression and Functions in Normal and Tumor Cells. *Antibiotiki i khimioterapiya* = Antibiotics and Chemotherapy 2018;63(7–8):79–90. (In Russ.)].
- Скворцов М.Б. Рак пищевода: хирургическое лечение. Сибирский медицинский журнал 2011;4:21–30. [Skvortsov M.B. Esophageal Cancer: Surgical Treatment. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal* = The Siberian Medical Journal 2011;4:21–30. (In Russ.)].
- Шатурова А.С., Богуш Т.А., Дудко Е.А. и др. Экспрессия эстрогеновых

- рецепторов β и β_1 в ткани немелкоклеточного рака легкого человека. Антибиотики и химиотерапия 2012;57(5–6):11–7. [Shaturova A.S., Bogush T.A., Dudko E.A. et al. Expression of Estrogen Receptors α and β in Tissue of Human Non-Small Cell Lung Cancer. Antibiotiki i khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy 2012;57(5–6):11–7. (In Russ.)].
7. Person F., Wilczak W., Hube-Maqq C. et al. Prevalence of β III-tubulin (TUBB3) expression in human normal tissues and cancers. Tumor Biol 2017;39(10):1–11. DOI: 10.1177/1010428317712166.
8. Быков В.Л., Исеяева Е.А. Функциональная морфология покровного эпителия слизистой оболочки пищевода. Морфология 2006;129(3):7–21. [Bykov V.L., Iseyeva Ye.A. Functional Morphology of the Surface Epithelium of Esophageal Tunica Mucosa. Morfologiya = Morphology 2006;129(3):7–21. (In Russ.)].
9. Garcia S.B., Park H.S., Novelli M., Wright N.A. Field cancerization, clonality, and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. J Pathol 1999;187(1):61–81. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<61::AID-PATH247>3.0.CO;2-I.
10. Мамичев И.А., Богущ Т.А., Дудко Е.А. и др. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии бета-III тубулина в опухолевой и окружающей нормальной ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):16–8. [Mamichev I.A., Bogush T.A., Dudko E.A. et al. Immunofluorescent Analyses of Tumor Marker Beta-III Tubulin Expression in Tumor and Adjacent Normal Lung Tissue Derived from Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(2):16–8. (In Russ.)].

Вклад авторов

И.А. Мамичев, Т.А. Богущ: анализ данных, написание текста статьи;
Е.А. Богущ: получение данных для анализа;
А.Н. Гришанина, Н.О. Вихлянцева: обзор публикаций по теме статьи;
А.А. Каменский: разработка плана, дизайна статьи;
Н.С. Сапрыкина: перевод, оформление статьи.

Author's contributions

I.A. Mamichev, T.A. Bogush: data analyses, article writing;
E.A. Bogush: obtaining data for analysis;
A.N. Grishanina, N.O. Vikhlyantseva: reviewing of publications of the article's theme;
A.A. Kamenskiy: developing of the plan and design of the article;
N.S. Saprykina: translation and design of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

И.А. Мамичев/I.A. Mamichev: <https://orcid.org/0000-0002-6776-4502>
Т.А. Богущ/T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
Е.А. Богущ/E.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0001-5601-3669>
А.Н. Гришанина/A.N. Grishanina: <https://orcid.org/0000-0002-4277-9222>
Н.О. Вихлянцева/N.O. Vikhlyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-1372-2980>
Н.С. Сапрыкина/N.S. Saprykina: <https://orcid.org/0000-0003-3378-895X>
А.А. Каменский/A.A. Kamenskiy: <https://orcid.org/0000-0003-4912-922X>

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

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

Статья поступила: 23.01.19. Принята в печать: 05.08.2019.
Article received: 23.01.19. Accepted for publication: 05.08.2019.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ОРМУСТИНА НА СОБАКАХ

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

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

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

Введение. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина проведены доклинические токсикологические исследования ормустина — нового противоопухолевого препарата из класса нитрозоалкилмочевин. В работе представлены результаты изучения субхронической токсичности ормустина на собаках.

Цель исследования — изучение субхронической токсичности ормустина на собаках при ежедневном 3-кратном внутривенном введении.

Материалы и методы. Исследование проведено на 12 собаках породы английский бигль, самцах и самках. Ормустин вводили внутривенно ежедневно 3-кратно в суммарных дозах 1, 5, 10, 20 и 30 мг/кг. В ходе эксперимента проводили клинико-лабораторные исследования, а также патоморфологическое исследование для изучения повреждающего действия ормустина на органы и ткани.

Результаты. Ормустин в дозах 20 и 30 мг/кг вызывал гибель животных на 7-е и 8-е сутки наблюдения на фоне выраженной гемато- и гастроинтестинальной токсичности. У собак, получавших препарат во всех дозах, наблюдались внешние проявления интоксикации и изменения поведенческих реакций, снижение массы тела в течение всего срока наблюдения. Установлено, что препарат оказывает дозозависимое миелосупрессивное действие. Ормустин вызывает выраженные морфологические изменения разной степени обратимости в тонкой кишке, почках, щитовидной железе, печени, лимфатических узлах, селезенке, сердце и гонадах, менее выраженные — в толстой кишке, желудке и мочевом пузыре.

Выводы. По результатам исследования суммарные дозы ормустина 20 и 30 мг/кг охарактеризованы как летальные, 5 и 10 мг/кг — высокие токсические, 1 мг/кг — низкая токсическая доза.

Ключевые слова: ормустин, производное нитрозомочевины, доклиническое исследование, токсичность, лабораторные собаки

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-53-62

PRE-CLINICAL STUDY OF SUBCHRONIC TOXICITY OF ORMUSTINE IN DOGS

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

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

Introduction. In N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology were made preclinical toxicological studies of ormustine, a new antitumor drug from the class of nitrosoureas. The paper presents some results of study the subchronic toxicity of ormustine in dogs.

Objective. The objective of the present study was to investigate the subchronic toxicity of ormustine on dogs with a daily intravenous administration during 3 days.

Materials and methods. The study was performed in 12 dogs of the English beagle breed of males and females. Ormustine was administered intravenously daily during 3 days in total doses of 1, 5, 10, 20 and 30 mg/kg. During the experiment, to study the damaging effect of ormustin on organs and tissues, clinical and lab tests and pathomorphological examinations were performed.

Results. Ormustin in doses of 20 and 30 mg/kg caused the death of animals on the 7th and 8th day of observation against the background of severe hemato- and gastrointestinal toxicity. In dogs receiving the drug in all doses, there were external manifestations of intoxication and changes in behavioral reactions, weight loss during the entire observation period. It was found that the drug had a dose-related myelosuppressive effect. Ormustin caused pronounced morphological changes of varying degrees of reversibility in the small intestine, kidneys, thyroid gland, liver, lymph nodes, spleen, heart and gonads; less pronounced — in the large intestine, stomach and bladder.

Conclusion. According to the study, the total doses of ormustine 20 and 30 mg/kg were characterized as lethal, 5 and 10 mg/kg — high toxic, 1 mg/kg — low toxic dose.

Key words: ormustine, derivative of nitrosourea, preclinical study, toxicity, laboratory dogs

Введение

По данным за 2016 г., в структуре смертности населения России онкологические заболевания занимают 2-е место после болезней сердечно-сосудистой системы [1]. У детей в числе солидных злокачественных новообразований лидируют опухоли центральной нервной системы, в частности, самыми распространенными считаются глиомы [2].

В качестве химиотерапевтической составляющей лечения некоторых разновидностей рака мозга, меланомы, а также других нозологий используют препараты из группы нитрозомочевин [3–4]. Один из представителей этого класса — ормусти́н, синтезированный в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН, может оказаться полезным в терапии перечисленных заболеваний [5]. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина разработана лекарственная форма — ормусти́н, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг [6], проведены ее доклинические исследования [7, 8]. Установлено, что препарат по сравнению с ближайшим его аналогом лизомустином в большей степени накапливается в опухолевых тканях, мозге, легких и других органах [9]. В лаборатории фармакологии и токсикологии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина было проведено полное доклиническое токсикологическое исследование препарата [10, 11]. В данной статье приведены результаты заключительной части исследования — изучения субхронической токсичности ормустина на собаках.

Цель исследования — доклиническое изучение субхронической токсичности нового противоопухолевого препарата ормусти́н на собаках.

Материалы и методы

Исследования выполнены в соответствии с отечественными и международными требованиями [12, 13]. Работа проведена на здоровых собаках породы английский бигль, самцах и самках, полученных из разведения Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Ормусти́н использовали в лиофилизированной лекарственной форме, вводили в рекомендованной концентрации (растворитель — 5 % раствор глюкозы) внутривенно ежедневно 3-кратно в 3 дозы, рассчитанных, исходя из опытов по острой и субхронической токсичности на мелких лабораторных животных при пересчете на собак: суммарные дозы 10, 20 и 30 мг/кг. Однако животные оказались высокочувствительными к ормусти́ну. Две собаки после применения препарата в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг пали на 8-е и 7-е сутки соответственно после окончания введения, в связи с чем было принято решение об элиминации доз до 1 и 5 мг/кг и постановке II этапа

эксперимента. Таким образом, в данной статье представлены обобщенные результаты изучения субхронической токсичности ормустина на 12 собаках в 5 суммарных дозах (1, 5, 10, 20 и 30 мг/кг). День последнего введения принимали за 0. Дизайн исследования представлен в табл. 1.

Критериями оценки субхронической токсичности были сроки гибели и число павших животных, поведенческие реакции, масса тела животных, клиническая картина интоксикации, данные клинико-лабораторных исследований (клинический и биохимический анализы крови, электрокардиограмма), аутопсии павших и выведенных из эксперимента животных с макроскопической и гистологической оценками.

Оценивали действие ормустина на периферическую кровь, функциональное состояние сердечно-сосудистой системы, печени, почек, желудочно-кишечного тракта. Предварительно определяли фоновые показатели, считая результаты, полученные для каждой собаки, контрольными. Полученные в ходе эксперимента данные сравнивали с контрольными значениями и нормами.

По результатам исследования субхронической токсичности на собаках устанавливали уровни токсических доз, а именно дозы, вызывающие значительные токсические изменения в органах и тканях (высокие токсические дозы), слабые незначительные изменения (низкие токсические дозы) и не вызывающие нарушений в органах и тканях (высокие нетоксические дозы).

Результаты и обсуждение

При доклинических токсикологических исследованиях ормустина установлено, что препарат, примененный в суммарных дозах 20 и 30 мг/кг, вызывал гибель животных (см. табл. 1). У собак, получивших препарат во всех дозах, были отмечены внешние проявления интоксикации и изменение поведенческих реакций на протяжении эксперимента. Так, непосредственная реакция животных на введение ормустина независимо от величины примененной дозы проявлялась состоянием оглушенности, дезориентацией и адинамией в течение 2–3 ч после инъекции. Помимо этого, у некоторых собак применение препарата в дозе 5 мг/кг вызывало дефекацию, мочеиспускание и рвотные позывы, а в дозах 10–30 мг/кг — однократную или многократную рвоту. В течение всего курса введения ормустина и 1 суток после его окончания животные не проявляли обычной активности.

У собак, получивших препарат во всех дозах, отмечали внешние признаки гастроинтестинальной токсичности: уменьшение массы тела с 3–14-х суток на 5–35 %, в дозах 10–30 мг/кг — ухудшение аппетита, сохранявшееся до конца срока наблюдения, и жидкий

Таблица 1. Дизайн исследования субхронической токсичности ормустина на собаках

Table 1. Design of ormustine subchronic toxicity study on dogs

№ группы Group №	Суммарная доза, мг/кг Total dose, mg/kg	Разовая доза, мг/кг Single dose, mg/kg	Режим и путь введения Mode and route of administration	Число животных Number of animals		
				Вскрытых на 3-и сутки наблюдения Dissected on the 3 rd day of administration	Вскрытых на 30-е сутки наблюдения Dissected on the 30 th day of administration	Вскрытых на 60-е сутки наблюдения Dissected on the 60 th day of administration
1	1,00	0,33	Внутри- венно, ежедневно в течение 3 дней Intravenously, daily for 3 days	—	2 ♀	1 ♀
2	5,00	1,67		—	2 ♀	1 ♀
3	10,00	3,30		1 ♂	1 ♀	—
4	20,00	6,70		1 ♂	1 ♀ (пала на 8-е сутки) 1 ♀ (died on the 8-th day)	—
5	30,00	10,00		1 ♀	1 ♀ (пала на 7-е сутки) 1 ♀ (died on the 7-th day)	—

Таблица 2. Динамика уровня лейкоцитов в крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 2. Dynamics of the level of leukocytes in the blood of dogs after 3-times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Общее число лейкоцитов (6,0–17,0 тыс. в мм³) Total leukocytes count (6.0–17.0 thousand per mm³)										
1	1/♀	13,1	15,6	13,4	12,1	11,4	10,2	10,9	10,8	8,6
	2/♀	12,9	13,1	8,2	8,5	7,2	6,3	7,6	—	—
	3/♀	16,2	15,8	13,5	16,3	16,6	16,3	16,2	—	—
5	4/♀	8,6	9,4	5,3	4,2	3,3	8,0	9,2	—	—
	5/♀	10,1	10,5	6,5	4,3	6,8	7,6	9,3	—	—
	6/♀	10,5	13,1	7,3	4,3	6,0	6,9	13,9	11,0	12,2
10	7/♂	13,0	16,7	6,5	—	—	—	—	—	—
	8/♀	15,4	14,0	5,3	2,0	4,6	10,1	11,1	—	—
20	9/♂	11,8	12,4	1,4	—	—	—	—	—	—
	10*/♀	11,9	15,3	2,7	2,5	—	—	—	—	—
30	11/♀	7,3	10,2	2,0	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	10,6	9,9	1,7	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

стул у 2 собак на 7-е сутки наблюдения. У всех самок, получивших ормустин в дозах 10–30 мг/кг, на 3-и сутки наблюдения отмечали появление серо-коричневого налета в области петли (предположительно, кандидоза, сохранявшегося до конца эксперимента).

Препарат оказывал влияние на показатели периферической крови животных во всех дозах, вызывая снижение количества лейкоцитов в основном с 3-х суток наблюдения и колебание количества тромбоцитов с 3–7-х суток наблюдения, частично или полностью

Таблица 3. Динамика уровня тромбоцитов в крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 3. Dynamics of the platelet level in the blood of dogs after 3-times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Число тромбоцитов (160—525 тыс. в мм ³) Platelet count (160—525 thousand per mm ³)										
1	1/♀	480	532	512	622	624	548	556	568	486
	2/♀	415	510	149	458	428	460	430	—	—
	3/♀	351	375	367	452	476	484	500	—	—
5	4/♀	418	409	357	331	222	441	402	—	—
	5/♀	327	356	225	218	200	317	372	—	—
	6/♀	420	395	451	312	198	446	458	418	402
10	7/♂	330	445	662	—	—	—	—	—	—
	8/♀	334	379	520	313	76	219	357	—	—
20	9/♂	332	322	320	—	—	—	—	—	—
	10*/♀	414	400	473	65	—	—	—	—	—
30	11/♀	410	232	374	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	324	332	382	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

обратимые в дозах 1–10 мг/кг и необратимые в дозах 20–30 мг/кг (табл. 2, 3). Снижение количества эритроцитов, гемоглобина и гематокрита было отмечено у собак, получивших ормустины в дозах ≥ 5 мг/кг, оно начиналось с 3–21-х суток наблюдения в зависимости от величины примененной дозы и было полностью обратимым лишь при 5 мг/кг. Также выявлено увеличение скорости оседания эритроцитов на 14-е сутки наблюдения у собаки, получившей препарат в дозе 10 мг/кг, и на 7-е сутки — у собаки, получившей препарат в дозе 20 мг/кг (перед гибелью).

Биохимическое исследование сыворотки крови собак, получивших ормустины во всех дозах, выявило небольшое уменьшение уровня мочевины с 3-х до 21-х суток наблюдения и колебания активности печеночных ферментов на протяжении всего срока эксперимента относительно фоновых показателей и физиологических норм (табл. 4, 5).

При изучении влияния ормустина на функции сердца установлено, что препарат, примененный в дозе 5 мг/кг, вызывал качественные изменения электрической активности сердца: появление зубца R с зубуринами (7–30-е сутки) и единичных желудочковых экстрасистол (45-е сутки наблюдения). После воздействия препарата в дозе 10 мг/кг наблюдались

только количественные изменения: уменьшение числа сердечных сокращений на 3–14-е сутки наблюдения, увеличение интервалов QT и PQ. Ормустин, примененный в дозах 20–30 мг/кг, вызывал в основном качественные изменения электрической активности сердца на 3-е и 7-е сутки наблюдения: инверсию зубца T, появление патологически глубокого зубца Q, зубца R с зубуринами. Только у 1 собаки, получившей препарат в дозе 20 мг/кг, на 3–7-е сутки наблюдения было отмечено уменьшение числа сердечных сокращений.

При гистологическом изучении внутренних органов собак, получивших препарат во всех дозах, произошли изменения различной степени выраженности в тонком кишечнике, почках, селезенке, щитовидной железе, гонадах. Кроме того, после введения ормустина в дозах ≥ 5 мг/кг обнаружены изменения в печени, сердце и лимфатических узлах, а после применения в дозах 20–30 мг/кг — также в толстой кишке, поджелудочной железе, надпочечниках, желудке, мочевом пузыре.

Так, в тонком кишечнике после применения ормустина в дозах 1–10 мг/кг на раннем сроке выявлен острый катаральный энтерит, приобретший к концу исследования характер хронического с признаками

Таблица 4. Динамика уровня мочевины в сыворотке крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 4. Dynamics of urea level in the blood serum of dogs after 3 times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Мочевина (4,3—8,0 ммоль/л) Urea (4,3—8,0 mmol/l)										
1	1/♀	5,4	4,9	3,0	3,6	5,1	4,2	5,0	4,6	4,3
	2/♀	5,7	4,6	3,9	3,9	4,1	4,0	4,7	—	—
	3/♀	5,9	6,4	4,2	4,3	5,1	5,4	4,7	—	—
5	4/♀	4,8	4,5	4,2	3,8	4,7	4,3	3,7	—	—
	5/♀	5,3	4,6	3,4	3,0	4,3	5,4	5,1	—	—
	6/♀	6,0	5,1	3,0	3,7	4,0	3,8	4,3	4,6	4,7
10	7/♂	6,4	6,8	6,1	—	—	—	—	—	—
	8/♀	4,9	6,0	5,9	4,8	6,8	5,7	6,0	—	—
20	9/♂	5,9	6,1	3,9	—	—	—	—		—
	10*/♀	6,3	6,8	6,4	3,9	—	—	—	—	—
30	11/♀	5,3	4,7	4,9	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	6,3	5,4	4,5	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

Таблица 5. Динамика активности лактатдегидрогеназы в сыворотке крови собак после 3-кратного ежедневного внутривенного введения ормустина

Table 5. Dynamics of lactate dehydrogenase activity in the blood serum of dogs after 3-times daily intravenous administration of ormustine

Доза суммарная, мг/кг Total dose, mg/kg	№ собаки/ пол No. of dog/ sex	Сутки наблюдения Day of observation								
		Фон 1 Background 1	Фон 2 Background 2	3 3	7 7	14 14	21 21	30 30	45 45	60 60
Лактатдегидрогеназа (50–495 Ед./л) Lactate dehydrogenase (50–495 Un/l)										
1	1/♀	119	61	192	53	81	337	103	146	148
	2/♀	206	143	125	78	59	196	128	—	—
	3/♀	102	76	147	56	79	122	94	—	—
5	4/♀	93	51	83	27	59	142	47	—	—
	5/♀	192	237	152	169	114	589	181	—	—
	6/♀	117	145	101	121	106	283	110	328	116
10	7/♂	221	134	74	—	—	—	—	—	—
	8/♀	94	151	143	25	110	204	184	—	—
20	9/♂	120	74	118	—	—	—	—	—	—
	10*/♀	173	80	74	42	—	—	—	—	—
30	11/♀	205	91	745	—	—	—	—	—	—
	12*/♀	173	158	141	—	—	—	—	—	—

*Собака пала.

*The dog has died.

частичной регенерации эпителия ворсинок. С увеличением доз препарата до 20–30 мг/кг отмечены более выраженные катарально-десквамативные воспалительные изменения с появлением очагов некроза эпителия ворсинок (рис. 1).

В почках всех животных выявлены выраженные воспалительные, дистрофические и деструктивные изменения в сосудистых клубочках и извитых канальцах, сохранявшиеся и на 60-е сутки. Помимо этого, у упавшей на 7-е сутки наблюдения собаки в почке обнаружен участок инфаркта (рис. 2).

Повреждающее действие ормустина на селезенку проявляется при применении его в дозах 10–30 мг/кг: на раннем сроке обнаружены деструктивные и гипопластические изменения лимфоидных клеток, обратимые к 30-м суткам наблюдения лишь в дозе 10 мг/кг. Кроме того, у собак, получивших препарат во всех дозах, отмечен отсроченный гемосидероз (рис. 3).

В щитовидной железе на всех сроках наблюдения обнаружены очаговые дистрофические, деструктивно-воспалительные изменения в фолликулах, которые носили немного более выраженный характер у собак, получивших препарат в дозах 20–30 мг/кг.

Деструктивные и дистрофические изменения в гонадах выявлены на ранних сроках наблюдения, они усиливались пропорционально примененной дозе препарата, сохранялись длительно и не обнаруживались лишь на 60-е сутки после курса его введения. В семенниках они выражались в виде десквамации сперматогенного эпителия канальцев, а в яичниках — в виде признаков атрезии фолликулов.

В печени отмечали очаговые, преимущественно дистрофические изменения гепатоцитов с признаками

ми обратимости к 60-м суткам наблюдения после воздействия препарата только в дозе 5 мг/кг (рис. 4).

Патологические изменения в миокарде проявлялись к 30-м суткам наблюдения в виде очагов отека и набухания кардиомиоцитов с изменением тинкториальных свойств их цитоплазмы, а после воздействия ормустина в самой высокой дозе были отмечены и на раннем сроке. К 60-м суткам наблюдения изменения уже не регистрировались. У собаки, павшей на 8-е сутки наблюдения, среди мышечных волокон обнаружены жировые клетки, часть которых замещают кардиомиоциты (рис. 5).

Повреждения лимфатических узлов, выражающиеся в виде лимфоцитарной гипоплазии, были отмечены уже на 3-и сутки наблюдения, сохранялись они длительно и к 60-м суткам не регистрировались. Помимо того, через 2 мес после окончания курса введения ормустина в мозговом веществе были обнаружены гемосидерофаги.

В толстом кишечнике на раннем сроке отмечена очаговая десквамация поверхностного эпителия, сохранявшаяся у павших собак.

Гистологическое исследование поджелудочной железы выявило повреждения ее экзокринных клеток в виде очагов дистрофии и деструкции клеток ацинусов у павших собак, а в дозе 30 мг/кг — и на раннем сроке.

В надпочечниках изменения выражались в виде вакуольной дистрофии, локализуемой на ранних сроках в мозговом веществе, и сохранялись у павших собак, причем у 1 из них повреждения обнаружены и в корковом веществе.

Большинство изменений были более выраженными и глубокими у павших собак. У них же обнаружены

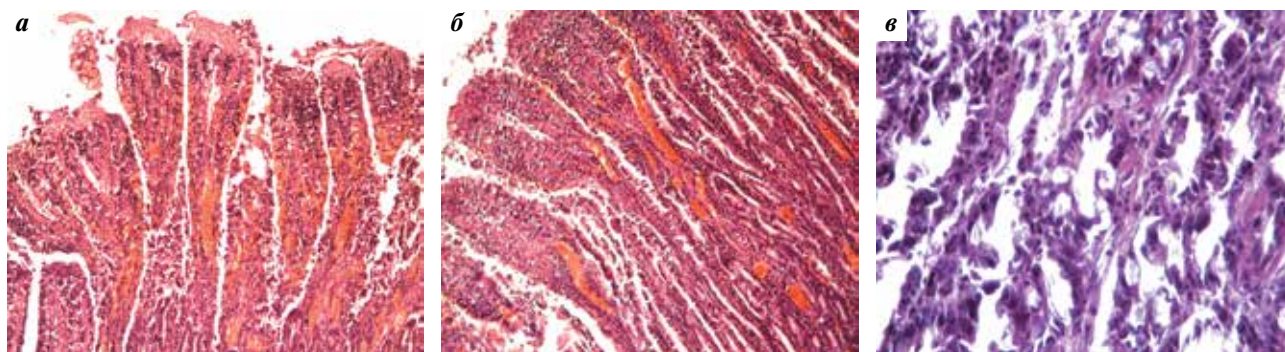


Рис. 1. Тонкая кишка собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 10 мг/кг, 3-и сутки после окончания введений. Воспалительные и деструктивные изменения слизистой оболочки: полнокровие, некроз апикальной зоны ворсинок, деструкция и десквамация каемчатого эпителия ворсинок ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 30-е сутки после окончания введений. Тотальная десквамация эпителия ворсинок, выраженная сосудистая реакция и инфильтрация стромы ($\times 100$); в — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Дистрофия и деструкция клеток крипт в слизистой оболочке ($\times 400$)

Fig. 1. Dog's small intestine (hematoxylin and eosin staining): a — ormustine in a total dose of 10 mg/kg, 3rd day after the end of the injections. Inflammatory and destructive changes of the mucous membrane: plethora, necrosis of the apical zone of the villi, destruction and desquamation of the limbic epithelium of the villi ($\times 100$); б — ormustine in a total dose of 1 mg/kg, 30th day after the end of the injections. Total desquamation of the villus epithelium, severe vascular reaction and stromal infiltration ($\times 100$); в — ormustine in a total dose of 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Dystrophy and destruction of crypt cells in the intestinal mucosa ($\times 400$)

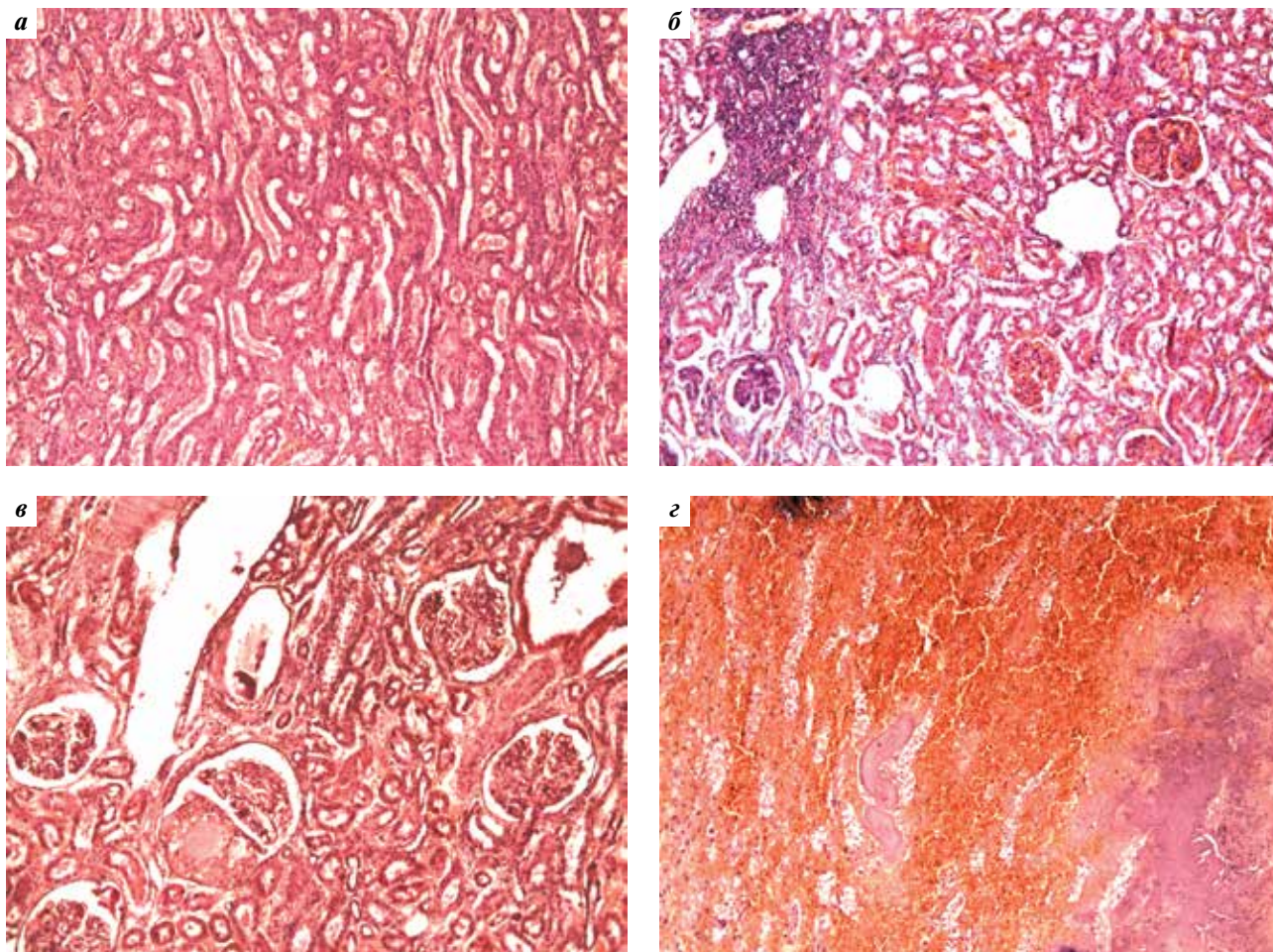


Рис. 2. Почка собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 3-и сутки после окончания введений. Кортиковое вещество. Скопления рыхлого белка и десквамированного эпителия в просвете извитых и прямых канальцев ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 30-е сутки после окончания введений. Кортиковое вещество. Крупный мононуклеарный инфильтрат, среди которого видны погибающие поврежденные извитые канальцы ($\times 100$); в — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 60-е сутки после окончания введений. Деструкция и атрофия сосудистых петель клубочков ($\times 400$); з — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Участок инфаркта почки ($\times 100$)

Fig. 2. Dog's kidney (hematoxylin and eosin staining): а — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 3rd day after the end of the injections. Cortical substance. Accumulations of loose protein and desquamated epithelium in the lumen of convoluted and straight tubules ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 30th day after the end of the introduction. Cortical substance. Large mononuclear infiltrate, among which dying injured convoluted tubules are visible ($\times 100$); в — ормустин в суммарной дозе 1 мг/кг, 60th day after the end of the introduction. Destruction and atrophy of the vascular loops of the glomeruli ($\times 400$); з — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7th day after the end of the introduction. Infarct kidney site ($\times 100$)

деструктивные и дистрофические изменения в желудке и мочевом пузыре.

Совокупный анализ полученных данных позволяет утверждать, что суммарные дозы ормустина 20 и 30 мг/кг являются летальными, а суммарные дозы 1–10 мг/кг — переносимыми.

Внешние признаки нейротоксичности препарата, примененного во всех дозах, проявлялись мгновенно и сохранялись в течение суток после инъекции.

Ормустин обладает дозозависимой гематотоксичностью, частично обратимой в переносимых дозах. Препарат во всех дозах вызывает уменьшение количества лейкоцитов и колебание количества тромбоцитов периферической крови, а в дозах ≥ 5 мг/кг

провоцирует также снижение числа эритроцитов, уровней гемоглобина и гематокрита.

Выраженная стойкая гастроинтестинальная токсичность препарата, примененного во всех дозах, выявляется на ранних сроках посредством как клинических (снижение массы тела, диарея), так и гистологических признаков. Так, действие ормустина приводит к стойкому катаральному энтериту (в переносимых дозах — с некоторыми признаками поздней регенерации), а также к деструктивным изменениям покровного эпителия слизистой оболочки толстого кишечника и желудка у собак, получивших препарат в летальных дозах. Изменения экзокринных ацинарных клеток поджелудочной железы,

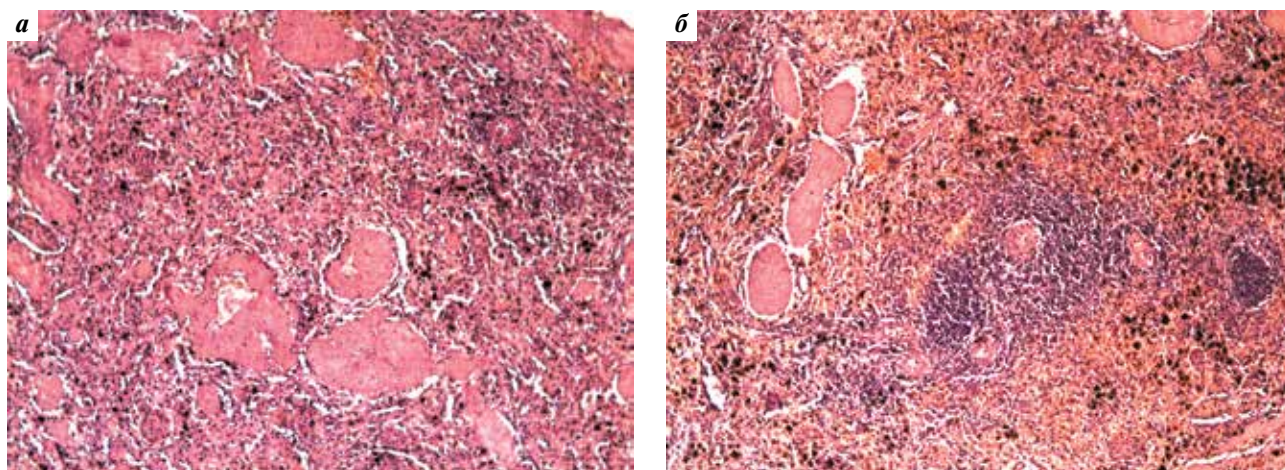


Рис. 3. Селезенка собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 20 мг/кг, 8-е сутки после окончания введений. Небольшой лимфатический фолликул с уменьшенным содержанием лимфоцитов в периартериальной зоне. Гемосидерофаги в красной пульпе ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Атрофические изменения в красной и белой пульпе. Уменьшенное содержание лимфоцитов в фолликуле и ядросодержащих клеток в красной пульпе ($\times 100$)

Fig. 3. Dog's spleen (hematoxylin and eosin staining): а — ормустин в суммарной дозе 20 mg/kg, 8th day after the end of the injections. A small lymphatic follicle with a reduced content of lymphocytes in the periarterial zone. Hemosiderophages in the red pulp ($\times 100$); б — ормустин в суммарной дозе 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Atrophic changes in red and white pulp. Reduced lymphocyte count in the follicle and nucleus-containing cells in the red pulp ($\times 100$)

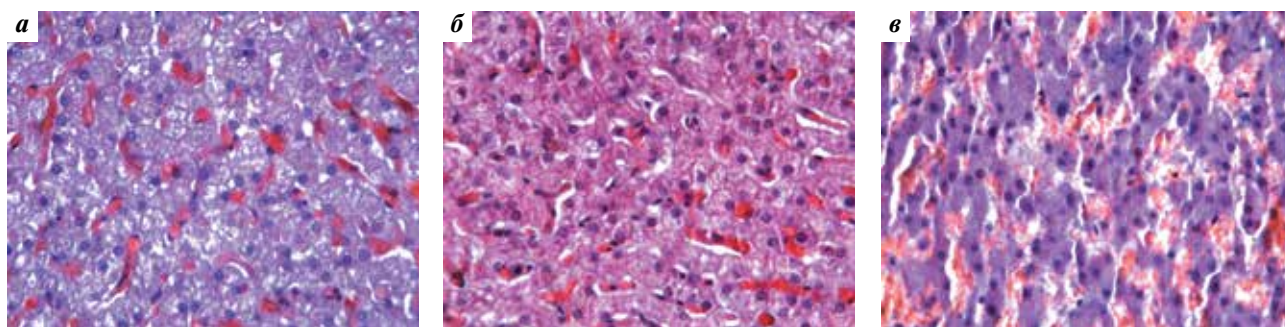


Рис. 4. Печень собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормустин в суммарной дозе 20 мг/кг, 3-и сутки после окончания введений. Часть гепатоцитов с признаками вакуольной дистрофии. Синусоиды расширены и заполнены кровью ($\times 400$); б — ормустин в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Нарушение балочной структуры, набухание цитоплазмы, гибель отдельных гепатоцитов, отсутствие ядер в некоторых клетках ($\times 400$); в — ормустин в суммарной дозе 5 мг/кг, 60-е сутки после окончания введений. Большая часть гепатоцитов в балках без изменений. В единичных гепатоцитах мелкокапельная жировая дистрофия ($\times 400$)

Fig. 4. Dog's liver (hematoxylin and eosin staining): а — ормустин в суммарной дозе 20 mg/kg, 3rd day after the end of the injections. Part of hepatocytes with signs of vacuolar dystrophy. Sinusoids are dilated and filled with blood ($\times 400$); б — ормустин в суммарной дозе 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Violation of the beam structure, swelling of the cytoplasm, the death of individual hepatocytes, the absence of nuclei in some cells ($\times 400$); в — ормустин в суммарной дозе 5 mg/kg, 60th day after the end of the injections. Most of the hepatocytes in the beams are unchanged. Small-drop fatty degeneration dystrophy in single hepatocytes ($\times 400$)

по-видимому, связаны с истощением выработки панкреатических ферментов из-за выраженного воспаления в тонком кишечнике.

Стойкое выраженное нефротоксическое действие ормустина во всех дозах регистрируют в основном морфологически на ранних сроках в виде десквамативных и деструктивных изменений, переходящих в атрофические, а клинически — небольшим колебанием уровней мочевины и креатинина в сыворотке крови.

Репродуктивная токсичность препарата выражается в дозозависимых, частично обратимых в пере-

носимых дозах к 30-м суткам и полностью обратимых к 60-м суткам наблюдения деструктивных изменений в гонадах.

Тиреотоксичность препарата выражается в виде персистирующих деструктивных изменений фолликулов щитовидной железы.

Гепатотоксическое действие ормустина регистрируется морфологически в виде длительно сохраняющейся вакуольной дистрофии клеток печени и их некоторых деструктивных изменений, что проявляется клинически.

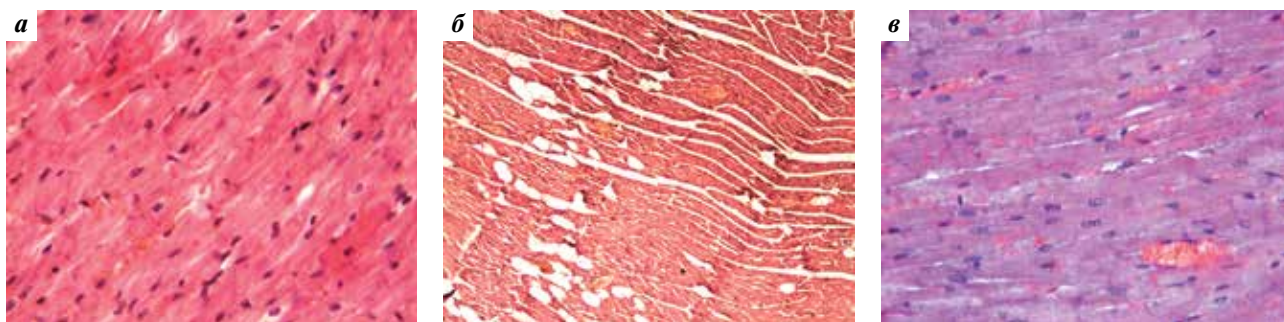


Рис. 5. Сердце собаки (окраска гематоксилином и эозином): а — ормусти́н в суммарной дозе 5 мг/кг, 30-е сутки после окончания введений. Миокард. Набухание и гиперэозинофильная окраска кардиомиоцитов ($\times 400$); б — ормусти́н в суммарной дозе 20 мг/кг, 8-е сутки после окончания введений. Миокард. Жировые клетки среди кардиомиоцитов, часть жировых клеток замещает кардиомиоциты ($\times 100$); в — ормусти́н в суммарной дозе 30 мг/кг, 7-е сутки после окончания введений. Миокард. Кардиомиоциты с признаками набухания, исчезновение поперечной-полосатой исчерченности ($\times 400$)

Fig. 5. Dog's heart (hematoxylin and eosin staining): а — ormustine in a total dose of 5 mg/kg, 30th day after the end of the injections. Myocardium. Swelling and hypereosinophilic staining of cardiomyocytes ($\times 400$); б — ormustine in a total dose of 20 mg/kg, 8th day after the end of the injections. Myocardium. Fat cells among cardiomyocytes, part of the fat cells replaces cardiomyocytes ($\times 100$); в — ormustine in a total dose of 30 mg/kg, 7th day after the end of the injections. Myocardium. Cardiomyocytes with signs of swelling, disappearance of striation ($\times 400$)

Кардиотоксичность препарата регистрируется клинически и морфологически в виде частично обратимых признаков гипоксии миокарда.

Дистрофические изменения надпочечников расценены нами как компенсаторная реакция организма на развившуюся полиорганную недостаточность.

Заключение

По результатам изучения субхронической токсичности ормустина суммарные дозы 20 и 30 мг/кг охарактеризованы как летальные. На основании клинической картины интоксикации, изменения пове-

денческих реакций, изменений в показателях периферической крови, изменений (и их обратимости) функционального и морфологического состояния исследованных внутренних органов суммарные дозы 5 и 10 мг/кг охарактеризованы как высокие токсические дозы, 1 мг/кг — низкая токсическая доза.

Наиболее выражены гастроинтестинальные, нефро- и тиреотоксические свойства ормустина, интенсивность которых практически не зависит от величины примененной дозы. Кроме того, препарат обладает дозозависимой выраженной гемато-, гепато-, кардио- и репродуктивной токсичностью.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Заридзе Д.Г., Каприн А.Д., Стилиди И.С. Динамика заболеваемости злокачественными новообразованиями и смертности от них в России. Вопросы онкологии 2018;64(5):578–91. [Zaridze D.G., Kaprin A.D., Stilidi I.S. Dynamics of morbidity and mortality from malignant tumors in Russia. Voprosy onkologii = Oncology issues 2018;64(5):578–91. (In Russ.)].
- Волкова А.Р., Вахитов Х.М., Кумирова Э.В. и др. Первичные злокачественные новообразования центральной нервной системы у детей: перспективы совершенствования диагностических и лечебных подходов. Тихоокеанский медицинский журнал 2019;76(2):8–10. DOI: 10.17238/PmJ1609-1175.2019.2.8–10. [Volkova A.R., Vakhitov Kh. M., Kumirova E.V. et al. Primary malignant neoplasms of cerebrospinal nervous system in children: perspectives of improvement of diagnostic and treatment approaches. Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal 2019;76(2):8–10. (In Russ.)].
- Кобяков Г.Л., Бекашев А.Х., Голанов А.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению первичных опухолей центральной нервной системы. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2018;8(3с2):83–99. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-83-99. [Kobyakov G.L., Bekashev A.Kh., Golanov A.V. et al. Practical recommendations for the medicinal treatment of primary tumors of the central nervous system. Malignant tumors: Practical recommendations RUSSCO 2018;8(3s2):83–99. (In Russ.)].
- Строяковский Д.Л., Абрамов М.Е., Демидов Л.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению меланомы кожи. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2018;8(3с2):213–26. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-213-226. [Stroyakovskiy D.L., Abramov M.E., Demidov L.V. et al. Practical recommendations for the medicinal treatment of skin melanoma. Malignant tumors: Practical recommendations RUSSCO 2018;8(3с2):213–26. (In Russ.)].
- Краснов В.П., Левит Г.Л., Матвеева Т.В. и др. Nδ-нитрозо-Nδ-[(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитин. Патент РФ №2503657 от 10.01.2014. [Krasnov V.P., Levit G.L., Matveeva T.V. et al. Nδ-nitroso-Nδ-[(2-chloroethyl)carbamoyl]-L-orithine. Patent of the Russian Federation № 2503657, 10.01.2014. (In Russ.)].
- Nikolaeva L., Oborotova N., Bunyatyan N. et al. The development of a parenteral pharmaceutical formulation of a new class of compounds of nitrosourea.

- Pharmaceuticals 2016;9(4):68. DOI: 10.3390/ph9040068.
7. Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Калишьян М.С. и др. Сравнительное изучение нового нитрозопроизводного ормустина с мустофораном на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):132–3. [Smirnova G.B., Borisova Yu.A., Kalishyan M.S. et al. Comparative study of a new nitrosated derivatives ormustine with mustophoran on subcutaneous xenografts of human melanoma Mel7. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):132–3. (In Russ.)].
 8. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая эффективность ормустина, нового препарата класса алкилнитрозомочевин, в отношении перевиваемых опухолей мышей. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):133. [Smirnova Z.S., Borisova L.M., Kiseleva M.P. et al. Antitumor efficacy of ormustine, a new drug class nitrosoalkylurea, against transplantable tumors of mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(1):133. (In Russ.)].
 9. Отчетные материалы Научного совета РАН по органической химии за 2015 год. М., 2016. Доступно по: <http://zioc.ru/files/Dostigenija%202015%20-%20to%20print.pdf>.
 10. Чалей В.А., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Доклиническое изучение токсичности нового противоопухолевого препарата Ормустин на мелких лабораторных животных. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(4):65–72. DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-4-65-72. [Chaley V.A., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. Preclinical toxicity study of a new antineoplastic drug Ormumine in small laboratory animals. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(4):65–72. (In Russ.)].
 11. Чалей В.А., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. Предклиническое токсикологическое исследование Ормустина при применении у крыс в условиях субхронического эксперимента. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(4):98–105. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-98-105. [Chaley V.A., Konyaeva O.I., Ermakova N.P. et al. Pre-clinical study of subchronic toxicity of Ormumine on rats. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):98–105. (In Russ.)].
 12. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических средств. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 170–204. [Methodological instructions for studying the general toxic effects of antitumor drugs. In: Guideto experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed.: R.U. Khabriev, Moscow: Medicine, 2005. P. 170–204. (In Russ.)].
 13. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. 2-е изд., доп. М.: МДВ, 2008. 196 с. [Gus'kova T.A. Toxicology of medicines. 2nd edn. ed. Moscow: MDV, 2008. 196 p. (In Russ.)].

Вклад авторов

В.А. Чалей: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных;
Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
Т.В. Абрамова: получение данных для анализа;
В.М. Бухман: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Authors' contributions

V.A. Chaley: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data, article writing;
O.I. Konyaeva, N.Yu. Kulbachevskaya: developing the research design, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
N.P. Ermakova, I.B. Merkulova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
T.V. Abramova: obtaining data for analysis;
V.M. Bukhman: reviewing of publications of the article's theme, analysis of the obtained data.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Чалей/V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>
О.И. Коняева/O.I. Konyaeva: <https://orcid.org/0000-0002-3814-5630>
В.М. Бухман/V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>
Н.Ю. Кульбачевская/N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках ГК 13411.1008799.13 «Доклинические исследования противоопухолевого лекарственного средства класса нитрозомочевин».

Financing. The research was performed within the framework of the State contract 13411.1008799.13 "Preclinical studies of antitumor drugs of the nitrosureas class".

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: 00.00.2019. Принята к печати: 00.00.2019.

Article received: 00.00.2019. Accepted for publication: 00.00.2019.

ВРОЖДЕННОЕ ПИГМЕНТНОЕ НОВООБРАЗОВАНИЕ КОЖИ У РЕБЕНКА: ОПЫТ ДИАГНОСТИКИ

Г.М. Волгарева¹, Т.С. Бельшева¹, Л.Э. Завалишина², Д.Б. Хестанов¹,
О.С. Бурова¹, Я.В. Вишневская¹, М.Д. Алиев¹

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

²кафедра патологической анатомии ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, ул. Поликарпова, 12/13

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

Введение. Меланома кожи у детей встречается очень редко и по ряду характеристик отличается от меланомы кожи у взрослых. Ранняя диагностика этой высокозлокачественной опухоли является главным условием успешного лечения. При определении заболевания у детей обычно используют те же методы, что и у взрослых. Адекватность такого подхода требует проверки.

Цель исследования — описание процедур постановки диагноза для крупного врожденного пигментного новообразования кожи у ребенка.

Описание клинического случая врожденной опухоли в области лучезапястного сустава у девочки 5 мес. По месту жительства было высказано предположение о гемангиоме. При диагностике в НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина проведены ультразвуковое исследование, магнитно-резонансная томография, трепанобиопсия, открытая биопсия. Материалы последней исследованы гистологически на препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, и иммуногистохимически путем детекции индикаторов пролиферации клеток, антигенов меланоцитарного ряда дифференцировки, белков, используемых как маркеры собственно меланомы, антигенов тканевой совместимости. Сделано заключение: узловая пигментная меланома кожи. Проведено иссечение опухоли. Безрецидивный период на момент подготовки сообщения — 12 мес.

Заключение. Описаны процедуры диагностики и лечения 5-месячной девочки с врожденным пигментным новообразованием кожи в области лучезапястного сустава. В процессе диагностики использованы подходы, применяемые при выявлении более частой и лучше изученной меланомы кожи у взрослых. Для подтверждения адекватности использованных в работе методов в диагностике пигментных новообразований кожи у детей целесообразно продолжение исследований.

Ключевые слова: меланома кожи, дети, диагностика, иммуногистохимия, маркер

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-63-70

INBORN PIGMENT SKIN MALFORMATION IN A CHILD: PRACTICE OF DIAGNOSTICS

G.M. Volgareva¹, T.S. Belysheva¹, L.E. Zavalishina², D.B. Khestanov¹, O.S. Burova¹, Ya.V. Vishnevskaya¹, M.D. Aliev¹

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

²Department of Pathological Anatomy, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education
of the Ministry of Health of Russia; 12/13 Polikarpova St., Moscow 125284, Russia

Background. Pediatric skin melanoma is very rare, it differs in a number of features from adult skin melanoma. Early diagnostics of this highly malignant tumor is a key prerequisite for effective treatment. The same methods are commonly used which are applied for diagnostics of adult melanoma in the course of diagnostics of skin melanoma in children. Appropriateness of this approach deserves validation.

The aim of this work is to describe procedures of diagnostics of a pigment skin malformation in a child.

Case report. Girl aged 5 months entered pediatric clinic of the FSBI “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation with inborn tumor in a wrist joint area. Hemangioma had been suggested formerly at residence place.

In the course of diagnostics in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology the following complex of approaches was used: ultrasound scanning, magnetic resonance imaging, trepanobiopsy, open biopsy. Tissues from the latter were examined histologically on hematoxylin and eosin — stained slides. Immunohistochemical study was also done by means of revelation of determinants of cell proliferation, antigens of melanocytic differentiation, proteins commonly used as strictly melanoma markers as well as antigens of tissue compatibility. The conclusion was done about nodular pigment cell skin melanoma. Excision of the tumor was carried out. Relapse-free period lasts for 12 months at present.

Conclusion. Procedures are described of diagnostics and treatment of a 5-month-old girl with skin melanoma in a wrist joint area. In the course of diagnostics approaches were used which are commonly applied when identifying a more frequent and better explored adult skin melanoma. Prolongation of studies is desirable to validate these approaches for diagnostics of pediatric pigment skin tumors.

Key words: skin melanoma, children, diagnostics, immunohistochemistry, markers

Введение

Актуальность изучения пигментных новообразований кожи, а также обмена опытом диагностики и лечения этих опухолей обусловлена в первую очередь тем, что к данной группе относится меланома кожи — одна из самых агрессивных опухолей человека. Развиваясь из меланоцитов — клеток, продуцирующих пигмент меланин, эта опухоль в случае позднего выявления сопровождается высокой смертностью, причем и заболеваемость меланомой кожи, и смертность от нее в мире неуклонно возрастают [1–4].

Риск заболевания меланомой резко увеличивается с возрастом [4–6]. Так, в России, по данным за 2015 г., в возрастной группе 0–14 лет заболеваемость меланомой на 100 тыс. населения не превысила 0,03 случая, тогда как в группах 65–69 и 70–74 лет этот показатель оказался равен 19,09 и 20,56 соответственно [4]. Несмотря на невысокую заболеваемость меланомой кожи детей и подростков в России, смертность от нее среди педиатрических пациентов весьма высока: она приблизительно в 6 раз превышает аналогичный показатель для таких стран, как США, Канада, Австралия, что связано, как правило, с запущенностью опухолевого процесса на момент его обнаружения [5].

В силу крайней редкости меланомы кожи у детей при первичной диагностике этой опухоли существует опасность ошибок, так как педиатр и дерматолог не готовы к заключению об этом заболевании. По некоторым свойствам, таким как характер роста и метастазирования, а также выживаемость больных меланомой кожи, педиатрические пациенты отличаются от взрослых [7, 8]. Последнее служит поводом для сомнений в адекватности приемов, используемых при выявлении значительно более частой и поэтому лучше изученной меланомы кожи у взрослых больных, при первичной диагностике этой опухоли у детей и свидетельствует о целесообразности проверки этих приемов.

Цель настоящей работы заключается в описании процедур постановки диагноза для врожденного крупного меланоцитарного новообразования кожи у 5-месячной девочки.

Описание случая

Девочка в возрасте 5 мес поступила в клинику НИИ детской онкологии и гематологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с врожденной опухолью в области лучезапястного сустава с тенденцией к росту новообразования. Ребенок от 1-й беременности, протекавшей на фоне токсикоза. Роды первые, самостоятельные, преждевременные, в срок 37 нед. Онкоанамнез со слов матери неотягощен. Ранее в клинике по месту жительства было высказано предположение о гемангиоме.

При поступлении в НИИ детской онкологии и гематологии проведено контрольное обследование.

Цитологическое заключение: в полученном материале цитологическая картина соответствует злокачественному новообразованию из округлых клеток негемопоэтической природы (рабдомиосаркома?).

Ультразвуковое исследование (УЗИ): в подкожно-жировом слое левого лучезапястного сустава по наружной поверхности визуализируется объемное образование размерами 30 × 25 × 35 мм, контуры бугристые, форма неправильная, структура солидная, при цветовом доплеровском картировании кровотоков резко усилен. Прилежащие мягкие ткани не изменены. Заключение: картину УЗИ необходимо дифференцировать между сосудистой мальформацией и дерматофибросаркомой.

Status localis: в области левого лучезапястного сустава — образование багрового цвета, возвышающееся над поверхностью кожи + 2 см, поперечные размеры: 3 × 4 см, 4 × 4 см. При пальпации вызывает умеренное беспокойство ребенка. Со слов матери цвет образования не менялся с рождения.

Гистологическое исследование материала, полученного при открытой биопсии. Макроописание.

На морфологическое исследование прислан лоскут кожи размером 6 × 3,5 см с подкожно-жировой клетчаткой толщиной 0,7 см. На расстоянии 0,4–1,2 см от краев резекции определялась выбухающая над поверхностью опухоль на широком основании, имеющая вид многоузлового образования со сливающимися узлами общими размерами 3,5 × 3 × 2,2 см. Поверхность опухоли коричневого цвета, на разрезах узлы представлены плотноэластичной серой тканью с очаговыми кровоизлияниями.

Микроскопически опухоль представлена участками врожденного невуса, содержащего пигмент в гнездовых скоплениях невоидных клеток юнкциональной зоны, в более глубоких отделах невоидные клетки мельче, растут солидно или в виде мелкоальвеолярных структур, не содержат пигмент (рис. 1).

Среди полей невоидных клеток отмечаются многочисленные зоны малигнизации, в которых преобладают веретеновидные полиморфные плотно лежащие беспигментные клетки с повышенной митотической активностью (2–3 митоза в поле зрения при увеличении в 400 раз). Признаков сосудистой инвазии и периневрального роста не обнаружено. Истинного изъязвления в опухоли нет, однако в центре узла в одном из участков на поверхности эпидермис истончен, представлен только роговым слоем, под которым — фибрин с ядерными обломками и разрушенными сегментоядерными нейтрофильными лейкоцитами, что расценено как формирование поверхностного некроза (рис. 2). В толще опухоли имеются очаговые кровоизлияния. Некрозов нет. Опухоль прорастает всю толщу дермы и инфильтрирует

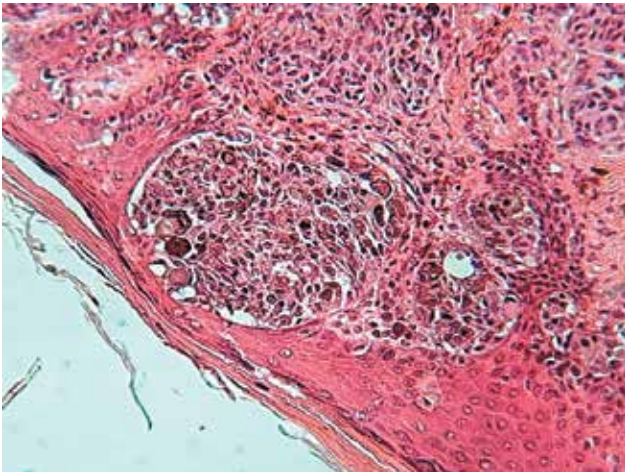


Рис. 1. Гнездовые скопления пигментированных невоидных клеток в юнкциональной зоне. Гематоксиллин и эозин, $\times 20$

Fig. 1. Nevoid pigmented cell nests in the junctional area. Hematoxylin and eosin, $\times 20$

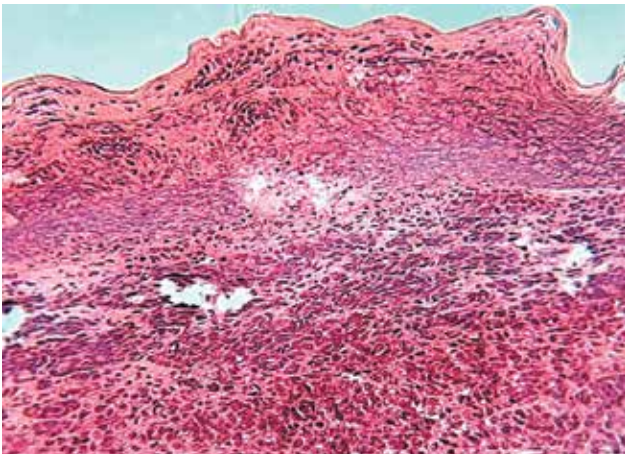


Рис. 2. Зона малигнизации, формирование изъязвления. Гематоксиллин и эозин, $\times 10$

Fig. 2. Area of malignant transformation, lesion formation. Hematoxylin and eosin, $\times 10$

гиподерму. В подкожно-жировой клетчатке на расстоянии 0,8 мм от опухоли определяется сателлит 0,4 см в диаметре.

Материалы открытой биопсии были исследованы иммуногистохимически (ИГХ). При этом учитывали, что в традиционно используемую для диагностики меланомы панель маркеров входят белки, специфичность и чувствительность которых не являются стопроцентными, и поэтому для заключения о меланоме исследователи рекомендуют учитывать именно комплекс данных, получаемых с несколькими антителами [9–12]. В этой связи ИГХ-исследование провели путем детекции 4 групп маркеров: индикаторов пролиферации клеток, антигенов меланоцитарного ряда дифференцировки, белков, используемых как маркеры собственно меланомы, антигенов тканевой совместимости.

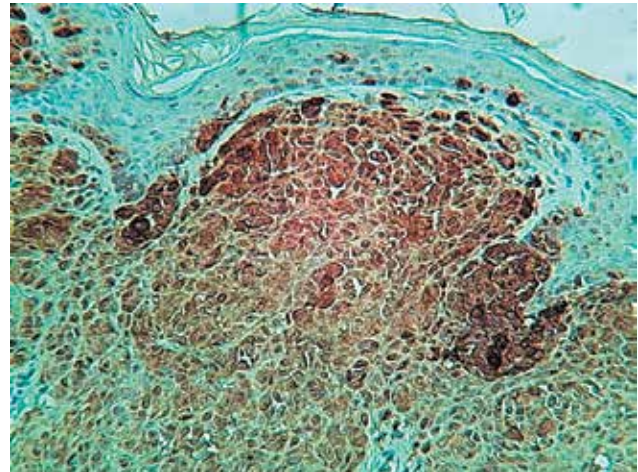


Рис. 3. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белку S100a, $\times 20$

Fig. 3. Immunohistochemical reaction with antibodies against the S100a protein, $\times 20$

Для детекции белка p16^{INK4a} использовали моноклональные антитела CINtec p16 Histology, циклина D1 – моноклональные антитела VENTANA Anti-Cyclin D1, SP4-R (оба реагента – Roche Diagnostics GmbH, Германия). Для обнаружения HLA-антигенов I класса использовали моноклональные антитела ИКО-53, полученные в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [13]. Для обнаружения виментина использовали антитела Vimentin (клон V9) Cell Marque, США; белка S100 A – антитела S100 A1 (клон EP184) Epitomics, США; меланина – антитела Melan A (клон A103) Cell Marque, США; антигена HMB-45 – антитела HMB-45 (Cell Marque, США); для выявления транскрипционного фактора MITF – антитела MITF (клон C5/D5) Cell Marque, США; для детекции тирозиназы – антитела tyrosinase (клон T311) Cell Marque, США; Ki 67 (клон SP6) Cell Marque, США. Процедуры окрашивания проводили, следуя рекомендациям производителей антител.

Краткая характеристика функций всех белков, которые выявляли в ИГХ-тестах, а также результаты этих тестов представлены в таблице и на рис. 3–6. Во всех случаях картина окрашивания антителами клеток исследуемого новообразования совпала с тем, что наблюдали другие авторы при первичной диагностике меланомы кожи у взрослых больных.

На основании гистологического и ИГХ-исследований сделано заключение: новообразование кожи имеет строение узловой меланомы с вертикальной фазой роста, возникшей на фоне врожденного невуса, представленной веретеновидными, эпителиоидными, невоидными клетками с неравномерно распределенным пигментом, с 3 митозами/мм², без изъязвления, без достоверных признаков ангиолимфатической инвазии и периневральной лимфоцитарной инфильтрации. Уровень инвазии по Кларку – 5,

Иммуногистохимический тест: использованные маркеры, результаты

Immunohistochemical test: markers used, results

Группа белков-маркеров Type of marker proteins	Маркер, используемый при диагностике меланомы кожи у взрослых больных (по данным литературы) Marker used for diagnosis of melanoma in adults (per literature data)			Результат ИГХ-окрашивания Result of IHC staining		Примечание Note
	Название Name	Ссылки References	Краткая биологическая характеристика [9, 11–14] Short biological description [9, 11–14]	В ядрах In nuclei	В цитоплазме In cytoplasm	
Контролирующие размножение клеток Controlling cell proliferation	Ki 67	[14, 15]	Отражает пролиферативную активность клетки: выявляется в ядрах в G1-, S-, M- (здесь он перемещается на поверхность хромосом) и G2- стадиях клеточного цикла, но не в G0 Reflects cell proliferative activity: is detected in the nuclei at G1, S, M (here it moves on the surface of chromosomes) and G2 stages of the cell cycle	+	—	Индекс до 25 %, а в прилегающем невусе — 3 % Index under 25 %, in the adjoining nevus — 3 %
	Циклин D1 Cyclin D1	[16, 17]	Активирует циклин D-зависимые киназы в G1, способствуя продвижению клетки в стадию S клеточного цикла Activates cyclin D-dependent G1 kinases promoting stage S of the cell cycle	+	—	
	p16INK4a	[14–16]	Ингибирует циклин D-зависимые киназы в G1, блокируя клетку в чекпойнте в G1 Кодируется «главным геном» меланомы <i>CDKN2A</i> Inhibits cyclin D-dependent kinases in G1 arresting the cell at stage G1 Is coded by the “main melanoma gene” <i>CDKN2A</i>	+	—	В ядрах единичных клеток, в цитоплазме везде В цитоплазме — сильнее In nuclei of some cells, everywhere in cytoplasm More pronounced in cytoplasm
Участвующие в дифференцировке меланоцитов Participating in melanocyte differentiation	Melan A	[9, 10, 18]	Дифференцировочный антиген меланоцитов; экспрессируется в цитоплазме Melanocyte differentiation antigen, expressed in cytoplasm	+	+	
	HMB-45	[9, 10, 14, 15, 18]	Антигены, которые ассоциируются с ранними стадиями образования меланосомы Antigens associated with early stages of melanosome formation	+	+	
	Тирозиназа Tyrosinase	[9, 10]	Фермент, находящийся в меланосомах, участвующий в синтезе меланина Melanosome enzyme participating in melanin synthesis	—	+	
	MITF	[10, 19]	Основной транскрипционный фактор, участвующий в размножении и дифференцировке меланоцитов Microphthalmia-associated transcription factor, main transcription factor participating in melanocyte proliferation and differentiation	+	—	

Окончание таблицы

The end of the table

Группа белков-маркеров Type of marker proteins	Маркер, используемый при диагностике меланомы кожи у взрослых больных (по данным литературы) Marker used for diagnosis of melanoma in adults (per literature data)			Результат ИГХ-окрашивания Result of IHC staining		Примечание Note
	Название Name	Ссылки References	Краткая биологическая характеристика [9, 11–14] Short biological description [9, 11–14]	В ядрах In nuclei	В цитоплазме In cytoplasm	
Индикаторы собственно меланомы Melanoma indicators	Виментин Vimentin	[20]	Один из белков промежуточных филаментов, являющихся главными структурными белками клетки. Индикатор эпителиально-мезенхимального перехода, маркер метастазов One of the proteins of intermediate filaments, the main structural proteins of the cell. Indicator of epithelial-mesenchymal transition, marker of metastases	+	+	
	S100 а и b	[9, 10, 18]	Небольшие кальцийсвязывающие белки, участвующие в контроле клеточного цикла, дифференцировки, апоптоза, процессов взаимодействия цитоскелета с мембраной и др. Small calcium-binding proteins participating in cell cycle control, differentiation, apoptosis, interactions between the cytoskeleton and the membrane, et al.	+	+	
Антигены тканевой совместимости Histocompatibility antigens	HLA антигены I класса HLA class I	[21, 22]	Участвуют в иммунных реакциях, в том числе в иммунологическом надзоре и удалении из организма опухолевых клеток. Для реализации этих функций необходима экспрессия на мембране клетки Participate in immune reactions including immunological control and removal of tumor cells from the organism. Expression on the cell membrane is necessary for functioning	+	+	Полностью отсутствуют на мембранах клеток Fully absent on cell membranes

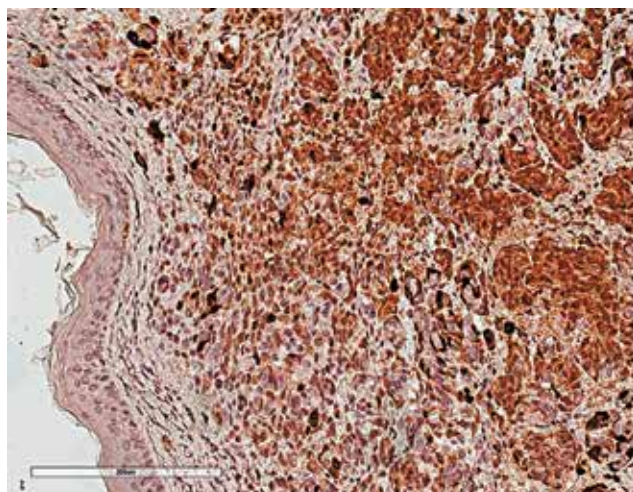


Рис. 4. Иммуногистохимическая реакция с антителами к белку $p16^{INK4a}$, $\times 20$

Fig. 4. Immunohistochemical reaction with antibodies against the $p16^{INK4a}$ protein, $\times 20$

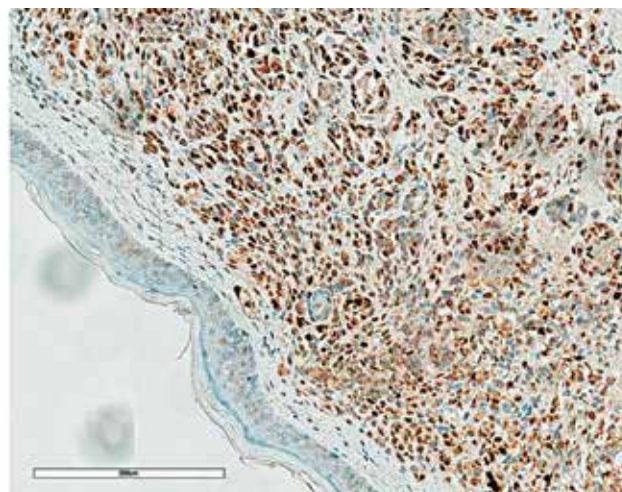


Рис. 5. Иммуногистохимическая реакция с антителами к циклину D1, $\times 20$

Fig. 5. Immunohistochemical reaction with antibodies against cyclin D1, $\times 20$

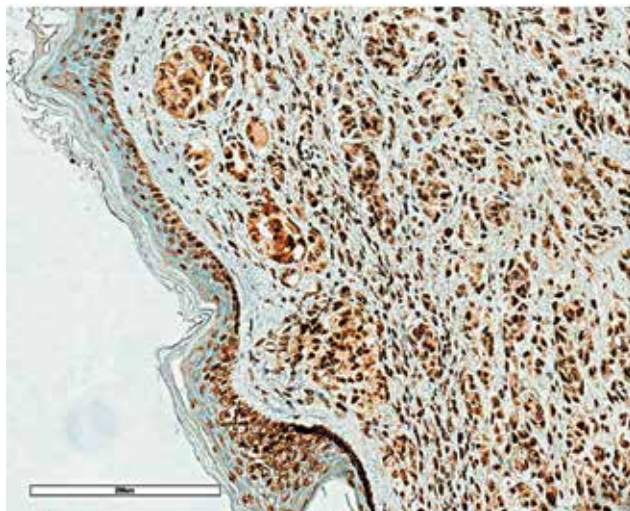


Рис. 6. Иммуногистохимическая реакция с антителами к HLA-антигенам I класса, $\times 20$

Fig. 6. Immunohistochemical reaction with antibodies against HLA class I, $\times 20$

толщина по Бреслоу — 22 мм. В подкожно-жировой клетчатке — одиночный сателлит.

Обсуждение

Значительное клиническое и дерматоскопическое сходство врожденного гигантского пигментного невуса у маленьких детей с врожденной меланомой обуславливает объективные трудности при диагностике пигментных новообразований кожи в данной возрастной группе [23]. Значение точного диагноза в этих ситуациях чрезвычайно велико: в случае меланомы своевременное лечение спасает жизнь ребенка, но при доброкачественном гигантском невусе, диагностированном как меланома, создается стрессовая ситуация в семье и проводится неадекватное избыточное лечение, химиотерапевтическое или хирургическое.

В данном случае при первичной диагностике врожденного пигментного новообразования кожи запястья у 5-месячной девочки использовали УЗИ, МРТ, трепанобиопсию, открытую биопсию. Материалы последней исследовали традиционным гистологическим методом с помощью препаратов, окрашенных

гематоксилин-эозином, а также методом ИГХ — путем детекции 4 групп маркеров: индикаторов пролиферации клеток (Ki67, циклина D1, p16^{INK4a}), антигенов меланоцитарного ряда клеточной дифференцировки (Melan A, HMB-45, тирозиназы, MITF), белков, используемых как маркеры собственно меланомы (кальцийсвязывающие белки S100a, белок микрофиламентов виментин), антигенов тканевой совместимости, участвующих в распознавании опухоли иммунными клетками организма, — HLA-антигенов I класса. Экспрессия всех перечисленных белков в ИГХ-тестах совпала с описанной другими исследователями в случаях меланомы кожи у взрослых больных.

Ранее мы продемонстрировали адекватность 3 из использованных в настоящей работе маркеров (p16^{INK4a}, циклина D1 и HLA-антигенов I класса) для дифференциальной диагностики между меланомой кожи и гигантским врожденным пигментным невусом у педиатрических пациентов [24]. На основании гистологического и ИГХ-исследований было сделано заключение о том, что новообразование кожи имеет строение узловой меланомы с вертикальной фазой роста, возникшей на фоне врожденного невуса. Выполнено иссечение опухоли. Безрецидивный период длится 12 мес.

Целесообразно продолжение исследований для подтверждения адекватности использованных в настоящей работе методов и маркеров при диагностике пигментных новообразований кожи у детей и подростков.

Заключение

Меланома кожи у детей и подростков встречается очень редко и по ряду характеристик отличается от меланомы кожи у взрослых больных. При диагностике этого заболевания у детей используют, как правило, те же методы и маркеры, которые применяют при постановке диагноза у взрослых пациентов. Правомерность такого подхода нуждается в проверке. Для подтверждения адекватности использованных в настоящей работе методов и маркеров при диагностике пигментных новообразований кожи у детей и подростков целесообразно продолжение исследований в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sekulic A., Haluska P., Miller A.J. et al. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc* 2008;83(7):825–46. DOI: 10.4065/83.7.825.
2. Bastian B.C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 2014;9:239–71. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104658.
3. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA J Clin* 2018;68(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21442.
4. Злокачественные новообразования в России (заболеваемость и смертность).

- Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петрова. Москва, 2017. [Malignant malformations in Russia (morbidity and mortality). Eds. A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrov. Moscow: 2017. (In Russ.)].
- Мень Т.Х., Дорошенко М.Б., Алиев М.Д. Злокачественная меланома кожи у детей и подростков в России: популяционное эпидемиологическое исследование. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2011;2:55–60. [Men' T.Kh., Doroshenko M.B., Aliev M.D. Cutaneous malignant melanoma in children and adolescents: population-based epidemiological study. Sarkomy kostei, myagkikh tkanei i opukholi kozhi = Bone and soft tissue sarcomata; skin tumors 2011;2:55–60 (In Russ.)].
 - Мень Т.Х., Рыков М.Ю., Поляков В.Г. Злокачественные новообразования у детей в России: основные показатели и тенденции. Российский онкологический журнал 2015;20(2):43–7. [Men' T.Kh., Rykov M.Yu., Polyakov V.G. Malignant malformations in children in Russia: main indices and trends. Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal = Russian oncological journal 2015;20(2):43–7 (In Russ.)].
 - Livestro D.P., Kaine E.M., Michaelson J.S. et al. Melanoma in the young: differences and similarities with adult melanoma: a case-controlled analysis. Cancer 2007;110(3):614–24. DOI: 10.1002/cncr.22818.
 - Averbook B.J., Lee S.J., Delman K.A. et al. Pediatric melanoma: analysis of an international registry. Cancer 2013;119(22):4012–9. DOI: 10.1002/cncr.28289.
 - Clarkson K.S., Sturges I.C., Molyneux A.J. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). J Clin Pathol 2001;54(3):196–200. DOI: 10.1136/jcp.54.3.196.
 - Weinstein D., Leininger J., Hamby C., Safai B. Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. J Clin Aesthet Dermatol 2014;7(6):13–24.
 - Karagiannis P., Fittall M., Karagianis S.N. Evaluating biomarkers in melanoma. Front Oncol 2015;4:383. DOI: 10.3389/fonc.2014.00383.
 - Testa U., Castelli G., Pelosi E. Melanoma: genetic abnormalities, tumor progression, clonal evolution and tumor initiating cells. Med Sci (Basel) 2017;5(4):28. DOI: 10.3390/medsci5040028.
 - Барышников А.Ю., Тоневицкий А.Г. Моноклональные антитела в лаборатории и клинике. Глава 5.1. Моноклональные антитела aHLA1 (IC0 53) против мономорфных детерминант HLA-антигенов I класса. М., 1997:110–2. [Baryshnikov A.Yu., Tonevitsky A.G. Monoclonal antibodies in laboratory and clinic. Chapter 5.1. Monoclonal antibodies aHLA1 (IC0 53) against monomorphic determinants of HLA class I antigens. Moscow, 1997:110–2 (In Russ.)].
 - Uguen A., Talagas M., Costa S. et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. Diagn Pathol 2015;26(10):195. DOI: 10.1186/s13000-015-0431-9.
 - Jonjić N., Dekanić A., Glavan N. et al. Cellular blue nevus diagnosed following excision of melanoma: a challenge in diagnosis. Case Rep Pathol 2016;2016:8107671. DOI: 10.1155/2016/8107671.
 - Karim R.Z., Li W., Sanki A. et al. Reduced p16 and increased cyclin D1 and pRb expression are correlated with progression in cutaneous melanocytic tumors. Int J Surg Pathol 2009;17(5):361–7. DOI: 10.1177/1066896909336177.
 - Oba J., Nakahara T., Abe T. et al. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. J Dermatol Sci 2011;62(2):116–123. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2011.02.011.
 - Viray H., Bradley W.R., Schalper K.A. et al. Marginal and joint distribution of S100, HMB-45 and Melan-A across a large series of cutaneous melanomas. Arch Pathol Lab Med 2013;137(8):1063–73. DOI: 10.5858/arpa.2012-0284-OA.
 - Nybakken G.E., Sargen M., Abraham R. et al. MITF accurately highlights epidermal melanocytes in atypical intraepidermal melanocytic proliferations. Am J Dermatopathol 2013;35(1):25–9. DOI: 10.1097/DAD.0b013e31825666c3.
 - Li M., Zhang B., Sun B. et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. J Exp Clin Cancer Res 2010;29:109. DOI: 10.1186/1756-9966-29-109.
 - Ruiter D.J., Bhan A.K., Harrist T.J. et al. Major histocompatibility antigens and mononuclear inflammatory infiltrate in benign nevocytic proliferations and malignant melanoma. J Immunol 1982;129(6):2808–15.
 - Carretero R., Wang E., Rodriguez A.I. et al. Regression of melanoma metastases after immunotherapy is associated with activation of antigen presentation and interferon-mediated rejection genes. Int J Cancer 2012;131(2):387–395. DOI: 10.1002/ijc.26471.
 - Scalvenzi M., Palmisano F., Cacciapuoti S. et al. Giant congenital melanocytic naevus with proliferative nodules mimicking congenital malignant melanoma: a case report and review of the literature of congenital melanoma. Case Rep Dermatol Med 2013;2013:473635. DOI: 10.1155/2013/473635.
 - Волгарева Г.М., Завалишина Л.Э., Казубская Т.П. и др. Молекулярные подходы в диагностике пигментных новообразований кожи у детей: описание четырех случаев. Онкопедиатрия 2017;4(4):295–300. DOI: 10.15690/onco.v4i4.1816. [Volkareva G.M., Zavalishina L.E., Kazubskaya T.P. et al. Molecular approaches for the diagnostics of pediatric pigment skin malformations: four cases. Onkopediatria = Onkopediatrics 2017;4(4):294–300 (In Russ.)].

Вклад авторов

Г.М. Волгарева: разработка дизайна исследования, анализ данных литературы по теме статьи, написание рукописи;
 Т.С. Бельшева: получение клинических данных и их анализ, обсуждение и научное редактирование рукописи;
 Л.Э. Завалишина: участие в разработке дизайна иммуногистохимических исследований, анализ результатов иммуногистохимических тестов с антителами к циклину D1, белку p16^{INK4a}, HLA-антигенам I класса, обсуждение рукописи;
 Д.Б. Хестанов: участие в анализе клинических и лабораторных данных;
 О.С. Бурова: рекультивирование гибридомы, продуцирующей антитела ИКО 53 к HLA-антигенам I класса; получение асцита, содержащего эти антитела, получение препаратов, окрашенных этими антителами;
 Я.В. Вишневская: получение и анализ данных классического морфологического исследования, анализ результатов иммуногистохимических тестов с остальными антителами.
 М.Д. Алиев: обсуждение специфики пигментных новообразований кожи у детей и подходов к их диагностике, участие в анализе клинических данных, обсуждение рукописи.

Authors' contributions

G.M. Volgareva: study design development, analysis of literature data on the subject, manuscript preparation;

T.S. Belysheva: clinical data obtaining and analysis, manuscript discussing and assembling;

L.E. Zavalishina: participation in immunohistochemical study design development, data analysis on detection of p16^{INK4a}, cyclin D1 and HLA class I antigens; manuscript debating;

D.B. Khestanov: participation in clinical and laboratory data analysis;

O.S. Burova: recultivation of hybridoma producing antibodies ICO 53 against HLA class I antigens, obtaining of these antibodies in a form of ascitic fluid, obtaining ICO 53 – stained slides;

Ya.V. Vishnevskaya: obtaining and analysis of classical morphological data investigation, data analysis obtained by immunohistochemical staining with all the rest antibodies used;

M.D. Aliev: discussing of pediatric pigment skin malformations specific features and approaches to their diagnostics. participating in clinical data analysis, manuscript discussion.

ORCID авторов/ORCID of authors

Г.М. Волгарева/G.M. Volgareva: <https://orcid.org/0000-0002-6817-2103>

Л.Э. Завалишина/L.E. Zavalishina: <https://orcid.org/0000-0002-0677-7991>

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

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: 20.06.2018. **Принята в печать:** 05.08.2019.

Article received: 20.06.2018. **Accepted for publication:** 05.08.2019.

