

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



Russian Journal
of Biotherapy

4

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

4^{ТОМ 18}
'19

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 Т.Н. Помилуйко
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. № 4. 1–92
© 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>



XI СЪЕЗД ОНКОЛОГОВ
И РАДИОЛОГОВ
СТРАН СНГ И ЕВРАЗИИ
2020 | казань

kazan-onco2020.com



Организаторы



Соорганизаторы



**23-25
Апреля
2020**

XI СЪЕЗД ОНКОЛОГОВ И РАДИОЛОГОВ СТРАН СНГ И ЕВРАЗИИ

 ГТРК «Корстон-Казань», г. Казань, ул. Н.Ершова, д. 1а

Реклама



Технический организатор:
Агентство поддержки медицинских инициатив

Тел.: +7 (495) 988-89-92 | E-mail: info@medbymed.ru

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). 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

4 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 T.N. Pomiluyko
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 4. 1–92
© 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>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Д.Ж. Мансорунов, А.А. Алимов, Н.В. Апанович, А.Ю. Кузеванова, Т.А. Богуш, И.С. Стилиди, А.В. Карпухин</i> Иммуноterapia рака желудка	6
<i>Д.Л. Ротин, О.В. Паклина, И.О. Тинькова, Д.Н. Греков</i> Микросателлитная нестабильность и карцинома желудка. Обзор литературы	17
<i>О.А. Бочарова, Е.В. Бочаров, В.Г. Кучеряну, Р.В. Карпова, А.А. Вершинская</i> Дофаминергическая система: стресс, депрессия, рак (часть 2)	25
<i>И.В. Дармов, Я.А. Кибирев, И.В. Маракулин, С.Н. Янов</i> Использование бактерий для лечения онкологических заболеваний (обзор)	34
<i>А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, Е.М. Чевкина</i> Неканоническая активность ретиноевой кислоты как возможный механизм формирования резистентности злокачественных клеток к ретиноидной терапии	43
<i>С.В. Чулкова, Д.А. Рябчиков, И.А. Дудина, А.М. Казаков, А.В. Егорова, К.С. Титов, М.Н. Хагажеева, И.А. Гладилина, З.М. Галаева, Н.В. Лепкова, Н.Н. Тупицын</i> Перспективы использования микроРНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров меланомы	51

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Т.Л. Ушакова, И.С. Долгополов, З.А. Соколова, Г.З. Чкадуа, Н.С. Титов, Ю.М. Букреев, Ю.А. Серов, О.В. Горовцова, Д.А. Булетов, Н.А. Козлов, В.Г. Поляков</i> Экспериментальная модель иммунотерапии ретинобластомы	57
<i>Г.З. Чкадуа, А.А. Борунова, И.Б. Шоуа, И.С. Долгополов, Р.И. Пименов, И.Н. Михайлова, Т.Н. Заботина, М.А. Барышникова</i> Криоконсервация дендритных клеток человека для клинического применения	65
<i>М.А. Барышникова, А.А. Рудакова, З.С. Соколова, О.С. Бурова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков</i> Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для создания модели противомеланомной вакцины	76
<i>А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина, З.Г. Кадагидзе, О.В. Короткова, А.И. Черткова, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, Н.Н. Петенко, Л.В. Демидов, И.Н. Михайлова</i> Увеличение количества НКТ-клеток — маркер раннего прогрессирования при адьювантной вакциноtherпии пациентов с метастатической меланомой кожи	82

REVIEWS

<i>D.Zh. Mansorunov, A.A. Alimov, N.V. Apanovich, A. Yu. Kuzevanova, T.A. Bogush, I.S. Stilidi, A.V. Karpukhin</i> Gastric cancer immunotherapy	6
<i>D.L. Rotin, O.V. Paklina, I.O. Tin'kova, D.N. Grekov</i> Microsatellite instability and gastric carcinoma. Review of the literature	17
<i>O.A. Bocharova, E.V. Bocharov, V.G. Kucheryanu, R.V. Karpova, A.A. Vershinskaya</i> Dopaminergic system: stress, depression and cancer (part 2).	25
<i>I.V. Darmov, Ya.A. Kibirev, I.V. Marakulin, S.N. Yanov</i> Use of bacteria in cancer therapy (review)	34
<i>A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, M.E. Akselrod, E.M. Tchevkina</i> Non-canonical activity of retinoic acid as a possible mechanism of retinoid resistance in cancer therapy	43
<i>S.V. Chulkova, D.A. Ryabchikov, I.A. Dudina, A.M. Kazakov, A.V. Egorova, K.S. Titov, M.N. Khagazheeva, I.A. Gladilina, Z.M. Galaeva, N.V. Lepkova, N.N. Tupitsyn</i> The prospects for the use of microRNA as diagnostic and prognostic melanoma biomarkers	51

ORIGINAL REPORTS

<i>T.L. Ushakova, I.S. Dolgoplov, Z.A. Sokolova, G.Z. Chkadua, N.S. Titov, Yu.M. Bukreev, Yu.A. Serov, O.V. Gorovisova, D.A. Buletov, N.A. Kozlov, V.G. Polyakov</i> Experimental immunotherapy model of retinoblastoma	57
<i>G.Z. Chkadua, A.A. Borunova, I.B. Shoua, I.S. Dolgoplov, R.I. Pimenov, I.N. Mikhailova, T.N. Zabolina, M.A. Baryshnikova</i> Cryopreservation of human dendritic cells for clinical use	65
<i>M.A. Baryshnikova, A.A. Rudakova, Z.A. Sokolova, O.S. Burova, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov</i> Evaluation of the antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model.	76
<i>A.A. Borunova, G.Z. Chkadua, T.N. Zabolina, Z.G. Kadagidze, O.V. Korotkova, A.I. Chertkova, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova, E.K. Shoua, N.N. Petenko, L.V. Demidov, I.N. Mikhailova</i> Increase in NKT cells – a marker of early progressing at adjuvant vaccinotherapy of patients with a metastatic melanoma of skin.	82

ИММУНОТЕРАПИЯ РАКА ЖЕЛУДКА

Д.Ж. Мансорунов¹, А.А. Алимов¹, Н.В. Апанович¹, А.Ю. Кузеванова¹, Т.А. Богуш²,
И.С. Стилиди², А.В. Карпукхин¹

¹ФГБНУ «Медико-генетический научный центр им. академика Н.П. Бочкова»;

Россия, 115522 Москва, ул. Москворечье 1;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Данзан Жаргалович Мансорунов gah3ah@gmail.com

Рак желудка (РЖ) занимает 5-е место среди злокачественных новообразований по заболеваемости в мире. Смертность от РЖ высока, так как в большинстве случаев заболевание диагностируется на поздних стадиях, с отдаленными метастазами, 5-летняя выживаемость больных РЖ не превышает 25–30 %. Стандартом терапии РЖ является хирургическое вмешательство с химиотерапией. На поздних стадиях РЖ наблюдается высокая резистентность к химиотерапии, в связи с чем существует острая необходимость в принципиально новой терапии. В последнее время активно проводятся исследования терапии РЖ ингибиторами контрольных точек иммунитета. На данный момент наиболее изучены моноклональные антитела против PD-1 (Programmed cell death 1, CD279)/PD-L1 (Programmed death-ligand 1, CD274), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD152). В статье рассмотрены характеристики молекул PD-1, PD-L1, CTLA-4 и их значение в супрессии Т-клеточного ответа, а также противоопухолевый эффект ингибиторов контрольных точек иммунитета. Проанализированы результаты клинических исследований терапии РЖ моноклональными антителами против PD-1/PD-L1, CTLA-4. Ингибиторы контрольных точек иммунитета находят применение как в качестве первой, так и последующих линий терапии. Отрицательной стороной иммунотерапии являются иммуноопосредованные нежелательные явления, которые могут поражать ткани почек, сердца, желудочно-кишечного тракта, печени, легких, кожи, эндокринных желез. Рассмотрены биомаркеры эффективности терапии РЖ ингибиторами контрольных точек иммунитета, среди которых можно выделить экспрессию PD-L1, микросателлитную нестабильность, профиль экспрессии генов, мутационную нагрузку опухоли и состав микробиоты кишечника.

Ключевые слова: иммунотерапия, рак желудка, PD-1, PD-L1

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-06-16

GASTRIC CANCER IMMUNOTHERAPY

D.Zh. Mansorunov¹, A.A. Alimov¹, N.V. Apanovich¹, A.Yu. Kuzevanova¹, T.A. Bogush², I.S. Stilidi², A.V. Karpukhin¹

¹Bochkov Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorechye St., Moscow 115522, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;

24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia

Gastric cancer (GC) takes 5th place among the malignant neoplasms by incidence in the world. Mortality from GC is high, since in most cases the disease is diagnosed in the late stages, with distant metastases, the five-year survival in GC does not exceed 25–30 %. The standard for GC therapy is surgery with chemotherapy. There is a high resistance to chemotherapy in the late stages of GC, and this circumstance requires a fundamentally new therapy. Recently, studies have been actively conducted on the therapy of GC with the immune control point inhibitors. At the moment, the most studied are monoclonal antibodies against PD-1 (Programmed cell death 1, CD279)/PD-L1 (Programmed death-ligand 1, CD274), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD152). The article discusses the characteristics of PD-1, PD-L1, CTLA-4 molecules and their significance in suppressing the T-cell response, as well as the antitumor effect of immune control point inhibitors. The results of clinical studies of GC therapy with monoclonal antibodies against PD-1/PD-L1, CTLA-4 were analyzed. The immune control point inhibitors are used as both first-line therapy and subsequent ones. The negative side of immunotherapy is immune-mediated adverse events that can affect the tissues of the kidneys, heart, gastrointestinal tract, liver, lungs, skin and endocrine glands. Biomarkers of the effectiveness of the immune control point inhibitors for GC are considered, among which one can distinguish PD-L1 expression, microsatellite instability, gene expression profile, tumor mutational load and composition of the intestinal microbiome.

Key words: immunotherapy, gastric cancer, PD-1, PD-L1

Введение

Рак желудка (РЖ) является одним из самых распространенных злокачественных новообразований, занимающая 5-е место в мире по заболеваемости. Ежегодно в мире регистрируют около 1 млн случаев РЖ, в России зарегистрировано более 37 тыс. в 2017 г. [1]. Смертность от РЖ составляет свыше 700 тыс. в год, так как в большинстве случаев заболевание диагностируют на поздних стадиях, с отдаленными метастазами [2].

Хирургическое вмешательство в комбинации с химиотерапией является стандартом лечения РЖ. На поздних стадиях РЖ пациентам проводится в основном консервативная терапия. На данный момент комбинированные схемы химиотерапии предпочтительнее, так как при их применении показатели общей выживаемости (ОВ) и частоты объективного ответа выше в сравнении с монотерапией. Тем не менее комбинированные схемы химиотерапии не показывают обнадеживающих результатов, поскольку их эффективность ограничена, а токсичность высока. Прогноз для больных РЖ остается неблагоприятным, 5-летняя выживаемость не превышает 25–30 %. Таким образом, существует необходимость внедрения в клиническую практику более эффективных противоопухолевых препаратов. В последнее время наиболее перспективным нововведением в терапии злокачественных новообразований стала терапия ингибиторами контрольных точек иммунитета, которая показала высокую эффективность лечения многих типов опухолей, в том числе при РЖ.

Иммунологические контрольные «точки» (ИКТ) — это система ингибиторных механизмов, которые регулируют активацию иммунного ответа, препятствуя запуску аутоиммунных процессов, а также модулируют его, уменьшая вызванные иммунными клетками повреждения в органах и тканях [3]. Таким образом, ИКТ играют важную роль в поддержании физиологического гомеостаза. В норме рецепторы ИКТ экспрессируются на поверхности активированных Т-клеток, что формирует отрицательную обратную связь и ослабляет Т-клеточный ответ. Опухоли часто используют механизмы уклонения от иммунной системы, одним из которых является экспрессия на своей поверхности лигандов контрольных точек иммунитета. Для преодоления этого явления разработаны моноклональные антитела (МКА), блокирующие лиганды или рецепторы ИКТ, которые ингибируют негативную Т-клеточную стимуляцию, в результате чего развивается Т-клеточный ответ. Таким образом, противоопухолевый эффект достигается в результате активации собственной иммунной системы, а не посредством воздействия на опухолевые клетки. Поскольку описанный механизм универсален, ингибирование ИКТ МКА может иметь клинический эффект при лечении различных типов

опухолей. На данный момент наиболее изучены МКА против PD-1 (Programmed cell death 1, CD279)/PD-L1 (Programmed death-ligand 1, CD274), CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4, CD152), они применяются в качестве монотерапии или в составе комбинированной терапии для лечения РЖ и кардиоэзофагеального рака (КЭР).

Иммунологические контрольные точки PD-1/PD-L1

PD-1 представляет собой мембранный белок, биологическая функция которого заключается в поддержании Т-клеточного ответа в рамках физиологического диапазона. В ответ на цитолитическую и эффекторную функции Т-клеток рецептор PD-1 регулирует их активацию посредством взаимодействия со своими лигандами PD-L1 и -L2 (CD273), в результате чего запускается апоптоз CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [4]. Предполагается, что PD-1 после взаимодействия с PD-L1 и -L2 передает сигнал через тирозин-фосфатазу SHP2 (Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2) для ослабления активации Т-клеток. Активация SHP2 ингибирует сигнальный путь PI3K/Akt, посредством дефосфорилирования CD28, а также напрямую ослабляет передачу сигналов Т-клеточного рецептора (TCR) (см. рисунок). На существенную роль PD-1 в поддержании иммунной толерантности может указывать то, что при делециях в гене *Pdcd1*, кодирующем белок PD-1, развиваются аутоиммунные патологии, например волчаночноподобная аутоиммунная патология у старых мышей линии C57BL/6 и аутоиммунная дилатационная кардиомиопатия у мышей линии BALB/c [5].

PD-1 экспрессируется на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток. Стоит отметить высокую экспрессию PD-1 у регуляторных CD4⁺Foxp3⁺-Т-лимфоцитов и их значительную роль в супрессии иммунного ответа. Воспалительные цитокины, такие как интерферон γ (IFN- γ), интерлейкины (IL), имеющие общую γ -цепь (IL-2, -7, -15 и -21), могут усиливать экспрессию PD-1 [6]. В опухолевом микроокружении большая часть Т-клеток дифференцируется в истощенные Т-клетки, продуцирующие меньше эффекторных цитокинов и в меньшей степени способные элиминировать клетки опухоли. В них наблюдается повышенная экспрессия ингибиторных рецепторов, таких как PD-1, LAG-3 (lymphocyte activation gene 3 protein), TIM3 (T-cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 3), CTLA-4, BTLA (band T lymphocyte attenuator) и TIGIT (T-cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain) [7].

Лиганд PD-L1 экспрессируется на поверхности Т-, В-лимфоцитов, макрофагов, дендритных клеток и в некоторых тканях, например тканях плаценты.

Экспрессия PD-L1 усиливается IFN- γ , IL-4, -10, ростовыми факторами стволовых клеток, бактериальными липополисахаридами, эндотелиальным фактором роста (VEGF) и фактором, индуцируемым гипоксией 1- α . Помимо перечисленного, в клетках опухоли экспрессию PD-L1 могут активировать такие сигнальные пути, как IFN- γ /JAK2/IFN, ALK/STAT3, PI3K и MEK/ERK/STAT1 [8].

Противоопухолевый эффект блокады PD-1 МКА заключается в предотвращении опосредованного PD-1 ослабления передачи сигналов TCR, что у CD8⁺-Т-клеток увеличивает активацию, а у регуляторных Т-клеток уменьшает. С учетом универсальности данного механизма блокаторы PD-1 успешно применяются для лечения большого количества злокачественных новообразований, в том числе и РЖ. На данный момент проводится множество клинических исследований ингибиторов PD-1, демонстрирующих разный клинический эффект.

В исследовании KEYNOTE-012 впервые для лечения РЖ применено антитело против PD-1 пембролизумаб в качестве 2-й и последующих линий на поздних стадиях при метастатическом РЖ, экспрессирующем PD-L1 (PD-L1⁺). При частоте объективного ответа 22 % была достигнута медиана ОВ 11,4 мес [9].

Во II фазе исследования KEYNOTE-059 выделяются 3 когорты пациентов с РЖ/КЭР поздних стадий (см. таблицу). В 1-й когорте, самой многочисленной, находились под наблюдением 259 пациентов, получавших монотерапию пембролизумабом в качестве 3-й и последующих линий терапии. Медиана ОВ составила 5,6 мес. Указанные результаты исследования позволили получить в 2017 г. одобрение Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U.S. Food and Drug Administration) для применения пембролизумаба в качестве 3-й линии терапии метастатического РЖ/КЭР с экспрессией PD-L1 [10].

Клинические исследования ингибиторов контрольных точек иммунитета в качестве терапии РЖ/КЭР

Clinical trials of immune checkpoint inhibitors in GC/GEJC

Исследование Study	ФЗ Phase	Схема лечения Treatment regimen	Линия ХТ Chemo- therapy line	Биомаркер отбора Biomarker for selection	Часто- та ОО, % Overall response rate, %		ВБП, мес. PFS, mths	ОВ, мес OS, mths
ATTRACTION-02 (NCT02267343)	3	Ниволумаб vs плацебо Nivolumab vs placebo	≥2	—	11		1,6	5,3
					0		1,5	4,1
KEYNOTE-061 (NCT02370498)	3	Пембролизумаб vs паклитаксел Pembrolizumab vs paclitaxel	≥2	PD-L1 ⁺	16		1,5	9,1
					14		4,1	8,3
KEYNOTE-062 (NCT02494583)	3	Пембролизумаб Pembrolizumab	1	PD-L1 ⁺ HER2 ⁻	CPS ≥1	15	2	10,6
					CPS ≥10	25	2,9	17,4
		Пембролизумаб + цисплатин + 5-ФУ Pembrolizumab + cisplatin + 5-FU	1	PD-L1 ⁺ HER2 ⁻	CPS ≥1	49	6,9	12,5
					CPS ≥10	53	5,7	12,3
		Цисплатин + 5-ФУ Cisplatin + 5-FU	1	PD-L1 ⁺ HER2 ⁻	CPS ≥1	37	6,4	11,1
					CPS ≥10	38	6,1	10,8
KEYNOTE-059 (когорта 1 cohort 1) (NCT02335411)	2	Пембролизумаб Pembrolizumab	≥3	—	Общая: 12 Total: 12 PD-L1 ⁺ : 16 PD-L1 ⁻ : 6		Общая: 2,0 Total: 2.0 PD-L1 ⁺ : 2.1 PD-L1 ⁻ : 2.0	Общая: 5,6 Total: 5.6 PD-L1 ⁺ : 5.8 PD-L1 ⁻ : 4.9
KEYNOTE-059 (когорта 2 cohort 2) (NCT02335411)	2	Пембролизумаб + цисплатин + 5-ФУ или капецитабин Pembrolizumab + cisplatin + 5-FU or capecitabine	1	HER2 ⁻	Общая: 60 Total: 60 PD-L1 ⁺ : 69 PD-L1 ⁻ : 38		6,6	13,8

Окончание таблицы
The end of Table

Исследование Study	ФЗ Phase	Схема лечения Treatment regimen	Линия ХТ Chemo- therapy line	Биомаркер отбора Biomarker for selection	Часто- та ОО, % Overall response rate, %	ВБП, мес. PFS, mths	ОВ, мес OS, mths
KEYNOTE-059 (когорта 3 cohort 3) (NCT02335411)	2	Пембролизумаб Pembrolizumab	1	PD-L1 ⁺ HER2 ⁻	26	3,3	20,7
CheckMate 032 (NCT01928394)	1/2	N3: ниволумаб 3 мг/кг N3: nivolumab 3 mg/kg	≥2	—	N3 общая: 12 N3 total: 12 PD-L1 ⁺ : 19 PD-L1 ⁻ : 12	N3: 1,4	N3: 6,2
		N113: ниволу- маб 1 мг/кг + ипилиумаб 3 мг/кг N113: nivolumab 1 mg/kg + ipilimumab 3 mg/kg	≥2	—	N113 общая: 24 N113 total: 24 PD-L1 ⁺ : 40 PD-L1 ⁻ : 22	N113: 1,4	N113: 6,9
		N3I1: ниволу- маб 3 мг/кг + ипилиумаб 1 мг/кг N3I1: nivolumab 3 mg/kg + ipilimumab 1 mg/kg	≥2	—	N3I1 общая: 8 N3I1 total: 8 PD-L1 ⁺ : 23 PD-L1 ⁻ : 0	N3I1: 1,6	N3I1: 4,8
JAVELIN Solid Tumor (1-я линия 1 st line) (NCT01772004)	1b	Авелумаб Avelumab	1	—	Общая: 6,7 Total: 6,7 PD-L1 ⁺ : 7,7 PD-L1 ⁻ : 3,9	Общая: 2,8 Total: 2,8 PD-L1 ⁺ : 3,0 PD-L1 ⁻ : 2,7	Общая: 11,1 Total: 11,1 PD-L1 ⁺ : 15,9 PD-L1 ⁻ : 10,4
JAVELIN Solid Tumor (2-я линия 2 nd line) (NCT01772004)	1b	Авелумаб Avelumab	≥2	—	6,7	1,4	6,6
KEYNOTE-012 (NCT01848834)	1	Пембролизумаб Pembrolizumab	≥1	PD-L1 ⁺	22	1,9	11,4
KEYNOTE-098 (NCT02443324)	1	Рамуцирумаб + пембролизумаб Ramucirumab + pembrolizumab	1	—	14	5,6	—
			≥2	—	7	2,6	6,2

Примечание. 5-ФУ — 5-фторурацил; PD-L1 — запрограммированный лиганд гибели клетки; HER2 — 2-й рецептор фактора роста эпидермиса; CPS — комбинированный положительный балл.

Note. 5-FU — 5-fluorouracil; PD-L1 — Programmed death-ligand 1; HER2 — Human epidermal growth factor receptor 2; CPS — combined positive score.

В рандомизированном исследовании III фазы KEYNOTE-061 была исследована эффективность пембролизумаба в сравнении с паклитакселом у пациентов с метастатическим PD-L1⁺ РЖ/КЭР после 1-й линии химиотерапии (см. таблицу). Пембролизумаб не показал значительного улучшения эффективности лечения в сравнении с паклитакселом, поскольку медиана ОВ составила 9,1 мес vs 8,3 мес соответственно [11].

Альтернативным подходом к лечению пациентов с целью улучшения исхода заболевания с приемлемой токсичностью является адъювантная и неоадъювантная терапия РЖ II–III стадии. Применение ингибиторов PD-1 до метастазирования РЖ может усилить их иммуноопосредованный противоопухолевый эффект. В результате химиолучевой неоадъювантной терапии может быть индуцирована экспрессия PD-L1, возможно увеличение количества опухолеинфильтрирующих

лимфоцитов, что положительно влияет на эффективность ингибиторов PD-1. В рандомизированном исследовании CheckMate-577 III фазы 760 пациентов с РЖ/КЭР получали ингибитор PD-1 ниволумаб после химиолучевой терапии и операции. Результаты исследования на данный момент не опубликованы [12].

Менее активно ведутся исследования ингибиторов PD-L1, таких как авелумаб, дурвалумаб и атезолизумаб (см. таблицу). В фазе Ib исследования JAVELIN Solid Tumor 150 пациентов с РЖ/КЭР поздних стадий, поделенные на 2 группы (в качестве 1-й, 2-й и последующих линий терапии), получали монотерапию авелумабом. Частота объективного ответа была 6,7 % в 2 группах, при этом медиана ОВ в 1-й группе была 11,1 мес, во 2-й — 6,6 мес [13].

По данным приведенных исследований, у больных РЖ/КЭР поздних стадий с экспрессией PD-L1 частота объективного ответа и ОВ значительно выше, чем у лиц с опухолями без экспрессии PD-L1. Экспрессия PD-L1 и отсутствие экспрессии HER2 могут быть ассоциированы с повышенной частотой объективного ответа вне зависимости от схемы лечения. Например, во 2-й когорте больных исследования KEYNOTE-059 частота объективного ответа при применении пембролизумаба с химиотерапией достигает 69 % в случаях с экспрессией PD-L1, но без экспрессии HER2. В то же время в 3-й когорте исследования KEYNOTE-059 при монотерапии пембролизумабом РЖ/КЭР с экспрессией PD-L1, но без экспрессии HER2 частота объективного ответа составляет 26 % [14]. Исследование KEYNOTE-062, в котором изучали в качестве 1-й линии монотерапию пембролизумабом, комбинация пембролизумаба с химиотерапией и химиотерапия показали схожие результаты по частоте объективного ответа и показателям выживаемости [15]. Терапия ингибиторами ИКТ в качестве 1-й линии повышает медиану ОВ, в приведенных исследованиях ее значение составляет от 10,6 мес в исследовании KEYNOTE-062 до 20,7 мес в 3-й когорте исследования KEYNOTE-059. При применении ингибиторов ИКТ в качестве 2-й и последующих линий терапии медиана ОВ варьирует от 4,8 мес в исследовании CheckMate 032 до 9,1 мес в исследовании KEYNOTE-061.

Иммунологическая контрольная точка CTLA-4

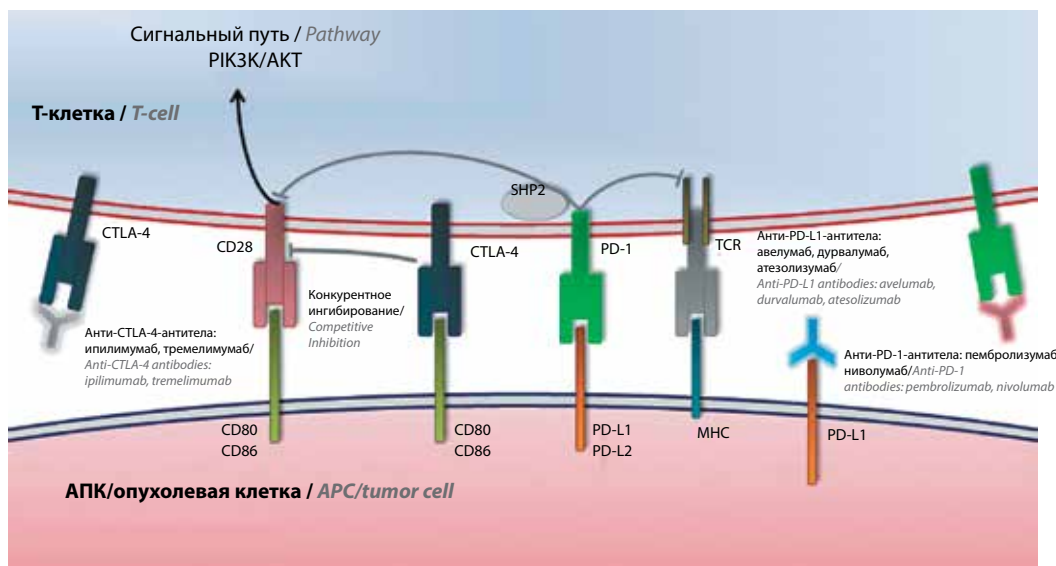
Рецептор CTLA-4 также связан с регулированием Т-клеточного ответа. Активация TCR индуцирует экспрессию CTLA-4, что приводит к ослаблению передачи сигнала TCR. Данный процесс происходит посредством конкуренции с костимулирующей молекулой CD28 за лиганды CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), к которым у CTLA-4 более высокая аффинность по сравнению с CD28 [16]. Отличие заключается в том, что CD28 активирует Т-клеточный ответ, а CTLA-4 ингибирует.

Содержащийся во внутриклеточных везикулах CTLA-4 при активации Т-клетки доставляется в иммунологический синапс, при этом скорость доставки коррелирует с силой сигнала TCR. В иммунологическом синапсе CTLA-4 связывается с CD80/CD86, тем самым вытесняя CD28 (см. рисунок). Таким образом, CTLA-4 ослабляет опосредованную CD28 позитивную костимуляцию, что приводит к снижению активности Т-клеток. Для терапии злокачественных опухолей МКА против CTLA-4 основными механизмами являются блокада CTLA-4 и дальнейшее связывание освободившихся лигандов CD80/CD86 с CD28, вызывающее активацию Т-клеток. Блокада CTLA-4 приводит к экспансии CD8⁺-Т-клеток в микроокружении опухоли, но не во вторичных лимфоидных органах [5]. Для монотерапии РЖ/КЭР МКА против CTLA-4 тремелимумабом в качестве 2-й и последующих линий объективный ответ был зарегистрирован лишь у 1 из 18 пациентов, хотя его длительность достигла 32,7 мес. В целом монотерапия тремелимумабом оказывает большую токсичность и меньшую эффективность, чем терапия против PD-1/PD-L1 [17].

Ингибиторы контрольных точек иммунитета в составе комбинированной терапии

Несмотря на значительный прогресс в лечении РЖ, достигнутый с помощью монотерапии ингибиторами ИКТ, терапевтическая эффективность иммунотерапии ограничена вследствие компенсаторной активации других сигнальных путей. В настоящее время в онкологии наблюдается высокий интерес к исследованиям комбинаций ингибиторов ИКТ с другими методами лечения для достижения лучшего противоопухолевого эффекта. Наиболее активно исследуются МКА против PD-1/PD-L1 в комбинации с химиотерапией, антиангиогенной терапией, МКА против CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3), IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase).

В исследовании CheckMate 032 изучена комбинированная терапия МКА против PD-1 и CTLA-4 в качестве 2-й и последующих линий терапии РЖ/КЭР поздних стадий (см. таблицу). В этом исследовании пациенты делились на 3 когорты в зависимости от получаемой терапии: 1) ниволумаб (анти-PD-1) (3 мг/кг); 2) ниволумаб (1 мг/кг) + ипилимумаб (анти-CTLA-4) (3 мг/кг); 3) ниволумаб (3 мг/кг) + ипилимумаб (1 мг/кг). Комбинированная терапия не показала обнадеживающих результатов в сравнении с монотерапией ниволумабом, поскольку медиана выживаемости в 1-й когорте составляла 6,2, во 2-й — 6,9, а в 3-й — 4,8 мес. Эти данные ставят под сомнение целесообразность применения комбинированной терапии ниволумаб + ипилимумаб у предлеченных пациентов с РЖ/КЭР [18].



Механизм взаимодействия рецепторов PD-1 и CTLA-4 со своими лигандами. Взаимодействие PD-1 с PD-L1 и PD-L2 активирует тирозин-фосфатазу SHP2, которая ингибирует сигнальный путь PI3K/Akt и передачу сигналов T-клеточного рецептора (TCR). CTLA-4 вытесняет CD28 и связывается с лигандами CD80 и CD86, что приводит к снижению активности T-клеток. Ингибиторы контрольных точек иммунитета, связываясь с рецептором или лигандом, препятствуют взаимодействию рецептор–лиганд и этим способствуют усилению T-клеточного иммунного ответа. АПК – антигенпрезентирующая клетка

The mechanism of PD-1 and CTLA-4 receptor interaction with their ligands. The interaction of PD-1 with PD-L1 and PD-L2 activates SHP2 tyrosine phosphatase, which inhibits the PI3K/Akt signaling pathway and T cell receptor (TCR) signaling. CTLA-4 displaces CD28 and binds with CD80 and CD86 ligands, resulting in decreased T-cell activity. Immune checkpoint inhibitors bind to the receptor or ligand and block the receptor–ligand interaction, that contribute to the enhancing of the T-cell immune response. APC – antigen-presenting cell

Проводится множество исследований ингибиторов ИКТ в сочетании с химиотерапией. Например, во 2-й когорте исследования KEYNOTE-059 25 пациентов с HER2⁺ РЖ/КЭР поздних стадий получали лечение пембролизумабом в комбинации с химиотерапией 5-ФУ/цисплатином в качестве 1-й линии (см. таблицу). Частота объективного ответа составляла 69 % у PD-L1⁺, 38 % у PD-L1⁻, медиана выживаемости достигла 13,8 мес. Однако не совсем ясен механизм взаимодействия ингибиторов ИКТ и химиотерапевтических препаратов, что является предметом дальнейших исследований [14].

В последнее время исследуются схемы комбинированной терапии ингибиторами ИКТ и антиангиогенными препаратами, поскольку неоангиогенез играет важную роль в развитии опухолей, и ингибирование разных сигнальных путей может дать синергетический эффект. Среди антиангиогенных препаратов наиболее активно исследуются МКА против VEGF/VEGFR. Исследование 1-й фазы KEYNOTE-098, в котором изучали комбинации пембролизумаба (анти-PD-1) с рамцирумабом (анти-VEGFR2), не привело к обнадеживающим результатам, так как при применении в качестве 2-й и последующих линий медиана выживаемости достигла 6,2 мес (см. таблицу) [19].

Несмотря на множество положительных результатов, у комбинированной терапии, включающей ингибиторы ИКТ, имеются и минусы, среди которых

повышение риска возникновения иммуноопосредованных нежелательных явлений и токсичности комбинированной терапии, что существенно ограничивает ее применение [20].

Дополнительные контрольные точки иммунитета

Помимо PD-1/PD-L1 и CTLA-4 на регуляцию T-клеточного ответа оказывают влияние множество молекул, подразделяющихся на 2 группы: 1) костимуляторы OX40, GITR, 4-1BB, CD40, CD27 и ICOS; 2) коингибиторы LAG3, TIM3, TIGIT и VISTA. Эти белки входят в суперсемейства иммуноглобулина и фактора некроза опухоли [5]. Механизм их действия не до конца ясен, а терапевтический потенциал на данный момент активно изучается. Проводятся клинические исследования комбинированной терапии РЖ антителами против LAG-3 (Lymphocyte-activation gene 3) с блокаторами PD-1, CTLA-4. Дополнительным способом усилить противоопухолевый ответ является комбинация ингибиторов ИКТ с антителами-агонистами, активирующими костимуляторные рецепторы на поверхности T-клеток. Например, исследуется комбинация ниволумаба с антителом-агонистом GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) для лечения РЖ поздних стадий [21]. Для дальнейшего улучшения эффективности терапии позднего РЖ существует необходимость более глубокого исследования ИКТ.

Ингибиторы ИКТ являются одним из многообещающих открытий последних лет в терапии онкологических заболеваний. В целом они показали свою эффективность лечения РЖ/КЭР. В настоящее время проводится большое количество исследований ингибиторов ИКТ в качестве терапии РЖ. Среди наиболее перспективных выделяют их комбинации с таргетными препаратами и химиотерапией. К сожалению, в силу многих обстоятельств терапия ингибиторами ИКТ не имеет клинического эффекта у большого числа пациентов с РЖ/КЭР. В связи с этим иммунотерапию необходимо назначать пациентам, отобраным с учетом различных свойств опухоли.

Биомаркеры эффективности блокаторов иммунных контрольных точек при раке желудка

Злокачественные новообразования желудка имеют разные гистологические и молекулярные характеристики, которые могут определять эффективность ответа на терапию ингибиторами ИКТ. Исследование этих характеристик необходимо для более широкого внедрения иммунотерапии.

Экспрессия PD-L1 является одним из самых исследуемых предиктивных биомаркеров ответа пациента на лечение блокаторами PD-1/PD-L1. PD-L1 экспрессируется примерно в 30 % случаев РЖ и КЭР, но не экспрессируется в ткани желудка в норме [22]. Было обнаружено, что экспрессия PD-L1 коррелирует с глубиной инвазии опухоли, размером опухоли, метастазированием в лимфоузлы и отдаленные органы, наличием в опухоли вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), микросателлитной нестабильности. Оценку экспрессии PD-L1 на опухолевых клетках осуществляют при помощи таких методов, как иммуногистохимия, проточная цитометрия и полимеразная цепная реакция в реальном времени [23]. Как правило, используют метод иммуногистохимии, применяя антитела против PD-L1 с окрашиванием мембран как опухолевых, так и иммунных клеток. При этом экспрессия PD-L1 определяется при помощи комбинированного положительного балла (CPS), который является отношением количества клеток опухоли, лимфоцитов и макрофагов с экспрессией PD-L1 к общему числу опухолевых клеток, выраженному в процентах [24]. В разных исследованиях минимальный порог комбинированного положительного балла варьирует от >1 до >50 %. У опухолей с экспрессией PD-L1 частота объективного ответа значительно выше, чем у опухолей без экспрессии PD-L1. Например, в 1-й когорте исследования KEYNOTE-059 частота объективного ответа была 16 % у опухолей PD-L1⁺ и 6 % у PD-L1⁻ [10]. Поскольку на сегодняшний день данные об экспрессии PD-L1 в качестве предиктивного маркера эффективности иммунотерапии противоречивы, существует необходимость в исследовании дополнительных предиктивных биомаркеров.

В 2014 г. исследователями The Cancer Genome Atlas (TCGA) были определены 4 подтипа РЖ и КЭР, связанных с молекулярными особенностями опухоли. Исследование проводили на 295 образцах РЖ и КЭР, используя различные геномные и молекулярные методы. На основании этих данных выделены следующие подтипы: опухоли, ассоциированные с ВЭБ⁺, опухоли с микросателлитной нестабильностью (MSI); опухоли без геномной нестабильности и опухоли с хромосомной нестабильностью [25].

В свою очередь, The Asian Cancer Research Group разработала альтернативную классификацию, в которой также выделяют 4 подтипа РЖ: опухоли с MSI, опухоли без MSI и без мутации в TP53 (MSS/TP53⁻), опухоли без MSI, содержащие клетки в состоянии эпителиально-мезенхимальной трансформации (EMT/MSS); опухоли без MSI, с инактивирующей мутацией в TP53 (MSS/TP53⁺) [26].

Вышеуказанные классификации могут использоваться при прогнозировании эффективности иммунотерапии РЖ ингибиторами ИКТ. Более чувствительны к терапии PD-1/PD-L1-блокаторами опухоли, ассоциированные с ВЭБ-инфекцией, и РЖ с MSI, присутствующий в обеих классификациях [27].

Примерно 10 % случаев РЖ ассоциировано с ВЭБ-инфекцией. При этом подтипе РЖ выявлены выраженная лимфоидная инфильтрация стромы и высокая плотность опухолеинфильтрирующих лимфоцитов. РЖ, ассоциированный с ВЭБ⁺, с высокой частотой случаев возникает на слизистой оболочке дна и тела желудка. При ВЭБ-подтипе РЖ индуцируются Т-клеточный ответ и повышение экспрессии PD-L1 и -L2, прогноз для данного подтипа РЖ благоприятнее, чем для остальных подтипов РЖ [28].

Также одним из потенциальных маркеров является MSI. Она обнаруживается примерно в 25 % случаев РЖ. MSI возникает из-за мутаций в генах системы репарации неспаренных оснований, таких как *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* или *PMS2* [29]. В результате в опухоли накапливается на порядок больше соматических мутаций в отличие от опухолей с неизменной системой репарации. Это приводит к образованию неоантигенов на поверхности опухолевой клетки, что является причиной повышенной иммуногенности. Также в опухолях с MSI наблюдается большее количество опухолеинфильтрирующих лимфоцитов. В исследовании KEYNOTE-059 было обнаружено, что в РЖ с MSI повышена экспрессия PD-L1, а ответ на терапию PD-1-ингибиторами был лучше, чем РЖ без MSI [10].

В РЖ с хромосомной нестабильностью или с геномной стабильностью, в совокупности составляющих приблизительно 65 % всех случаев РЖ, гиперэкспрессия PD-L1 не обнаружена, более того, наблюдается низкая частота объективного ответа на терапию PD-1/PD-L1-ингибиторами.

Помимо экспрессии PD-L1, маркером эффективности иммунотерапии может быть профиль экспрессии генов, связанных с иммунным ответом. Поскольку IFN- γ является ключевым цитокином, вырабатываемым активированными Т-клетками, была исследована экспрессия генов, ассоциированных с его сигнальным путем, в 9 типах солидных опухолей. В результате обнаружен IFN- γ -ассоциированный профиль экспрессии 10 генов (*IFNG*, *STAT1*, *CCR5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *IDO1*, *PRF1*, *GZMA*, *MHCII HLA-DRA*), повышенная экспрессия которых ассоциирована с увеличением частоты объективного ответа на ингибирование PD-1 [30]. Также в исследовании KEYNOTE-028 изучали корреляцию эффективности применения пембролизумаба в соответствии с профилем экспрессии 18 генов Т-cell – *inflamed* 20 типов солидных опухолей. В этот профиль входят гены, связанные с цитолитической активностью, презентацией антигенов, провоспалительные цитокины, маркеры Т-клеток, иммуномодуляторные факторы. Наблюдалась повышенная частота объективного ответа при высоком уровне экспрессии отдельных генов, включая PD-L1 [31].

Мутационная нагрузка опухоли потенциально может быть маркером чувствительности к ингибиторам ИКТ. Опухоли с соматическими мутациями в генах репарации ДНК имеют более высокую мутационную нагрузку по сравнению с «диким» типом, что влечет за собой возникновение неоантигенов и усиленный иммунный ответ [32]. Исследование мутационной нагрузки опухоли проводят методом массового параллельного секвенирования, подразделяя ее на 3 группы: низкая (1–5 мутаций на 1 млн пар оснований), средняя (6–19 мутаций на 1 млн пар оснований), высокая (>20 мутаций на 1 млн пар оснований) [33]. В опухолях желудка выделяют 5 наиболее часто мутирующих генов: *TP53* (59,09 %), *DRD2* (14,29 %), *CDH1* (13,64 %), *AKAP9* (14,93 %), *ATM* (11,69 %), также показана высокая корреляция между мутациями в гене *TP53* и мутационной нагрузкой опухоли [32]. Среди множества типов опухолей более высокая частота объективного ответа на терапию антителами против PD-1/PD-L1 наблюдается у опухолей с высокой мутационной нагрузкой [34]. Одним из факторов возникновения РЖ является *Helicobacter pylori*, вызывающая хроническое воспаление слизистой оболочки желудка. Инфицированные *H. pylori* в 1–3 % случаев заболевают РЖ. Показано, что *H. pylori* участвует в активации костимуляторных молекул CD80/CD86 в эпителиальных клетках желудка, вследствие чего индуцируется Т-клеточный ответ. В опухолях, ассоциированных с *H. pylori*, повышена экспрессия PD-L1, что может указывать на потенциальную эффективность применения ингибиторов PD-1/PD-L1 [35].

Существуют предиктивные маркеры, не относящиеся непосредственно к опухоли. Одним из них является микробиом кишечника. Показано, что у больных меланомой с превалированием бактерий *Ruminococcaceae* и *Faecalibacterium* в составе микробиома кишечника повышены противоопухолевый иммунный ответ и эффективность иммунотерапии, что выражается в увеличении ОБ. С другой стороны, при повышенном количестве бактерий порядка *Bacteroidales* наблюдается снижение противоопухолевого иммунитета. В последнее время активно исследуется возможность модулировать противоопухолевую эффективность ингибиторов ИКТ посредством изменения состава микробиома кишечника [36].

Нежелательные явления

Несмотря на преимущества терапии ингибиторами ИКТ, она обладает рядом недостатков. Одним из них выступает наличие серьезных нежелательных явлений. Самые частые нежелательные явления, связанные с лечением ИКТ: усталость, скелетно-мышечные боли, снижение аппетита, зуд, диарея, тошнота и сыпь. Частота встречаемости серьезных нежелательных явлений при применении монотерапии ингибиторов PD-1/PD-L1 у пациентов с РЖ и КЭР колеблется от 10 до 20 %, при этом наиболее часто встречаются усталость, анемия, повышение уровня аспартат- и аланинаминотрансферазы [21].

Так как терапия ингибиторами ИКТ направлена на механизмы, препятствующие поражению собственных тканей иммунной системой, возникают иммуноопосредованные нежелательные явления, которые могут поражать ткани почек, сердца, желудочно-кишечного тракта, печени, легких, кожи, эндокринных желез [37]. В клинических исследованиях у пациентов с РЖ и КЭР наиболее частыми серьезными иммуноопосредованными нежелательными явлениями были колит и пневмонит. При терапии антителами против CTLA-4 и комбинированной терапии частота нежелательных явлений выше в сравнении с монотерапией антителами против PD/PD-L1 [38]. У небольшого числа пациентов нежелательные явления приводили к длительным осложнениям и даже летальному исходу.

Заключение

Ингибиторы ИКТ являются важным достижением последних лет в противоопухолевой терапии. Терапия некоторых злокачественных новообразований ингибиторами ИКТ показывает обнадеживающие результаты, значительно улучшая прогноз пациентов. Ингибирование ИКТ в качестве терапии РЖ поздних стадий целесообразно, поскольку зачастую РЖ резистент к химиотерапии. В числе применяемых ингибиторов ИКТ значится пембролизумаб, который одобрен FDA

в 2017 г. по результатам исследования KEYNOTE-059 в качестве 3-й линии терапии метастатического РЖ/КЭР с экспрессией PD-L1. Также с участием пациентов, больных РЖ, проводится большое количество клинических исследований других схем терапии, включающих ингибиторы ИКТ. Среди наиболее перспективных выделяют их комбинации с таргетными препаратами и химиотерапией. Вместе с тем необходим поиск различных биомаркеров эффективности ингибиторов ИКТ для достижения лучших результатов лечения. Помимо экспрессии

PD-L1 и MSI имеется множество других перспективных биомаркеров, среди которых можно выделить профиль экспрессии генов и мутационную нагрузку опухоли, состав микробиома кишечника. Отдельно стоит отметить микробиом кишечника, так как изменение его состава может привести к повышению эффективности иммунотерапии. Более того, большого внимания заслуживает микроокружение опухоли, поскольку оно оказывает значительное влияние на противоопухолевый иммунный ответ.

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

1. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow: P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Center, Ministry of Health of Russia, 2018. 250 p. (In Russ.)].
2. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M. et al. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012; I.O.IARC CancerBase No. 11 Available at: <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/GLOBOCAN-2012-Estimated-Cancer-Incidence-Mortality-And-Prevalence-Worldwide-In-2012-V1.0-2012>.
3. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммунотерапия опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов»). Медицинская иммунология 2015;17(5):395–406. DOI: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406. [Bogolyubova A.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Cancer immunotherapy based on the blockade of immune checkpoints. Medical Immunology 2015;17(5):395–406. (In Russ.)].
4. Latchman Y., Wood C.R., Chernova T. et al. PD–L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. Nat Immunol 2001;2(3):261–8. DOI: 10.1038/85330.
5. Spencer C.W., Colm R.D., James P.A. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. Cancer Discov 2018;8(9):1069–86. DOI: 10.1158/2159–8290.CD-18–0367.
6. Massari F., Antoni M., Ciccamese C. et al. PD-1 blockade therapy in renal cell carcinoma: current studies and future promises. Cancer Treat Rev 2015;41(2):114–21. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014.12.013.
7. Jiang Y., Li Y., Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. Cell Death Dis 2015;18(6):1792. DOI: 10.1038/cddis.2015.162.
8. Dong Y., Sun Q., Zhang X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. Oncotarget 2017;8(2):2171–86. DOI: 10.18632/oncotarget.13895.
9. Muro K., Chung H.C., Shankaran V. et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. Lancet Oncol 2016;17(6):717–26. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)00175-3.
10. Fuchs C.S., Doi T., Jang R.W. et al. Safety and efficacy of pembrolizumab monotherapy in patients with previously treated advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: phase 2 clinical KEYNOTE-059 trial. JAMA Oncol 2018;4(5):180013. DOI: 10.1001/jamaoncol.2018.0013.
11. Shitara K., Özgüroğlu M., Bang Y.J. et al. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. Lancet 2018;392(10142):123–33. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31257-1.
12. Kelly R.J., Lockhart A.C., Jonker D.J. et al. CheckMate 577: A randomized, double-blind, phase 3 study of nivolumab (Nivo) or placebo in patients (Pts) with resected lower esophageal (E) or gastroesophageal junction (GEJ) cancer. J Clin Oncol 2017;35(Suppl. 4):TPS212. DOI: 10.1200/JCO.2017.35.4_suppl.TPS212.
13. Chung H.C., Arkenau H.T., Lee J. et al. Avelumab (anti-PD-L1) as first-line switch-maintenance or second-line therapy in patients with advanced gastric or gastroesophageal junction cancer: phase 1b results from the JAVELIn Solid Tumor trial. J Immunother Cancer 2019;7(1):30. DOI: 10.1186/s40425-019-0508-1.
14. Bang Y.J., Kang Y.K., Catenacci D.V. et al. Pembrolizumab alone or in combination with chemotherapy as first-line therapy for patients with advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma: results from the phase II nonrandomized KEYNOTE-059 study. Gastric Cancer 2019;22(4):828–37. DOI: 10.1007/s10120-018-00909-5.
15. Tabernero J., van Cutsem E., Bang Y.J. et al. Pembrolizumab with or without chemotherapy versus chemotherapy for advanced gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma: The phase III KEYNOTE-062 study. J Clin Oncol 2019;37(Suppl. 18):LBA4007-LBA4007. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.18_suppl.LBA4007.
16. Linsley P.S., Greene J.L., Brady W. et al. Human B7–1 (CD80) and B7–2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. Immunity 1994;1(9):793–801. DOI: 10.1016/S1074-7613(94)80021–9.
17. Ralph C., Elkord E., Burt D.J. et al. Modulation of lymphocyte regulation for cancer therapy: a phase II trial of tremelimumab in advanced gastric and esophageal adenocarcinoma. Clin Cancer Res 2010;16(5):1662–72. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2870.
18. Janjigian Y.Y., Bendell J., Calvo E. et al. CheckMate-032 Study: efficacy and safety of nivolumab and nivolumab plus ipilimumab in patients with metastatic esophagogastric cancer. J Clin Oncol 2018;36(28):2836–44. DOI: 10.1200/JCO.2017.76.6212.
19. Chau I., Penel N., Arkenau H.T. et al. Safety and antitumor activity of ramucirumab plus pembrolizumab

- in treatment naive advanced gastric or gastroesophageal junction (G/GEJ) adenocarcinoma: Preliminary results from a multi-disease phase I study (JVDF). *J Clin Oncol* 2018;36(Suppl. 4):101. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.4_suppl.101.
20. Coutzac C., Pernot S., Chaput N., Zaanan A. Immunotherapy in advanced gastric cancer, is it the future? *Crit Rev Oncol Hematol* 2019;133:25–32. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.10.007.
 21. Taieb J., Moehler M., Boku N. et al. Evolution of checkpoint inhibitors for the treatment of metastatic gastric cancers: current status and future perspectives. *Cancer Treat Rev* 2018;66:104–13. DOI: 10.1016/j.ctrv.2018.04.004.
 22. Boger C., Behrens H.M., Mathiak M. et al. PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of western patients. *Oncotarget* 2016;7(17):24269–83. DOI: 10.18632/oncotarget.8169.
 23. Goodman A., Patel S.P., Kurzrock R. PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(4):203–20. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.168.
 24. Kulangara K., Zhang N., Corigliano E. et al. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2019;143(3):330–7. DOI: 10.5858/arpa.2018-0043-OA.
 25. Bass A.J., Thorsson V., Shmulevich I. et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513(7517):202–9. DOI: 10.1038/nature13480.
 26. Yu Y. A new molecular classification of gastric cancer proposed by Asian Cancer Research Group (ACRG). *Transl gastrointest cancer* 2016;5(1):55–7. DOI: 10.3978/j.issn.2224-4778.2015.12.01.
 27. Battaglin F., Naseem M., Puccini A., Lenz H.J. Molecular biomarkers in gastro-esophageal cancer: recent developments, current trends and future directions. *Cancer Cell Int* 2018;18:99. DOI: 10.1186/s12935-018-0594-z.
 28. Sohn B.H., Hwang J.E., Jang H.J. et al. Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by the cancer genome atlas project. *Clin Cancer Res* 2017;23(15):4441–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2211.
 29. Velho S., Fernandes M.S., Leite M., et al. Causes and consequences of microsatellite instability in gastric carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2014;20(44):16433–42. DOI: 10.3748/wjg.v20.i44.16433.
 30. Ayers M., Lunceford J., Nebozhyn M. et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* 2017;127(8):2930–40. DOI: 10.1172/JCI91190.
 31. Ott P.A., Bang Y.J., Piha-Paul S.A. et al. T-Cell-Inflamed gene-expression profile, programmed death ligand 1 expression, and tumor mutational burden predict efficacy in patients treated with pembrolizumab across 20 cancers: KEYNOTE-028. *J Clin Oncol* 2019;37(4):318–27. DOI: 10.1200/JCO.2018.78.2276.
 32. Cai H., Jing C., Chang X. et al. Mutational landscape of gastric cancer and clinical application of genomic profiling based on target next-generation sequencing. *J Transl Med* 2019;17(1):189. DOI: 10.1186/s12967-019-1941-0.
 33. Chalmers Z.R., Connolly C.F., Fabrizio D. et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med* 2017;9(1):34. DOI: 10.1186/s13073-017-0424-2.
 34. Goodman A.M., Kato S., Bazhenova L. et al. Tumor mutational burden as an independent predictor of response to immunotherapy in diverse cancers. *Mol Cancer Ther* 2017;16(11):2598–608. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0386.
 35. Wu Y.Y., Lin C.W., Cheng K.S. et al. Increased programmed death-ligand-1 expression in human gastric epithelial cells in *Helicobacter pylori* infection. *Clin Exp Immunol* 2010;161(3):551–9. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04217.x.
 36. Gopalakrishnan V., Spencer C.N., Nezi L. et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018;359(6371):97–103. DOI: 10.1126/science.aan4236.
 37. Haanen J., Carbone F., Robert C. et al. Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2017;28:119–42. DOI: 10.1093/annonc/mdx225.
 38. Postow M.A. Managing immune checkpoint-blocking antibody side effects. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015;76–83. DOI: 10.14694/EdBook_AM.2015.35.76.

Вклад авторов

Д.Ж. Мансорунов: написание текста статьи, обзор публикаций по теме статьи;
 А.А. Алимов: обзор публикаций о молекулярных механизмах действия иммунных контрольных точек;
 Н.В. Апанович: обзор публикаций по теме статьи;
 А.Ю. Кузеванова: обзор публикаций о клиническом применении блокаторов иммунных контрольных точек;
 Т.А. Богущ, И.С. Стилиди: обзор публикаций по теме статьи;
 А.В. Карпукхин: разработка дизайна статьи, обзор публикаций по теме статьи, окончательное редактирование обзора.

Author's contributions:

D.Zh. Mansorunov: article writing, reviewing of publications of the article's theme;
 A.A. Alimov: a review of publications on the molecular mechanisms of action of immune checkpoints;
 N.V. Apanovich: reviewing of publications of the article's theme;
 A.Yu. Kuzevanova: a review of publications on the clinical use of immune checkpoints blockers;
 T.A. Bogush, I.S. Stilidi: reviewing of publications of the article's theme;
 A.V. Karpukhin: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, final review editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.Ж. Мансорунов/D. Zh. Mansorunov: <https://orcid.org/0000-0003-1561-2504>
 А.А. Алимов/A. A. Alimov: <https://orcid.org/0000-0002-8495-7728>
 Н.В. Апанович/N.V. Apanovich: <https://orcid.org/0000-0003-4539-5424>
 А.Ю. Кузеванова/A.Yu. Kuzevanova: <https://orcid.org/0000-0001-6156-9725>
 Т.А. Богущ/T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
 И.С. Стилиди/I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>
 А.В. Карпукхин/A.V. Karpukhin: <https://orcid.org/0000-0002-7001-9116>

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Минздрава России в рамках темы НИР № AAAA-A19-119022090028-6.
Financing. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of research № AAAA-A19-119022090028-6.

Статья поступила: 17.09.2019. **Принята в печать:** 28.10.2019.
Article submitted: 17.09.2019. **Accepted for publication:** 28.10.2019.

МИКРОСАТЕЛЛИТНАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ И КАРЦИНОМА ЖЕЛУДКА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Д.Л. Ротин, О.В. Паклина, И.О. Тинькова, Д.Н. Греков

ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»;
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5

Контакты: Ирина Олеговна Тинькова tinkovairen74@yandex.ru

Рак желудка (РЖ) — широко распространенная злокачественная опухоль с плохим прогнозом. Последние исследования характеристик генома позволяют рассматривать РЖ как гетерогенное заболевание, представленное различными биологическими подтипами, каждый из которых имеет свои специфические свойства и признаки с различным прогнозом. Микросателлитная нестабильность (МСН) — эпигенетическое молекулярное нарушение, известное во многих опухолях. Роль МСН в РЖ, как прогностическая, так и предиктивная, не вполне ясна. Частая встречаемость (от 10 до 22 %) РЖ с МСН требует более интенсивного изучения ее роли в данной опухоли. Данный обзор посвящен современным данным литературы, касающимся клинических, морфологических, прогностических и предиктивных свойств МСН в РЖ.

Ключевые слова: рак желудка, микросателлитная нестабильность, прогноз, предиктивный фактор

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-17-24

MICROSATELLITE INSTABILITY AND GASTRIC CARCINOMA. REVIEW OF THE LITERATURE

D.L. Rotin, O.V. Paklina, I.O. Tin'kova, D.N. Grekov

S.P. Botkin City Clinical Hospital; 5 Second Botkinskiy Proyezd, Moscow 125284, Russia

Carcinoma of the stomach is wide spread malignancy with the poor prognosis. Recent investigations of the genome features let to consider this tumor as heterogeneous lesion, presenting different biological subtypes. Each of those subtypes has its own definitive characteristics including difference in prognosis. Microsatellite instability (MSI) — epigenetic molecular abnormality known in many tumors. The role of MSI in the carcinoma of stomach, prognostic as well predictive, is still not clear. High incidence (10 up to 22 %) of MSI in carcinoma of stomach requires performing more extensive studying of this malignancy. The present review is dedicated to recent data of the literature, concerning clinical, morphological, prognostic and predictive features of MSI in the carcinoma of stomach.

Key words: gastric cancer, microsatellite instability, prognosis, predictive factors

Введение

Рак желудка (РЖ) — одна из распространенных опухолей в мире, занимающая 3-е место среди онкологических причин смерти [1]. Введение таргетных препаратов немного повысило общую выживаемость, но прогноз существенно не улучшило [2–4]. Современный взгляд в онкологии предполагает зависимость прогноза не только от клинической стадии, но и от молекулярных и морфологических признаков опухоли [5, 6]. Было проведено 2 подробных исследования геномных характеристик РЖ: Cancer Genome Atlas (TCGA) и Asian Cancer Research Group (ACRG) [5, 6]. Результаты этих работ доказывают, что РЖ — гетерогенное заболевание. В соответствии с геномными характеристиками TCGA РЖ подразделяют на 4 подгруппы: 1) ВЭБ-положительные опухоли (вирус Эпштейна–Барр); 2) высокомикросателлитно-нестабильные; 3) опухоли со стабильным геномом (GS);

4) опухоли с хромосомной нестабильностью [5, 6]. Подгруппа высокомикросателлитно-нестабильных опухолей выделена в отдельный вариант РЖ в классификациях обоих исследований, однако эпидемиологические данные есть лишь в результатах TCGA (22 % случаев РЖ) [5, 6].

Микросателлиты — короткие повторяющиеся последовательности ДНК, распределенные в случайном порядке по всему геному [5, 7, 8]. Дефицит системы репарации парных оснований (СРПО) обычно вызван герминогенными мутациями или спорадическим эпигенетическим исключением, которое ведет к внедрениям и/или делециям нуклеотидов в микросателлитных областях в процессе репликации ДНК. Данный феномен известен как микросателлитная нестабильность (МСН) [9–11] и относительно хорошо изучен в прогностическом и предиктивном отношении в колоректальном раке [9, 11–16]. Однако

связь между МСН и клинико-морфологическими свойствами РЖ остается неясной [17–20].

Имеется гипотеза о возможности воздействия на изменения в системе репарации ингибиторами иммунных контрольных точек, что объясняют корреляцией между МСН и экспрессией PD-L1 [21–24]. Необходимо более глубокое изучение прогностической и предиктивной роли МСН при РЖ, что создаст основу для лечения таких пациентов.

Микросателлитная нестабильность и система репарации парных нуклеотидов

Микросателлиты разбросаны между различными регионами генома, они полиморфны внутри популяции, но стабильны у каждого конкретного индивида [25]. СРПО состоит из нескольких белков – продуктов генов *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* и *hPMS2*, контролирующей правильную репликацию ДНК.

Система репарации парных оснований определяет и корректирует разные ошибки репарации – нарушение парности оснований, включения, делеции и т. п. [26–28]. Гетеродимерный белковый комплекс в составе *hMSH2/hMSH6* и *hMSH2/hMSH3* отвечает за начальное распознавание ошибок репликации. Далее комплекс *hMLH1/hPMS2* удаляет отдельные непарные нуклеотиды или целые фрагменты, восстанавливая ДНК [28]. Инактивация белков СРПО может быть вызвана рядом причин. Наиболее частые из них – это мутации в кодирующем регионе, метилирование промотора, реаранжировка хромосом с потерей гетерозиготности [28–30]. РЖ с МСН может быть спорадическим или проявлением синдрома Линча [11, 29, 30]. Последний связан с аутосомно доминантными мутациями в генах СРПО (чаще *hMLH1*, *hMSH2*, реже *hPMS2*, *hMSH6*) [30]. Кроме того, делеции гена *EPCAM*, запускающего *MSH2*, могут вызвать синдром Линча путем эпигенетического выключения *MSH2* [31]. Пациенты с синдромом Линча имеют более высокую предрасположенность к развитию колоректального рака (КРР), рака эндометрия, яичников, желудка и других органов в молодом возрасте [28–30]. Предполагают связь развития РЖ с мутациями *MSH6* [31]. Сообщают, что более 50 % случаев МСН РЖ связаны с эпигенетическим гиперметилированием промотора *hMLH1*, а 12–15 % случаев – с мутациями *hMLH1* и *hMSH2* [32]. Оставшиеся 30–40 % случаев РЖ с МСН, вероятно, связаны с неизвестным пока путем инактивации экспрессии генов [32]. Нарушение функции белков СРПО ведет к большому количеству мутаций – точечных и сдвига считывания в ключевых онкогенах и супрессорах. Мутации в генах, ответственных за регуляцию клеточного цикла и апоптоз (*TGFβ RII*, *IGFIR*, *TCF4*, *BAX* и др.), или генов, ответственных за поддержание генома (*hMSH6*, *hMSH3*, *MED1* и др.), также связаны с РЖ с МСН [11].

Повышенная экспрессия компонентов митотического пути AURKA, E2F, FOXM1, PLK1 и «мишеней» активации гена *MYC* обнаруживаются в РЖ с МСН [5]. Инактивация генов СРПО сама по себе не является трансформирующим событием. Необходимы дополнительные генетические изменения, определяющие прогрессию новообразования. Установлено, что карциномы с МСН связаны со 100- и 1000-кратно увеличенным уровнем мутаций по сравнению с микросателлитно-стабильными опухолями [11, 29, 30, 33].

Диагностика микросателлитной нестабильности

Открытие прогностической и предиктивной роли МСН в ряде опухолей привело к необходимости определения данного молекулярного нарушения [32]. Для определения МСН-статуса требуется чувствительный, быстрый и недорогой метод [30–32]. В настоящее время для тестирования МСН применяются:

1. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) амплификации микросателлитных последовательностей.
2. Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание для определения экспрессии белков СРПО.
3. Секвенирование нового поколения (СНП) для определения МСН.

Оценка МСН путем ПЦР. Метод ПЦР со специфическими праймерами позволяет определить амплификационный профиль [30, 34]. МСН представляет собой сдвиг в ферограмме 1 и более микросателлитов при сравнении аллелей в опухолевой и нормальной ткани. Национальным институтом онкологии (США) в качестве «золотого стандарта» рекомендована так называемая Бетесда-панель [7]. Она состоит из 5 маркеров, специфичных для 2 мононуклеотидных (BAT-25, BAT-26) и 3 динуклеотидных локусов (D2S123, D5S346, D17S250) [7, 29]. При использовании флуоресцентной ПЦР данные регионы параллельно амплифицируются с последующей оценкой с помощью капиллярного электрофореза [34]. На основании сравнения опухолевой ткани с нормальной возможны 3 варианта. Высокая МСН (В-МСН-статус) – сдвиг в ≥2 из 5 микросателлитных локусов, низкая МСН (Н-МСН-статус) – сдвиг в 1 локусе и микросателлитно-стабильный статус (МСС-статус) [7, 30, 34]. Динуклеотидные маркеры менее чувствительны и специфичны, чем мононуклеотиды [35]. Кроме того, мононуклеотиды квазимономорфны, т. е. не надо тестировать соответствующую нормальную ДНК [7]. В связи с ограничениями Бетесда-панели компания Promega Co. предложила свою коммерческую панель. Она представлена мононуклеотидными маркерами (NR-21, NR-24, MONO-27), заменившими динуклеотиды панели Бетесда [7, 35]. Важным достоинством панели Promega Co. является ее способность переводить спорные случаи с Н-МСН в МСС или В-МСН [7, 35].

Оценка МСН методом ИГХ. Иммуногистохимия определяет экспрессию белков СРПО. Сравнение их конкордантности при определении МСН показывает близость результатов ИГХ и ПЦР (>90 %) [8]. Отсутствие ИГХ-экспрессии 1 или пары белков предполагает дефект в СРПО. Результаты ИГХ могут быть косвенным доказательством МСН. Белки hMLH1 и hMSH2 стабильны без своих димерных партнеров hPMS2 и hMSH6 соответственно, но hPMS2 и hMSH6 нестабильны без своей пары (hMLH1 и hMSH2), т. е. мутации в генах *hPMS2* и *hMSH6* вызывают потерю экспрессии 1 пораженного белка, а в *hMLH1* и *hMSH2* — пары сопряженных белков [8, 22, 28, 30]. ИГХ позволяет определить дефектный ген СРПО, помогая в дальнейшем генетическом анализе [30, 34]. Однако при ИГХ-анализе возможны ложноположительные результаты в случае тех редких точечных мутаций, когда происходит синтез белков с нормальными антигенными свойствами, но без ферментной активности. В этих случаях ПЦР поможет определить функциональный статус белков СРПО [7, 11].

Сравнение между методами ИГХ и ПЦР в тестировании МСН. При выявлении статуса СРПО методы ПЦР и ИГХ-анализа неоднократно сравнивали [7, 8, 36]. Многие исследования выявили корреляцию между ними [7, 36]. В отдельных работах отмечено расхождение в оценках МСН и СРПО, но конкордантность между ИГХ-экспрессией и МСН была высокой [20]. Исследователи объясняют это разницей в оценке ИГХ-метода и гетерогенностью экспрессии. В качестве других причин называют синтез нормально транскрибуемых, но не функционирующих белков СРПО в результате мутаций в гене *MLH1* и редкие геномные дефекты при МСН с интактной СРПО [20]. Важное преимущество ИГХ — ее интеграция в рутинную патоморфологическую практику. Второе важное достоинство ИГХ — определение гена для дальнейшего молекулярного анализа, что особенно важно при подозрении на наследственный синдром [30, 36]. Для ИГХ требуется только опухолевая ткань, а для ПЦР — еще и нормальная [7]. Однако ПЦР определяет МСН напрямую, а ИГХ в 5–11 % РЖ с МСН не выявляет потерю экспрессии белка СРПО, имеющего нормальный антиген при нефункционирующем белке. В этой ситуации лишь при помощи ПЦР можно поставить правильный диагноз [20, 34, 36].

Оценка МСН путем СНП. Лаборатории разных стран начали использовать для диагностики МСН новый метод — секвенирование [37–39]. В большинстве случаев определение МСН при помощи СНП нуждается в опухолевой и нормальной ткани [38, 39]. Предложена коммерческая СНП-панель для определения МСН [37], преимуществом которой является отсутствие необходимости в нормальной ткани. СНП-метод покрывает широкий спектр микросател-

литных локусов, а не ограничен пятью областями, как при ПЦР [37]. Недостатками данного метода остаются высокая стоимость и потребность в продолжительном времени по сравнению с ПЦР и ИГХ для определения МСН-статуса.

Клинико-морфологическая характеристика рака желудка с высокой микросателлитной нестабильностью. Наиболее высокая частота РЖ в мире отмечена в азиатской популяции [1]. Это позволило ожидать наиболее полные данные о клинико-морфологических свойствах МСН РЖ в работах из стран Азии [40–43]. Однако В-МСН РЖ в азиатской популяции встречается реже 10 % случаев РЖ, что ниже встречаемости МСН РЖ в Западных странах [17, 5, 40, 44]. Исследование TCGA представило комплексную молекулярную характеристику РЖ на основании изучения данных пациентов западной популяции. В результате предложена принципиально новая классификация, где все случаи РЖ разделены на 4 подтипа [5]. В частности, РЖ с МСН характеризуется высокой частотой мутаций в генах, кодирующих белки, имеющих отношение к «ключевым точкам» сигнальных путей (PIK3CA, ERBB, EGFR и т. д.) [5]. Наличие подобных изменений и метилирования промотора hMLH1 описано для других карцином (толстой кишки, молочной железы) [45, 46]. Мутации гена *BRAFV600E*, характерные для спорадического рака толстой кишки, в РЖ с МСН не обнаружены [45]. Относительно признаков, присущих РЖ с МСН, были выявлены:

- взаимосвязь опухоли со старшим возрастом пациентов (65 лет и старше);
- преобладание пациентов женского пола;
- изначальное возникновение опухоли в дистальных отделах желудка;
- кишечный (интестинальный) морфологический тип (по Lauren);
- частая встречаемость у пациентов с синхронным РЖ (а не одиночной опухолью) [47].

Взаимосвязь между началом заболевания в старшем возрасте и МСН-фенотипом РЖ отмечена в ряде работ [17, 40, 42, 44, 48]. Метилирование и потеря экспрессии гена *hMLH1* связаны с процессами старения [49]. Метилирование *hMLH1* — главная причина спорадического РЖ с МСН, что объясняет связь с возрастом пациентов процессами старения [29, 30]. Данная подгруппа РЖ имеет специфический морфофенотип — медулярный или лимфоплазмочитарный рак [44]. МСН РЖ имеет множество плеоморфных клеток, окруженных стромой с выраженным воспалением и диффузной ИГХ-экспрессией лигандов иммунных ключевых точек [17, 44]. Ряд авторов отмечают корреляцию между кишечным гистотипом РЖ и МСН. Сообщают, что плохо соединяющиеся («poorlycohesive») между собой опухолевые клетки и диффузный вариант РЖ крайне редки при РЖ

с МСН. Вышеуказанные данные не всегда статистически достоверны, что связано с малым количеством наблюдений [17, 41, 48]. Некоторые авторы не обнаруживают взаимосвязи между МСН и вариантом РЖ [17, 44]. Общая выживаемость (ОВ) пациентов РЖ с МСН значительно лучше, чем при МСС РЖ. Имеется предположение, что более благоприятный прогноз МСН РЖ связан с более ранней стадией TNM на момент постановки диагноза (стадии I–II), редким поражением лимфатических узлов и интестинальным гистологическим типом по Lauren [17, 44]. Показаны увеличение числа опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) и гиперэкспрессия лигандов иммунных ключевых точек (PD-L1, LAG-3, IDO, CTLA4) в РЖ с МСН [50, 51]. Это и объясняет высокую частоту мутаций при МСН [21–23]. Опухоли с большим количеством мутаций кодируют неоэпитопы, активируя лимфоциты в опухоли и индуцируя иммунный ответ [23, 50]. Активное иммунное микроокружение действует против экспрессии иммунных сигналов-ингибиторов и усиливает элиминацию опухоли [21, 22, 50, 52]. Гиперактивация цитотоксических лимфоцитов в опухоли ведет к усилению апоптоза опухолевых клеток, улучшая прогноз РЖ с МСН по сравнению с МСС [20].

MAGIC — первое проспективное исследование, выявившее взаимосвязь между МСН, клиническими признаками и выживаемостью при РЖ без метастазов [20, 53]. Данное исследование сравнивало только хирургическое лечение и действие пред- и послеоперационной химиотерапии эпирубицином, цисплатином, и 5-фторурацилом в сочетании с операцией при РЖ. В сравнении с группами с МСС в подгруппе РЖ с МСН коррелировали следующие признаки: женский пол, более старший возраст пациента, кишечный тип РЖ по Lauren, редкое регионарное метастазирование, локализация опухоли в желудке, а не пилорическом отделе [20]. Подгруппа больных РЖ с МСН составила 8,5 % исследованных пациентов [20]. Хотя ни один из описанных признаков не имел статистически значимой разницы в группах РЖ с МСН и без таковой, данные исследования MAGIC во многом повторяют и подтверждают результаты других основных ретроспективных исследований, касающихся РЖ с МСН [17, 20, 42, 44].

Выживаемость и ответ на химиотерапию при различных стадиях рака желудка с микросателлитной нестабильностью

Положительная взаимосвязь МСН РЖ с благоприятным прогнозом отмечена в ряде работ [17, 41, 44]. Так, К. Polom и соавт. и Е.С. Smyth и соавт. в своих работах по метаанализу микросателлитной нестабильности и общей выживаемости при РЖ обнаружили неизменно положительное влияние МСН

на прогноз заболевания [17, 21]. Интересно, что 4 различных между собой подгруппы РЖ, полученные в исследовании TCGA, имели корреляции с выживаемостью [5, 45]. РЖ, связанный с ВЭБ-вирусом, имел наилучший прогноз, а геномно-стабильный (ГС) подтип — наихудший. Подтипы РЖ с МСН и хромосомной нестабильностью были связаны с худшей ОВ по сравнению с ВЭБ, но лучшей по сравнению с ГС-подтипом. Результаты во многом обусловлены наличием иммунного ответа, что наблюдается в подтипах с более благоприятным прогнозом. Иммунный ответ усиливается при вирусной инфекции (ВЭБ) или вследствие высокого уровня мутаций (МСН) и предотвращает избыточный рост опухолевых клеток, способствует их апоптозу, улучшая в итоге ОВ [49]. Отмечено положительное действие статуса на выживаемость — МСС против МСН при II стадии РЖ [49]. Анализ исследования MAGIC впервые установил положительное прогностическое действие МСН в группе оперированных пациентов с РЖ, не получавших другого лечения (химио- и лучевой терапии) [20]. В группе пациентов, леченных только хирургически, ОВ была лучше у пациентов с РЖ с МСН, чем в группах МСС-опухолей [20]. Кроме того, МСН имеет позитивное влияние на прогноз, несмотря на положительный край резекции (R+ статус) после резекции желудка [39].

В ряде исследований определяли прогностическое значение МСН, но гораздо меньше работ посвящено молекулярным свойствам и ответу на различное лечение РЖ с МСН.

Ретроспективные исследования из Азии утверждали, что для пациентов с РЖ с МСН II и III стадий заболевания адъювантная терапия 5-фторурацилом бесполезна в отличие от МСС РЖ [18, 19, 43]. Это подтверждает MAGIC, где пациентов с МСН РЖ лечили при помощи пред- и/или послеоперационной химиотерапии. Был отмечен вдвое больший риск смерти по сравнению с МСС-группой больных [20]. Исследование геномного профайлинга подтверждает результаты MAGIC и распространяет предиктивное значение МСН на метастатический РЖ [54]. В исследовании оценивали метастатический РЖ и рак пищевода, а 3 % исследуемых пациентов были с МСН. МСН-опухоли прогрессировали быстрее на фоне стандартной цитотоксической терапии с существенно худшей безрецидивной выживаемостью по сравнению с МСС РЖ. Пациенты с быстро прогрессирующими опухолями получали анти-PD-1-моноклональные антитела (МКА) (дурвалумаб, пембролизумаб и ниволумаб) в качестве монотерапии или в сочетании с антителами анти-CTLA4 (ипилимумаб, тремелимумаб). Почти 50 % пациентов с выраженным ответом на данное лечение имели высокий уровень мутаций и МСН-статус. Вредный эффект

химиотерапевтического лечения, сравнимый с впечатляющими результатами при иммунотерапевтических клинических испытаниях, можно объяснить на основании особенных молекулярных свойств МСН-опухолей [5, 21–23, 50]. Авторы MAGIC заостряют внимание на различных исходах заболевания при МСН РЖ и КРР по отношению к химиотерапевтическому лечению [20]. Для РЖ это был цисплатин, в то время как для КРР — оксалиплатин [20]. Действительно, имеются данные *in vitro* о резистентности клеточных линий рака толстой кишки и эндометрия с дефицитом hMLH1 к цисплатину и чувствительности к оксалиплатину. Интересная гипотеза на основании результатов MAGIC основана на иммунном микроокружении новообразования. Опухоли с МСН сопровождаются выраженным иммунным инфильтратом [22, 23, 50], который, возможно, способен подавлять остаточные микрометастазы после хирургического лечения [20]. Прием химиотерапевтических препаратов может оказывать отрицательный эффект на механизмы иммунной защиты, снижая тем самым изначально положительное влияние МСН-фенотипа на прогноз, а ингибиторы иммунных ключевых точек, напротив, могут проявлять синергетическую активность вместе с иммунным ответом. Все имеющиеся данные предполагают в будущем отказ от применения ненужной и даже вредной химиотерапии у пациентов с РЖ с МСН, если вопрос о ее назначении будет основываться на молекулярном исследовании пациента [17–20, 42].

Применение альтернативных лечебных стратегий для данного подтипа РЖ, особенно сфокусированное на иммунном ответе, может быть значительным шагом на пути к персонифицированному лечению и центральной точкой для дальнейших исследований.

Корреляции микросателлитной нестабильности, иммунного ответа, ингибиторов ключевых точек и их клиническое значение и применение

Таргетная терапия, направленная на иммунные ключевые точки МКА, достигла сегодня впечатляющих результатов, являясь перспективной стратегией лечения целого ряда злокачественных опухолей [21, 22]. Среди множества карцином первые корреляции между статусом МСН и экспрессией PD-L1 были установлены в КРР [33, 59, 51]. Иммунное микроокружение в колоректальной карциноме у пациентов с МСН представлено массивным инфильтратом с большим количеством Т-хелперов, цитотоксических лимфоцитов и выраженной экспрессией молекул иммунных контрольных точек [12, 50, 52]. Эти молекулы — негативные регуляторы иммунной функции Т-клеток. Их ингибирование приводит к возрастанию активации иммунного ответа против опухоли [50]. Все составляющие МСН РЖ элементы (ОИЛ, строма и инвазивный компонент) экспрессируют эти молекулы

(CTLA4, PD-1, PD-L1, LAG-3 и IDO) [50, 51]. Микросателлитно-стабильные опухоли и их ОИЛ, напротив, экспрессируют очень слабо гены ключевых иммунных точек [5, 23, 50, 52, 55]. Группа рефрактерных к лечению пациентов с метастатическим МСН КРР, КРР без нарушений в СРПО и МСН-опухолями не колоректальной локализации получали пембролизумаб — МКА анти-PD-1 [22]. Обнаружено, что МСН — статистически достоверный признак ОВ — до 71 % в карциномах и 0 % в опухолях без дефекта СРПО. Безрецидивная выживаемость составила в этих группах 78 и 11 % соответственно [22]. Положительная мембранная экспрессия PD-L1 обнаружена только в карциномах с дефектом СРПО, особенно выраженная на ОИЛ и опухолеассоциированных макрофагах опухоли [21, 22].

Исследование под названием KEYNOTE-012 разработано для оценки эффективности пембролизумаба в PD-L1 (+) запущенных РЖ. У 22 % пациентов наблюдался частичный ответ. Профайлинг генома выявил МСН-статус у 17 % из всех больных РЖ, среди которых частичный ответ был зарегистрирован у 50 %. Кроме того, в МСН РЖ ответ наблюдался вне зависимости от экспрессии PD-L1 [24]. Эти данные являются веским основанием, чтобы сфокусироваться на МСН-статусе как предиктивном биомаркере при оценке ответа на иммунотерапию [17, 48, 53].

Пембролизумаб одобрен в 2017 г. в США для ранее леченных пациентов с метастатическим РЖ с экспрессией PD-L1 [44]. Регистрация была основана на данных исследования KEYNOTE-059, тестирующего пембролизумаб на 259 пациентах с запущенным РЖ и раком желудочно-пищеводного соединения [37]. Среди них 143 (55 %) имели экспрессию PD-L1. Объективный ответ наблюдался у 13,3 % пациентов и продолжался от 2,8 до 19,4 мес. [37]. В подгруппе пациентов с МСН объективный ответ был более впечатляющим: 57 % пациентов с продолжительностью ответа от 5,3 до 14,1 мес. [43]. Другое большое исследование CHECKMATE-032 оценивало эффективность препарата ниволумаб — другого МКА к PD-1 среди пациентов с метастатическим РЖ без определения статуса PD-L1 [55]. Частота ответа среди пациентов, положительно или отрицательно реагирующих на PD-L1-терапию, была 18 и 12 % соответственно [53]. В другой ветви того же исследования тестировали комбинацию препаратов: ниволумаб + ипилиумаб — МКА к анти-CTLA4. Данная комбинация дает дополнительный результат у пациентов, реагирующих положительно на PD-L1-терапию, по сравнению с теми, у кого был отрицательный ответ.

Заключение

Несмотря на все усилия, химиотерапия и таргетное лечение не обеспечивают желаемого результата,

и прогноз при РЖ остается плохим [1]. В настоящее время считается, что ОВ и ответ на терапию зависят не только от клинической стадии заболевания, но и от молекулярных признаков опухоли [5, 6, 20]. Исследование TCGA первым представило классификацию РЖ, сфокусированную на генетическом профиле, определив 4 различных молекулярных подтипа РЖ [5]. МСН-тип РЖ вызывает большой интерес в связи с особым иммунологическим микроокружением и ответом на лечение [5, 23, 50, 51]. MAGIC и метаанализы ретроспективных исследований позволили рассматривать РЖ с МСН как отдельную болезнь, связанную с более пожилым возрастом пациента, женским полом, дистальным расположением опухоли, множественными опухолевыми очагами и кишечным гистотипом опухоли [20, 42, 44, 53]. Эти работы позволили оценить прогностическое и предиктивное значение данной молекулярной подгруппы [12, 15]. РЖ с МСН связан с лучшими прогнозом и ОВ у пациентов без химиотерапии по сравнению с группой МСС. Эта же группа связана с более неблагоприятным прогнозом при предоперационной химиотерапии [20]. Молекулярные данные Memorial

Sloan Kettering Cancer Center, как и результаты MAGIC, подтверждают предиктивное значение МСН-статуса и для метастатического поражения при РЖ, поддерживая прием ингибиторов ключевых точек при РЖ с МСН [53]. Таким образом, вредное действие химиотерапии вместе с многообещающими результатами использования ингибиторов ключевых точек объясняется наличием особенного иммунного микроокружения в МСН-опухолях. РЖ с МСН показывает специфические только для него клинико-морфологические свойства, биологическое поведение и ответ на лечение [6, 20–22, 24]. Эти данные предполагают необходимость тестирования пациентов с РЖ на МСН на всех стадиях заболевания. Дальнейшие проспективные исследования с определением генетического профиля РЖ могли бы подтвердить ценность уже имеющихся данных. Однако значительная доля пациентов с РЖ с МСН не получают никакой пользы от иммунотерапии [21, 22, 24]. Следовательно, четко выстроенные клинические испытания помогут понять взаимодействие между иммунным микроокружением и молекулярным профилем опухоли, что гарантировало бы максимально оптимальное лечение каждому пациенту с РЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017;67(1):7–30. DOI: 10.3322/caac.21387.
2. Bang Y.J., van Cutsem E., Feyereislova A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomized controlled trial. *Lancet* 2010;376(9742):687–97. DOI: 10.1016/s0140-6736(10)61121-x.
3. Fuchs C.S., Tomasek J., Yong C.J. et al. Ramucirumab monotherapy for previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (REGARD): an international, randomised, multicentre, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2014; 383(9911):31–9. DOI: 10.1016/s0140-6736(13)61719-5.
4. Wilke H., Muro K., van Cutsem E. et al. Ramucirumab plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel in patients with previously treated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (RAINBOW): a double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014;15(11):1224–35. DOI: 10.1016/s1470-2045(14)70420-6.
5. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 2014;513(7517):202–9. DOI: 10.1038/nature13480.
6. Cristescu R., Lee J., Nebozhyn M. et al. Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med* 2015;21:449–56. DOI: 10.1038/nm.3850.
7. Baudrin L.G., Deleuze J.F., How-Kit A. Molecular and computational methods for the detection of microsatellite instability in cancer. *Front Oncol* 2018;12(8):621. DOI: 10.3389/fonc.2018.00621.
8. Ryan E., Sheahan K., Creavin B. et al. The current value of determining the mismatch repair status of colorectal cancer: A rationale for routine testing. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017;116:38–57. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.05.006.
9. Laghi L., Bianchi P., Roncalli M., Malesci A. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004;96:1402–3. DOI: 10.1093/jnci/djh280.
10. Ratti M., Lampis A., Hahne J.C. et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(22):4151–62. DOI: 10.1007/s00018-018-2906-9.
11. Hudler P. Genetic aspects of gastric cancer instability. *Sci World J* 2012;2012:761909. DOI: 10.1100/2012/761909.
12. Cohen R., Buhard O., Cervera P. et al. Clinical and molecular characterization of hereditary and sporadic metastatic colorectal cancers harboring microsatellite instability/DNA mismatch repair deficiency. *Eur J Cancer* 2017;86:266–74. DOI: 10.1016/j.ejca.2017.09.022.
13. Boussios S., Ozturk M.A., Moschetta M. et al. The developing story of predictive biomarkers in colorectal cancer. *J Pers Med* 2019;7:9(1). DOI: 10.3390/jpm9010012.
14. Valeri N., Gasparini P., Fabbri M. et al. Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(15):6982–7. DOI: 10.1073/pnas.1015541107.
15. Byrne M., Saif M.W. Selecting treatment options in refractory metastatic colorectal cancer. *Onco Targets Ther*

- 2019;12:2271–8.
DOI: 10.2147/OTT.S194605.
16. Ribic C.M., Sargent D.J., Moore M.J. et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349(3):247–57.
DOI: 10.1056/NEJMoa022289.
17. Polom K., Marano L., Marrelli D. et al. Meta-analysis of microsatellite instability in relation to clinicopathological characteristics and overall survival in gastric cancer. *Br J Surg* 2018;105(3):159–67.
DOI: 10.1002/bjs.10663.
18. An J.Y., Kim H., Cheong J.H. et al. Microsatellite instability in sporadic gastric cancer: its prognostic role and guidance for 5-FU based chemotherapy after R0 resection. *Int J Cancer* 2012;131(2):505–11.
DOI: 10.1002/ijc.26399.
19. Zhao P., Li L., Jiang X., Li Q. Mismatch repair deficiency/microsatellite instability-high as a predictor for anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy efficacy. *J Hematol Oncol* 2019;12(1):54.
DOI: 10.1186/s13045-019-0738-1.
20. Smyth E.C., Wotherspoon A., Peckitt C. et al. Mismatch repair deficiency, microsatellite instability, and survival: an exploratory analysis of the medical research council adjuvant gastric infusional chemotherapy (MAGIC) trial. *JAMA Oncol* 2017;13:1197–203.
DOI: org/10.1001/jamaoncol.2016.6762.
21. Le D.T., Durham J.N., Smith K.N. et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017;357:409–13.
DOI: 10.1126/science.aan6733.
22. Le D.T., Uram J.N., Wang H. et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 2015;372:2509–20.
23. Thompson E.D., Zahurak M., Murphy A. et al. Patterns of PD-L1 expression and CD8 T cell infiltration in gastric adenocarcinomas and associated immune stroma. *Gut* 2017;66:794–801.
DOI: org/10.1136/gutjnl-2015-310839.
24. Muro K., Chung H.C., Shankaran V. et al. Pembrolizumab for patients with PD-L1-positive advanced gastric cancer (KEYNOTE-012): a multicentre, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol* 2016;17(6):717–26.
DOI: 10.1016/s1470-2045(16)00175-3.
25. Yamamoto H., Imai K. Microsatellite instability: an update. *Arch Toxicol* 2015;89:899–921.
DOI: 10.1007/s00204-015-1474-0.
26. Falchetti M., Saieva C., Lupi R. et al. Gastric cancer with high-level microsatellite instability: target gene mutations, clinicopathologic features, and long-term survival. *Hum Pathol* 2008;39:925–32.
DOI: 10.1016/j.humpath.2007.10.024.
27. Tang S., Wu W.K., Li X. et al. Stratification of Digestive Cancers with Different Pathological Features and Survival Outcomes by MicroRNA Expression. *Sci Rep* 2016;15(6):244–66.
DOI: 10.1038/srep24466.
28. Yuza K., Nagahashi M., Watanabe S. et al. Hypermutation and microsatellite instability in gastrointestinal cancers. *Oncotarget* 2017;8(67):112103–15.
DOI: 10.18632/oncotarget.22783.
29. Corso G., Velho S., Paredes J. et al. Oncogenic mutations in gastric cancer with microsatellite instability. *Eur J Cancer* 2011;47:443–51.
DOI: 10.1016/j.ejca.2010.09.008.
30. Leite M., Corso G., Sousa S. et al. MSI phenotype and MMR alterations in familial and sporadic gastric cancer. *Int J Cancer* 2011;128:1606–13.
DOI: 10.1002/ijc.25495.
31. Vasen H.F.A., Blanco I., Aktan-Collan K. et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut* 2013;62(6):812–23.
DOI: org/10.1136/gutjnl-2012-304356.
32. Ottini L., Falchetti M., Lupi R. et al. Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol* 2006;17(Suppl. 7):97–102.
DOI: 10.1093/annonc/mdl960.
33. Dudley J.C., Lin M.T., Le D.T., Eshleman J.R. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. *Clin Cancer Res* 2016;22(4):813–20.
DOI: 10.1158/1078-0432.ccr-15-1678.
34. Berg K.D., Glaser C.L., Thompson R.E. et al. Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *J Mol Diagn* 2000;2(1):20–8.
DOI: 10.1016/s1525-1578(10)60611-3.
35. Deschoolmeester V., Baay M., Wuyts W. et al. Detection of microsatellite instability in colorectal cancer using an alternative multiplex assay of quasi-monomorphic mononucleotide markers. *J Mol Diagn* 2008;10(2):154–9.
DOI: 10.2353/jmolx.2008.070087.
36. Rigau V., Sebbagh N., Olschwang S. et al. Microsatellite instability in colorectal carcinoma. The comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMSH6 [correction of hMLH6] immunostaining. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:694–700.
37. Vanderwalde A., Spetzler D., Xiao N. et al. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11,348 patients. *Cancer Med* 2018;7:746–56.
DOI: 10.1002/cam4.1372.
38. Hause R.J., Pritchard C.C., Shendure J. et al. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 2016;22:1342–50.
DOI: 10.1038/nm.4191.
39. Zehir A.R., Benayed R.H., Shah A. et al. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23(6):703–13.
DOI: 10.1038/nm.4333.
40. Kim S.H., Ahn B.K., Nam Y.S. et al. Microsatellite instability is associated with the clinicopathologic features of gastric cancer in sporadic gastric cancer patients. *J Gastric Cancer* 2010;10(4):149–54.
DOI: 10.5230/jgc.2010.10.4.149.
41. Lin J.T., Wu M.S., Shun C.T. et al. Microsatellite instability in gastric carcinoma with special references to histopathology and cancer stages. *Eur J Cancer* 1995;31A: 1879–82.
42. Choi Y.Y., Bae J.M., An J.Y. et al. Is microsatellite instability a prognostic marker in gastric cancer? A systematic review with meta-analysis. *J Surg Oncol* 2014;110(2):129–35.
DOI: 10.1002/jso.23618.
43. Kim S.Y., Choi Y.Y., An J.Y. et al. The benefit of microsatellite instability is attenuated by chemotherapy in stage II and stage III gastric cancer: results from a large cohort with subgroup analyses. *Int J Cancer* 2015;137(4):819–25.
DOI: 10.1002/ijc.29449.
44. Mathiak M., Warneke V.S., Behrens H.M. et al. Clinicopathologic characteristics of microsatellite instable gastric carcinomas revisited: urgent need for standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2017;25:12–24.
DOI: 10.1097/pai.0000000000000264.
45. Normanno N., Rachiglio A.M., Lambiase M. et al. Heterogeneity of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in metastatic colorectal cancer and potential effects on therapy in the CAPRI GOIM trial. *Ann Oncol* 2015;26(8):1710–14.
DOI: org/10.1093/annonc/mdv176.
46. Mukohara T. PI3K mutations in breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Breast Cancer* 2015;7:111–23.
DOI: 10.2147/BCTT.S60696.
47. Nakashima H., Honda M., Inoue H. et al. Microsatellite instability in multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 1995;64: 239–42.
DOI: 10.1002/ijc.2910640405.
48. Kim J.Y., Shin N.R., Kim A. et al. Microsatellite instability status in gastric cancer: a reappraisal of its clinical

- significance and relationship with mucin phenotypes. *Korean J Pathol* 2013;47:28–35. DOI: 10.4132/KoreanJPathol.2013.47.1.28.
49. Nakajima T., Akiyama Y., Shiraishi J. et al. Age-related hypermethylation of the hMLH1 promoter in gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;94(2):208–11. DOI: 10.1002/ijc.1454.
 50. Llosa N.J., Cruise M., Tam A. et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov* 2015;5(1):43–51. DOI: 10.1158/2159-8290.cd-14-0863.
 51. Ma C., Patel K., Singhi A.D. et al. Programmed death-ligand 1 expression is common in gastric cancer associated with Epstein–Barr virus or microsatellite instability. *Am J Surg Pathol* 2016;40:1496–506. DOI: 10.1097/pas.0000000000000698.
 52. Kelderman S., Schumacher T.N., Kvistborg P. Mismatch repair-deficient cancers are targets for anti-PD-1 therapy. *Cancer Cell* 2015;28(1):11–3. DOI: 10.1016/j.ccell.2015.06.0012.
 53. Cunningham D., Allum W.H., Stenning S.P. et al. Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 2006;355(1):11–20. DOI: 10.1056/nejmoa055531.
 54. Miyoshi E., Haruma K., Hiyama T. et al. Microsatellite instability is a genetic marker for the development of multiple gastric cancers. *Int J Cancer* 2001;95(6): 350–3. DOI: 10.1002/1097-0215(20011120)95:6<350::aid-ijc1061>3.0.co;2-a.
 55. Ratti M., Lampis A., Jens C. et al. Microsatellite instability in gastric cancer: molecular bases, clinical perspectives, and new treatment approaches. *Cell Mol Life Sci* 2018;75(22):4151–62.

Вклад авторов

Д.Л. Ротин: анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;

О.В. Паклина, И.О. Тинькова, Д.Н. Греков: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

D.L. Rotin: analysis of the obtained data, article writing, reviewing of publications of the article's theme;

O.V. Paklina, I.O. Tin'kova, D.N. Grekov: developing the research design.

ORCID авторов/ORCID of authors

Д.Л. Ротин/D.L. Rotin: <https://orcid.org/0000-0003-3386-0077>

О.В. Паклина/O.V. Paklina: <https://orcid.org/0000-0001-6373-1888>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 04.10.2019. Принята в печать: 25.10.2019.

Article submitted: 04.10.2019. Accepted for publication: 25.10.2019.

ДОФАМИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА: СТРЕСС, ДЕПРЕССИЯ, РАК (ЧАСТЬ 2)

О.А. Бочарова¹, Е.В. Бочаров¹, В.Г. Кучеряну², Р.В. Карпова¹, А.А. Вершинская¹

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

Во многих ситуациях в современном мире мы подвержены стрессу. Вместе с тем, если острый стресс может иметь положительное воздействие на организм, постоянное стрессирование, как правило, наносит вред здоровью, приводя к серьезным заболеваниям, в том числе к раку, который считают болезнью старения. Выявлено, что стресс может ускорять опухолевый рост, ослаблять противоопухолевый иммунитет и эффективность химиотерапии. Из данных литературы известно, что дофамин, недостаток которого играет существенную роль при старении и стрессе, ограничивает развитие опухолей. Роль центральных нейрональных процессов с участием дофаминергической системы в механизмах контроля злокачественного роста обсуждается в представленном обзоре.

Ключевые слова: дофамин, серотонин, старение, депрессия, стресс, рак

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-25-33

DOPAMINERGIC SYSTEM: STRESS, DEPRESSION AND CANCER (PART 2)

O.A. Bocharova¹, E.V. Bocharov¹, V.G. Kucheryanu², R.V. Karpova¹, A.A. Vershinskaya¹

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

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

In today's world, we are constantly exposed to stress. At the same time, if acute stress can have a positive effect on the body, constant stress usually harms health, leading to serious diseases, including cancer, which is considered to be age-related disease. It is also known that stress can significantly deteriorate the efficacy of chemotherapies and anti-tumour immune response, promote tumor growth and metastasis spreading. Meanwhile dopamine known to be antiaging and antistress agent is able to inhibit tumorigenesis. Therefore the role of Central neuronal processes involving the dopaminergic system in the mechanisms of malignant growth control is discussed in the present review.

Key words: dopamine, serotonin, aging, depression, stress, cancer

Введение

В 1-й части обзора проведен анализ современной научной литературы, посвященной участию катехоламина дофамина (ДА) в механизмах процесса старения. Вместе с тем обсуждаются молекулярные механизмы, лежащие в основе депрессии, объединенные моноаминергической, воспалительной, эпигенетической, нейротрофинной и антиапоптотической концепциями. Обоснование этих гипотез лежит в плоскости функций дофаминергической системы.

Дофамин как противоопухолевый агент

Как известно, ДА и серотонин синтезируются в центральной нервной системе (ЦНС), желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) и мозговом веществе

надпочечников, где они участвуют в различных процессах [1–6]. Более того, как все чаще отмечается в литературе, ДА и серотонин также вовлечены в поведение опухоли, влияя на пролиферацию ее клеток и ангиогенез [7–9]. Вместе с тем выявлено, что ДА продуцируется различными субпопуляциями лимфоцитов и может играть роль в дифференцировке цитотоксических Т-клеток, контролировать их киллерную активность и участвовать в активной фазе иммунного ответа против опухоли [10].

Дофамин продуцируется в цитоплазме из аминокислоты тирозина с помощью тирозингидроксилазы [2]. В крови ~99 % ДА запасается в тромбоцитах [11], в плазме ~1 % ДА циркулирует в свободной форме и в виде неактивного дофаминсульфата [12]. В ЦНС

ДА вовлечен в привилегированные центральные механизмы, о чем было сказано ранее. К тому же после транспортировки симпатическими нервами и тромбоцитами он оказывает периферические эффекты во всем организме [5]. Помимо собственных функций, ДА является предшественником адреналина и норадреналина в ЦНС и надпочечниках [2]. ДА проявляет свои функции, связываясь с дофаминовыми рецепторами (ДАР). Последние располагаются на клеточных мембранах мозга, сердца, почек, коры надпочечников, кровеносных сосудов, окончаний симпатических нервов, на иммунокомпетентных клетках. Существует 2 основные группы ДАР: D1-подобные (D1, D5) и D2-подобные (D2, D3, D4). Например, D1 стимулирует накопление клеточного циклического аденозинмонофосфата, тогда как активация D2 подавляет его [5].

Дофаминовые транспортеры располагаются на плазматической мембране. Они активно транспортируют ДА из синаптической щели или крови в клетки, где он накапливается или распадается. Эти транспортеры образуются в черной субстанции и вентрально-теgmentальной области мозга, в желудке, почках, протоке поджелудочной железы и тромбоцитах [13, 14]. ДА разрушается в печени, мозге, почках путем сульфоконъюгации, окислительной деаминации и О-метилирования [2].

Серотонин также известен как 5-гидрокситриптамиин (5-НТ), производится в ЦНС и энтерохромаффинных клетках ЖКТ. 5-НТ образуется из одной аминокислоты L-триптофана с помощью триптофангидроксилазы (ТРГ). Менее 1 % 5-НТ циркулирует в свободной форме в крови. Остальной 5-НТ запасается в тромбоцитах, пресинаптических нейронах и энтерохромаффинных клетках [4, 11].

Серотонин играет роль во многих физиологических процессах. Он модулирует сокращение (двигательную активность) сердца и кишечника, тонус сосудов и агрегацию тромбоцитов [4, 15]. Рецепторы 5-НТ располагаются на клеточной мембране и находятся в ЦНС, сердце, ЖКТ, в сосудах крови и на тромбоцитах. Существует 7 типов рецепторов 5-НТ (5-НТ₁–7), некоторые из них подразделяются на 5-НТ_{1A}, 5-НТ_{1B} и т.д. Активация 5-НТ₁ и -5 подавляет внутриклеточную аккумуляцию циклического аденозинмонофосфата, а активация 5-НТ₄ и -7 стимулирует ее. Активация 5-НТ₂ индуцирует высвобождение внутриклеточного кальция, а активация 5-НТ₃ стимулирует катионные каналы Na⁺/K⁺, приводя к мембранной деполяризации. Переносчики 5-НТ располагаются на плазматической мембране. Они активно переносят 5-НТ, например, из просвета кишечника и крови внутрь клеток [4]. Переносчики 5-НТ находятся в мозге, сердце, ЖКТ, надпочечниках, кровеносных сосудах и на тромбоцитах [13, 16].

5-НТ разрушается в клетках мозга, ЖКТ, печени, легких и тромбоцитах с помощью моноаминоксидаз и после выделяется почками в виде 5-гидроксииндолуксусной кислоты (5-НIAA) [4].

Тромбоциты запасают ДА и 5-НТ в плотных гранулах и являются их главными циркулирующими резервуарами [11, 17]. Активация тромбоцитов и высвобождение содержимого играют критическую роль при гемостазе, тромбозе и опухолевом ангиогенезе [18, 19]. При раке тромбоциты контактируют со стенками сосудов опухоли и высвобождают свое содержимое, состоящее из ДА и 5-НТ, а также кальция, фактора V, фибриногена и фактора роста эндотелия сосудов-A (VEGF-A), которое запасается в α-гранулах [11, 19, 20].

Дофамин и рак. Эксперименты *in vitro* показали, что ДА прямо может воздействовать на опухолевые клетки. У клеток рака яичников ДА (12,5–50 μM) уменьшал способность к инвазии в мембраны специальной культуральной системы и увеличивал апоптоз раковых клеток [8]. ДА (5 μM) также снижал пролиферацию клеток неходжкинской лимфомы. Этот эффект был нейтрализован свободными радикалами натрия метабисульфита. Авторы предполагают, что ДА индуцирует окислительный стресс [21].

Роль ДА при раке была изучена в экспериментах на животных. У мышей концентрация ДА в костном мозге уменьшилась в 7 раз после трансплантации саркомы [22]. На другой мышинной модели инъекции 6-гидроксидофамина элиминируют периферические дофаминергические нейроны и таким образом индуцируют истощение ДА. У этих мышей возникали большая по объему подкожная меланома и саркома, чем у мышей с интактными периферическими дофаминергическими нервами. Мыши с истощенным ДА имели также увеличенную плотность опухолевых микрососудов и проницаемость, так же как и усиление фосфорилирования рецепторов VEGF-R2 в опухолевых эндотелиальных клетках [23, 24]. В отличие от мышей с истощенным ДА мыши с нокаутированным транспортером ДА имеют гипердофаминергическую систему, что выражается в повышенном системном уровне ДА. Когда клетки мелкоклеточного рака легкого имплантируются подкожно, эти мыши имеют меньшие опухоли с более низкой плотностью микрососудов в сравнении с диким типом мышей [25]. Крысы, чувствительные к апоморфину (селекция из популяции крыс Wistar), имеют гиперреактивную дофаминергическую систему с более высоким количеством церебральной мРНК и ДАР-D2 белка тирозингидроксилазы. Через 7 дней после подкожной имплантации опухоли молочной железы были меньше, с более низкой плотностью микрососудов у крыс, чувствительных к апоморфину. Более того, у этих крыс развилось меньшее количество метастазов в легких [26].

Результатом воздействия ДА *in vivo* на разных моделях явилось подавление опухолевого роста, а также снижение плотности сети микрососудов в опухоли. ДА вводили внутривенно 50 мг/кг в день, что приводило к уровню ДА в плазме крови 1,2 μM на мышь и 2,4 μM на крысу через 1 мин после инъекции (5 % от летальной дозы для грызунов). ДА также снижал сосудистую проницаемость в ксенографтах рака прямой кишки, молочной железы и яичников (человека) у мышей *nude* при меньшем развитии асцита в последнем случае. У опухолевых клеток под воздействием ДА снижено фосфорилирование VEGF-R2 и других мишеней, например фокальной адгезионной киназы и митогенактивированной протеинкиназы [27–30].

В исследованиях на стрессированных мышцах *nude* с ксенографтами рака яичников человека было показано, что лечение ДА повышает степень покрытия перicyтами сосудистой сети опухоли [29]. Между тем усиленное покрытие перicyтами является показателем сосудистой нормализации, индуцированной антиангиогенной терапией [31].

Эффект ДА в комбинированной терапии был изучен у мышей с подкожно перевитой опухолью молочной железы, которые получали только ДА, только доксорубин, ДА и доксорубин или растворитель. ДА, доксорубин и их комбинация тормозили рост опухоли (171, 133 и 63 % соответственно от начального размера опухоли) в сравнении с лечением растворителем (413 % от начального размера) и увеличили продолжительность жизни (на 24, 38 и 90 %) в сравнении с контрольными мышами. Похожие результаты наблюдали у мышей *nude* с раком прямой кишки человека, леченных только ДА, только 5-фторурацилом, их комбинацией и растворителем [30]. У стрессированных мышей с наличием рака яичников ДА в комбинации с цисплатином повышал концентрацию последнего в опухоли, как показано в увеличенном опухоль–почка- и опухоль–печень-соотношении цисплатина. Эта комбинация показала 6-кратное уменьшение массы опухоли в сравнении с лечением только цисплатином [29].

Концентрация ДА также была изучена у онкологических больных. В опухолевой ткани рака прямой кишки у 36 пациентов уровень ДА был в 3–10 раз ниже, чем в здоровой ткани [32]. ДА и тирозингидроксилаза не выявлялись с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в ткани рака желудка 22 пациентов, в то время как присутствие того и другого было продемонстрировано в здоровой ткани желудка у 22 пациентов с аденоматозными полипами желудка [28].

Для достижения системного уровня ДА, который мог бы затормозить опухолевый рост, было проведено клиническое исследование, в котором 4 пациента с метастатической меланомой получали инфузии

ДА в максимальной дозе 20 мкг/кг/мин в течение 48–120 ч, при этом уровень ДА в плазме достигал от 1 до 10 μM . Однако исследование было остановлено из-за тяжелых кардиоваскулярных побочных эффектов после проведения только одного цикла терапии. *Ex vivo* тест на пролиферацию биопсийного материала, взятого до и сразу после цикла терапии, показал 10-кратное снижение (от 1–3 до 0,1–0,2) H3-тимидиновой метки в опухолевых клетках [33].

Различные типы опухолевых клеток экспрессируют рецепторы и транспортеры ДА [8, 21, 34, 35]. На поведение опухолевых клеток могут влиять агонисты ДАР D2. Например, рост клонов человеческого мелкоклеточного рака легкого подавлялся агонистом D2 бромокриптином (0,1 nM) [36].

Роль ДАР D2 была также изучена в экспериментах на животных. Мыши, нокаутированные по D2-рецептору, с мышинной саркомой или меланомой имели увеличенный размер опухоли, большую плотность микрососудов и лучшую их проницаемость в сравнении с диким типом [22, 23]. Можно полагать, что D2-рецепторы необходимы для проявления функций ДА [22].

Агонисты D2 бромокриптин и квинпирол (10 мг/кг) подавляют ангиогенез опухоли у мышей с наличием рака яичников [27]. Антагонисты D2 этиклоприд или домперидон (10 мг/кг/день), введенные перед лечением ДА, наоборот, нейтрализуют дофаминовый эффект подавления роста рака желудка или яичников у мышей и крыс [8, 28, 29]. Индуцированное ДА покрытие перicyтами сосудов не подвергалось воздействию антагонистом ДАР D2 этиклопридом (10 мг/кг/сут) [29].

Существуют данные, показывающие, что активация ДАР D2 может подавлять клеточную пролиферацию опухоли, как показано в экспериментах с таргетной siРНК к D2. Учитывая опыты на стрессированных мышцах с человеческим раком, можно заключить, что ДА подавляет опухолевый ангиогенез и, следовательно, опухолевый рост через активацию D2 [37]. Также при активации D2-рецепторов выявлен эффект ограничения опухолевого роста при раке желудка и раке поджелудочной железы человека [38, 39].

Выявлено также, что ДАР D2 был экспрессирован в ткани рака желудка 65 пациентов, однако его уровень был ниже в опухолях, чем в доброкачественных полипах и нормальной ткани желудка у 83 % контрольных пациентов [40].

Вместе с тем влияние активации ДАР D1 на опухолевый ангиогенез имеет конфликтный характер. В одних исследованиях показано, что мыши, нокаутированные по D1, с мышинной карциномой легких имеют меньшие опухоли, чем «дикий» тип этих мышей. У «дикого» типа мышей антагонист D1 siH 23390 (0,3 мг/кг/день) подавляет опухолевый рост и снижает

плотность сосудистой микросети [41]. Однако на мышах с раком яичников ни антагонист D1 siH 23390 (10,0 мг/кг/день), ни агонист D1 SKF38390 (10,0 мг/кг/день) не влияют на опухолевую васкуляризацию и возникновение асцита [27]. У стрессированных мышей с человеческой опухолью яичников SKOV3ip1 или NeuA8 антагонист D1 бутакламола (1,5 мг/кг/день) не влиял на ДА-индуцированное подавление ангиогенеза и опухолевый рост. Также бутакламола не подавлял усиленное покрытие перicyтами опухолевых сосудов, вызванное воздействием ДА на этих моделях. У таких мышей введение агониста D1 SKF382958 (1,0 мг/кг/день) выражалось в увеличении покрытия перicyтами опухолевых сосудов. Наряду с этим комбинированное лечение цисплатином с агонистом D1 SKF382958 приводило к 2-кратному увеличению концентрации цисплатина в опухоли по сравнению с печенью и почками и 5-кратному снижению опухолевого роста в сравнении с контролем, который лечили только цисплатином [29]. Также выявлено, что ДА и агонисты ДАР D1 через сигнальные пути протеинкиназы G индуцируют апоптоз, подавляют инвазию и снижают выживаемость ксенографтов рака молочной железы (разных линий). Например, агонист D1-рецепторов фенолдопам подавлял рост клеток рака молочной железы, усиливая их апоптоз и некроз [41].

Недавние результаты на мышах nude свидетельствуют о подавлении пролиферации и жизнеспособности клеток глиобластомы человека антагонистами D4-рецепторов [42].

Суммируя вышесказанное, ДА и тирозингидроксилаза присутствуют в меньшей концентрации в опухолях, чем в доброкачественных тканях. Увеличение уровня ДА при его введении системно, как показали исследования, вероятно, подавляет пролиферацию опухолевой ткани у пациентов, например с меланомой. Однако применение такого лечения пока не представляется возможным из-за выраженной токсичности данного катехоламина.

Вклад дофаминергической системы в механизмы иммуномодуляции

Следует особо указать, что ДА вовлечен в регуляцию иммунной реактивности организма. Иммуннокомпетентные органы богато иннервированы симпатическими нервами, содержащими большие количества ДА. Более того, различные субпопуляции лимфоцитов продуцируют ДА и экспрессируют практически все из известных к настоящему времени типы ДАР. Способность эндогенного ДА, а также агонистов и антагонистов его рецепторов, присутствующих на клетках иммунной системы, оказывать влияние на процессы клеточной пролиферации, дифференцировки, апоптоза, миграционные свойства лимфо-

цитов, продукцию цитокинов и, как следствие, на развитие иммунопатологических процессов широко отражена в публикациях [42–45].

Экспериментальные и клинические наблюдения демонстрируют существенные взаимодействия между ЦНС и иммунной системой. Выявлено, например, что истощение «центрального» ДА при введении в головной мозг нейротоксина 6-гидроксидофамина приводит к снижению содержания периферического ДА, а также подавлению пролиферации лимфоцитов и продукции ими интерлейкина-2, интерферона γ . Кроме того, уменьшается уровень натуральных киллеров в селезенке и периферической крови, а также содержание периферических цитотоксических Т-клеток (лимфоцитов CD8+). Системное введение другого нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидроперидина сопровождается угнетением пролиферации Т-лимфоцитов селезенки в ответ на митогены, цитотоксической активности Т-клеток, натуральных киллеров, усилением роста трансплантированной карциномы Эрлиха, повышением в плазме крови уровня интерлейкинов-1 β и -6 [44, 46–48]. Таким образом, результаты показали критическую роль центрального и периферического ДА в модуляции функций иммунитета [49].

Оперативные или химические разрушения nigrostriарных структур мозга широко применяются для создания экспериментальных моделей болезни Паркинсона и депрессивного синдрома, которым также свойственно подавление иммунологической реактивности [50, 51].

Вместе с тем выявлены существенные различия иммунной реактивности крыс линии APO-SUS, выбранных в качестве модели шизофрении при высокой чувствительности к апоморфину, по сравнению с гиподофаминергической, менее чувствительной к апоморфину линией APO-UNSUS. Крысы линии APO-SUS наряду с гиперактивностью дофаминергической системы и типичными для шизофрении поведенческими реакциями характеризуются замедлением процессов развития опухолей, их метастазирования и роста питающих опухоль сосудов [52]. Подавление роста опухолей и их васкуляризации, а также высокий IgG-иммунный ответ были отмечены и при использовании генетической модели шизофрении у мышей с врожденным недостатком дофаминовых транспортеров, что приводит к гипердофаминергии за счет усиления в нервных терминалях дофаминергической трансмиссии [25, 53].

Ингибиторы ДАР D1 и D2 способствуют подавлению цитолитической активности Т-лимфоцитов при нарушении формирования конъюгатов эффекторов иммунитета с клетками-мишенями. Воздействие ингибиторов ДАР D1 и D2 также предотвращало повышение цитотоксической активности Т-лимфоцитов,

индуцированной интерлейкином-2 и интерфероном γ . Таким образом, катехоламин ДА может контролировать киллерную активность лимфоцитов и адгезионные взаимодействия последних с клетками-мишенями [54].

Выявлено также, что ДА способствует созреванию тимоцитов, а также дифференцировке лимфоцитов. При этом экспрессия транспортеров и рецепторов ДА в большей степени показана при дифференцировке лимфоцитов CD8⁺ по сравнению с CD4⁺. Более выраженная экспрессия дофаминергических маркеров в популяции лимфоцитов CD8⁺ говорит в пользу того, что ДА может играть роль в созревании цитотоксических Т-клеток и участвовать в активной фазе иммунного ответа [10].

Вместе с тем известно, что пересечение гипоталамической ножки препятствует проявлению эффектов на иммунные реакции веществ, усиливающих или подавляющих активность дофаминергической системы. Это является убедительным экспериментальным подтверждением центрального характера иммуномодулирующего влияния дофаминергической системы [55–57].

Периферическим звеном реализации влияния дофаминергической системы является тимус. Его удаление, в частности, предотвращает усиление иммунных реакций, вызванное либо прямой активацией дофаминергической системы селективными агонистами, либо снижением активности серотонинергической системы, которая взаимодействует с дофаминергической, что имеет принципиальное значение для регуляции иммунной функции [57, 59].

Серотонин и рак. *In vitro* на некоторых опухолевых линиях было показано, что 5-НТ стимулировал их пролиферацию [60–69]. В культуре клеток холангиокарциномы человека уровень мРНК ТРГ был в 2,5–50 раз выше, а мРНК моноаминоксидазы-А – в 2 раза ниже в сравнении с незлокачественными холангиоцитами. Таким образом, продукция 5-НТ опухолевыми клетками была повышена. Ограничение роста человеческой холангиокарциномы у мышей после воздействия ингибитором ТРГ СРА (150 мг/кг 3 раза в неделю) в течение 2 мес может служить основанием для предположения, что снижение уровня 5-НТ влияет на поведение опухоли, задерживая ее рост [59]. 5-НТ стимулировал пролиферацию клеточной линии человеческой гепатоцеллюлярной карциномы Huh7 в бессывороточной среде, индуцируя фосфорилирование FOXO3A. Однако этот эффект не наблюдается в 2 других линиях человеческой гепатоцеллюлярной карциномы – HepG2 и Hep3b [63].

Эксперименты *in vitro* также показали, что различные 5-НТ-рецепторы могут присутствовать на нескольких типах опухолевых клеток. Опухолевый рост может быть подавлен антагонистами 5-НТ, экспрес-

сированными на опухолевых клетках. В клетках мелкоклеточной карциномы легкого 5-НТ1А и 5-НТ1D могут быть мишенями антагонистов (500 нМ спиперона, GR127935) для достижения максимального подавления клеточного роста, индуцированного 5-НТ. Воздействие антагонистом 5-НТ2В SB204741 (20 г/кг) снижало опухолевый рост и плотность сети микрососудов у мышей при раке легкого и меланоме [25].

В экспериментах на животных был изучен эффект насыщения и истощения 5-НТ в поведении опухоли. Ксенографты гепатоцеллюлярной карциномы неспособны расти на мышах, дефицитных по ТРГ (и следовательно, при истощении 5-НТ) [67]. Карцинома кишки и легкого у мышей, дефицитных по ТРГ, была соответственно в 3 и 1,5 раза меньше, чем у мышей «дикого» типа. Плотность сосудистой сети при раке кишечника была также снижена у мышей, дефицитных по ТРГ. Рост карциномы кишечника и легкого может быть восстановлен, если гидрокситриптофан (50 мг/кг 2 раза в день) вводить подкожно за 2 дня до инокуляции опухоли. Мыши, дефицитные по ТРГ, имели концентрации VEGF и VEGFR2 такие же, как у «дикого» типа мышей, но более высокие концентрации матриксной металлопротеиназы-12 и ангиостатина. Матриксная металлопротеиназа-12 превращает плазминоген в ангиостатин, который является эндогенным ингибитором ангиогенеза. Таким образом, вероятно, 5-НТ воздействует на метаболический путь ангиостатина, а не VEGF [9].

У онкологических пациентов были проведены иммуногистохимические исследования. Для выявления нейроэндокринных опухолевых клеток были использованы маркеры хромогранин А и 5-НТ, позволяющие идентифицировать нейроэндокринные очаги при раке предстательной железы. Наличие 5-НТ-позитивных клеток сочеталось с высокой плотностью микрососудов и VEGF-экспрессией [69, 70]. У 109 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой экспрессия 5-НТ1А и 5-НТ1В в опухолевой ткани была повышена по сравнению с окружающей здоровой тканью печени. У 176 пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой экспрессия 5-НТ1А, 5-НТ1В и 5-НТ2В сопровождалась высоким индексом пролиферации в опухолях. Кроме того, уровень экспрессии 5-НТ1В коррелировал с размером опухоли у этих пациентов [67]. В случае рака предстательной железы среди 25 пациентов экспрессия 5-НТ4 выявлялась только при III–IV степени злокачественности [61]. У 102 пациентов с наличием рака легкого была выявлена экспрессия 5-НТ1А, 5-НТ1В, 5-НТ2В и 5-НТ4. При этом не было выявлено корреляции между уровнем экспрессии рецептора и стадией процесса [71]. В 159 случаях метастазов в костях при карциноме и саркоме выявлено, что экспрессия 5-НТ в комбинации с рецептором 1 фактора

некроза опухоли ассоциирована с низкой выживаемостью [72].

Таким образом, основываясь на данных литературы, можно сделать вывод, что ДА ингибирует рост опухоли, в то время как 5-НТ его стимулирует [73]. Эксперименты на животных и *in vitro* показали, что ДА подавляет пролиферацию опухолевых клеток через активацию D1- и D2-рецепторов. Однако использование ДА для лечения весьма проблематично из-за токсичности в отношении сердечно-сосудистой системы. Наряду с этим выявлено, что ДА может играть роль в дифференцировке цитотоксических лимфоцитов CD8+, контролировать их киллерную активность и участвовать в активной фазе противоопухолевых иммунных реакций организма. Вероятно, перспективными являются клинические исследования индукторов ДА или агонистов его маркеров (D1, D2, дофаминовые транспортеры и др.).

Выводы и перспективы

С учетом изложенного можно представить себе следующую картину функционирования дофаминергической системы. При определенном содержании ДА с его рецепторами в ЦНС и на периферии поддерживается соответствующий уровень двигательной активности скелета, тонуса внутренних органов и сосудов, а также когнитивных (познавательных) возможностей головного мозга. Вместе с тем сохраняются мотивационная, эмоциональная функция, хорошее настроение, жизнелюбие, способность развивать гибкое поведение в ответ на изменения ок-

ружающей обстановки с комплексной регуляцией сложного поведения. Иными словами, чем дольше поддерживается соответствующий уровень жизне-способных дофаминергических нейронов, тем менее активны механизмы старения и более продолжителен жизненный процесс.

Наряду с этим определенный уровень ДА в периферическом организме, основные запасы которого содержатся в тромбоцитах крови, может служить гарантом также противоопухолевой защиты, поскольку ДА способен подавлять пролиферацию опухолевых клеток и развитие питающих их сосудов. Будучи продукцией в том числе и лимфоцитов, играя роль в дифференцировке цитотоксических лимфоцитов CD8+, миграционных свойствах и контроле их киллерной активности с образованием конъюгатов с клетками-мишенями, ДА может участвовать в активной фазе противоопухолевых иммунных реакций организма. В данном случае катехоламин ДА можно расценивать в качестве эндогенного токсического агента для опухолевых клеток. Последнее также вносит свой вклад в защиту организма от опухолевых патологий, связанных с ускоренным старением, которые, очевидно, ограничивают долголетие.

Таким образом, вышеизложенное подтверждает мнение, что дофаминергические нейроны участвуют в «интриге», ограничивающей жизнь, поскольку их полагают главными биомаркерами старения и стрессорных процессов, при том что ДА может участвовать в противоопухолевой защите организма.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Eisenhofer G., Aneman A., Friberg P. et al. Substantial production of dopamine in the human gastrointestinal tract. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(11):3864–71. DOI: 10.1210/jcem.82.11.4339.
- Kopin I.J. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev* 1985;37(4):333–64.
- Mezey E., Eisenhofer G., Harta G. et al. A novel nonneuronal catecholaminergic system: exocrine pancreas synthesizes and releases dopamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(19):10377–82. DOI: 10.1073/pnas.93.19.10377.
- Mohammad-Zadeh L.F., Moses L., Gwaltney-Brant S.M. Serotonin: a review. *J Vet Pharmacol Ther* 2008;31(3):187–99. DOI: 10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x.
- Beaulieu J.M., Gainetdinov R.R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev* 2011;63(1):182–217. DOI: 10.1124/pr.110.002642.
- Abdel-Hamid N.M., Shehata D.E., Abdel-Ghany A.A. et al. Serum serotonin as unexpected potential marker for staging of experimental hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother* 2016;83:407–11. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.07.005.
- Chakroborty D., Sarkar C., Basu B. et al. Catecholamines regulate tumor angiogenesis. *Cancer Res* 2009;69(9):3727–30. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4289.
- Moreno-Smith M., Lu C., Shahzad M.M. et al. Dopamine blocks stress-mediated ovarian carcinoma growth. *Clin Cancer Res* 2011;17(11):3649–59. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2441.
- Nocito A., Dahm F., Jochum W. et al. Serotonin regulates macrophage-mediated angiogenesis in a mouse model of colon cancer allografts. *Cancer Res* 2008;68(13):5152–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0202.
- Magnini F., Sabbatini M., Capacchietti M. et al. T-cell subpopulations express a different pattern of dopaminergic markers in intra- and extra-thymic compartments. *J Biol Regul Homeost Agents* 2013;27(2):463–75.
- Da Prada M., Picotti G.B. Content and subcellular localization of catecholamines and 5-hydroxytryptamine in human and animal blood platelets: monoamine distribution between platelets and plasma. *Br J Pharmacol* 1979;65:653–62.
- Eisenhofer G., Coughtrie M.W., Goldstein D.S. Dopamine sulphate: an enigma resolved. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999;26:41–53.
- Torres G.E., Gainetdinov R.R., Caron M.G. Plasma membrane monoamine

- transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:13–25. DOI: 10.1038/nrn1008.
14. Frankhauser P., Grimmer Y., Bugert P. et al. Characterization of the neuronal dopamine transporter DAT in human blood platelets. *Neurosci Lett* 2006;399(3):197–201. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.01.062.
 15. Nebigil C.G., Launay J.M., Hickel P. et al. 5-hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell-cycle progression: cross-talk with tyrosine kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(6):2591–6. DOI: 10.1073/pnas.050282397.
 16. Ni W., Watts S.W. 5-hydroxytryptamine in the cardiovascular system: focus on the serotonin transporter (SERT). *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33(7):575–83. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2006.04410.x.
 17. Da Prada M., Pletscher A. Differential uptake of biogenic amines by isolated 5-hydroxytryptamine organelles of blood platelets. *Life Sci* 1969;8:65–72.
 18. Marcus A.J., Safier L.B. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993;7(6):516–22. DOI: 10.1096/fasebj.7.6.8472890.
 19. Pinedo H.M., Verheul H.M., D'Amato R.J., Folkman J. Involvement of platelets in tumour angiogenesis? *Lancet* 1998;352:1775–7. DOI: 10.1016/s0140-6736(98)05095-8.
 20. Italiano A., Ortholan C., Dassonville O. et al. Head and neck squamous cell carcinoma in patients aged > or = 80 years: patterns of care and survival. *Cancer* 2008;113(11):3160–8. DOI: 10.1002/ncr.23931.
 21. Meredith E.J., Holder M.J., Rosén A. et al. Dopamine targets cycling B cells independent of receptors/transporter for oxidative attack: Implications for non-Hodgkin's lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(36):13485–90. DOI: 10.1073/pnas.0605993103.
 22. Chakroborty D., Chowdhury U.R., Sarkar C. et al. Dopamine regulates endothelial progenitor cell mobilization from mouse bone marrow in tumor vascularization. *J Clin Invest* 2008;118(4):1380–9. DOI: 10.1172/JCI33125.
 23. Basu S., Sarkar C., Chakroborty D. et al. Ablation of peripheral dopaminergic nerves stimulates malignant tumor growth by inducing vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Cancer Res* 2004;64(16):5551–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1600.
 24. Sarkar C., Chakroborty D., Mitra R.B. et al. Dopamine *in vivo* inhibits VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2, MAPK, and focal adhesion kinase in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(4):1554–60. DOI: 10.1152/ajpheart.00272.2004.
 25. Asada M., Ebihara S., Numachi Y. et al. Reduced tumor growth in a mouse model of schizophrenia, lacking the dopamine transporter. *Int J Cancer* 2008;123(3):511–8. DOI: 10.1002/ijc.23562.
 26. Teunis M.A., Kavelaars A., Voest E. et al. Reduced tumor growth, experimental metastasis formation, and angiogenesis in rats with a hyperreactive dopaminergic system. *FASEB J* 2002;16(11):1465–7. DOI: 10.1096/fj.02-0145fje.
 27. Basu S., Nagy J.A., Pal S. et al. The neurotransmitter dopamine inhibits angiogenesis induced by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2001;7(5):569–74. DOI: 10.1038/87895.
 28. Chakroborty D., Sarkar C., Mitra R.B. et al. Depleted dopamine in gastric cancer tissues: dopamine treatment retards growth of gastric cancer by inhibiting angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10(13):4349–56. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0059.
 29. Moreno-Smith M., Lee S.J., Lu C. et al. Biologic effects of dopamine on tumor vasculature in ovarian carcinoma. *Neoplasia* 2013;15(5):502–10.
 30. Sarkar C., Chakroborty D., Chowdhury U.R. et al. Dopamine increases the efficacy of anticancer drugs in breast and colon cancer preclinical models. *Clin Cancer Res* 2008;14(8):2502–10. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1778.
 31. Jain R.K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 2005;307(5706):58–62. DOI: 10.1126/science.1104819.
 32. Basu S., Dasgupta P.S. Decreased dopamine receptor expression and its second-messenger AMP in malignant human colon tissue. *Dig Dis Sci* 1999;44(5):916–21. DOI: 10.1023/a:1026644110737.
 33. Wick M.M. The chemotherapy of malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1983;80(Suppl. 1):61–2. DOI: 10.1038/jid.1983.16.
 34. Ganguly S., Basu B., Shome S. et al. Dopamine, by acting through its D2 receptor, inhibits insulin-like growth factor-I(IGF-I)-induced gastric cancer cell proliferation via up-regulation of Krüppel-like factor 4 through down-regulation of IGF-IR and AKT phosphorylation. *Am J Pathol* 2010;177(6): 2701–7. DOI: 10.2353/ajpath.2010.100617.
 35. Senogles S.E. D2 dopamine receptor mediated antiproliferation in a small cell lung cancer cell line, NCI-H69. *Anticancer Drugs* 2007;18(7):801–17. DOI: 10.1097/CAD.0b013e3280b10d36.
 36. Ishibashi M., Fujisawa M., Furue H. et al. Expression of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice. *Gastroenterology* 2016;151(6):1218–34. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.08.040.
 37. Jandaghi P., Najafabadi H.S., Bauer A.S. et al. Expression of DRD2 is increased in human pancreatic ductal adenocarcinoma and inhibitors slow tumor growth in mice. *Gastroenterology* 2016;5085(16):34982–4.
 38. Peverelli E., Giardino E., Treppiedi D. Dopamine receptor type 2 (DRD2) inhibits migration and invasion of human tumorous pituitary cells through ROCK-mediated cofilin inactivation. *Cancer Lett* 2016;381(2):279–86. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.08.005.
 39. Huang H., Wu K., Ma J. et al. Dopamine D2 receptor suppresses gastric cancer cell invasion and migration via inhibition of EGFR/AKT/MMP-13 pathway. *Int Immunopharmacol* 2016;39:113–20. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.07.002.
 40. Basu S., Dasgupta P.S. Alteration of dopamine D2 receptors in human malignant stomach tissue. *Dig Dis Sci* 1997;42(6):1260–4.
 41. Borcherdig D.C., Tong W., Hugo E.R. et al. Expression and therapeutic targeting of dopamine receptor-1 (D1R) in breast cancer. *Oncogene* 2016;35(24):3103–13. DOI: 10.1038/ncr.2015.369.
 42. Dolma S., Selvadurai H.J., Lan X. et al. Inhibition of dopamine receptor D4 impedes autophagic flux, proliferation, and survival of glioblastoma stem cells. *Cancer Cell* 2016;29(6):859–73. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.05.002.
 43. Watanabe Y., Nakayama T., Nagakubo D. et al. Dopamine selectively induces migration and homing of naive CD8+ T cells via dopamine receptor D3. *J Immunol* 2006;176(2):848–56. DOI: 10.4049/jimmunol.176.2.848.
 44. Sarkar C., Basu B., Chakroborty D. et al. The immunoregulatory role of dopamine: an update. *Brain Behav Immun* 2010;24(4):525–8. DOI: 10.1016/j.bbi.2009.10.015.
 45. Toth B., Vecsernyes M., Zelles T. et al. Role of peripheral and brain-derived dopamine(DA) in immune regulation. *Adv Neuroimm Biology* 2012;3:111–55.
 46. Tsao C.W., Lin Y.S., Cheng J.T. Effect of dopamine on immune cell proliferation in mice. *Life Sci*

- 1997;61(24):361–71. DOI: 10.1016/s0024-3205(97)00962-4.
47. Basu S., Dasgupta P. Dopamine, a neurotransmitter, influences the immune system. *J Neuroimmunol* 2000;102(2):113–24. DOI: 10.1016/s0165-5728(99)00176-9.
 48. Shen Y., Hebert G., Su Y. et al. In mice, production of plasma IL-1 and IL-6 in response to MPTP is related to behavioral lateralization. *Brain Res* 2005;1045(1–2):31–7. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.03.009.
 49. Pacheco-Lopes G., Niemi M.B., Kou W. et al. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. *J Neurochem* 2003;86(4):1024–31. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2003.01914.x.
 50. Fiszer U. Selected aspects of immunological disorders in Parkinsons disease. *Neurol Neurochir Pol* 2004;38(Suppl. 1):63–6.
 51. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В. и др. Нейроиммунно-эндокринные взаимодействия в норме и патологии. М.: Медицинская книга, 2010. 283 с. [Kryzhanovskiy G.N., Akmaev I.G., Magaeva S.V. et al. Neuroimmune-endocrine interactions in health and disease. Moscow: Medicinskaya kniga, 2010. 283 p. (In Russ.)].
 52. Teunis M.A., Heijnen C.J., Cools A.R., Kavelaars A. Reduced splenic natural killer cell activity in rats with a hyperreactive dopaminergic system. *Psychoneuroendocrinology* 2004;29(8):1058–64. DOI: 10.1016/j.psychenue.2003.09.007.
 53. Kavelaars A., Cobelens P.M., Teunis M.A., Heijnen C.J. Changes in innate and acquired immune responses in mice with targeted deletion of the dopamine transporter gene. *J Neuroimmunol* 2005;161(1–2):162–8. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.01.004.
 54. Won S.J., Chuang Y.C., Huang W.T. et al. Suppression of natural killer cell activity in mouse spleen lymphocytes by several dopamine receptor antagonists. *Experientia* 1995;51(4):343–8. DOI: 10.1007/bf01928892.
 55. Альперина Е.Л., Идова Г.В., Девойно Л.В. Роль гипофиза в модулирующем влиянии на иммунный ответ допаминергической и серотонинергической систем. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова* 1985;11:1428–31. [Alperina E.L., Idova G.V., Devoino L.V. The role of the pituitary in the modulating effect on the immune response of dopaminergic and serotonergic systems. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology* 1985;11:1428–31. (In Russ.)].
 56. Девойно Л.В., Идова Г.В., Альперина Е.Л. и др. Нейромедиаторные системы мозга в модуляции иммунной реакции (дофамин, серотонин, ГАМК). *Нейроиммунология* 2005;3(1):11–8. [Devoino L.V., Idova G.V., Alperina E.L. et al. Neurotransmitter systems of the brain in the immune response modulating (dopamine, serotonin, GABA. *Neuroimmunologiya = Neuroimmunology* 2005;3(1):11–8. (In Russ.)].
 57. Альперина Е.Л., Идова Г.В. Центральный характер взаимодействия нейромедиаторных систем в иммуномодуляции. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова* 1990;76(4):453–8. [Alperina E.L., Idova G.V. The central nature of neurotransmitter systems interaction in immunomodulation. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR im. I.M. Sechenova = Russian Journal of Physiology* 1990;76(4):453–8. (In Russ.)].
 58. Devoino L., Alperina E., Idova G. Dopaminergic stimulation of the immune reaction: interaction of serotonergic and dopaminergic systems in neuroimmunomodulation. *Int J Neurosci* 1988;40(3–4):271–88. DOI: 10.3109/00207458808990716.
 59. Alpini G., Invernizzi P., Gaudio E. et al. Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth. *Cancer Res* 2008;68(22):9184–93. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2133.
 60. Cattaneo M.G., Palazzi E., Bondiolotti G., Vicentin L.M. 5-HT1D receptor type is involved in stimulation of cell proliferation by serotonin in human small cell lung carcinoma. *Eur J Pharmacol* 1994;268(3):425–30. DOI: 10.1016/0922-4106(94)90068-X.
 61. Dizzei N., Bjartell A., Hedlund P. et al. Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines. *Eur Urol* 2005;47(6):895–900. DOI: 10.1016/j.eururo.2005.02.006.
 62. Drozdov I., Kidd M., Gustafsson B.I. et al. Autoregulatory effects of serotonin on proliferation and signaling pathways in lung and small intestine neuroendocrine tumor cell lines. *Cancer* 2009;115(21):4934–45. DOI: 10.1002/cncr.24533.
 63. Liang C., Chen W., Zhi X. et al. Serotonin promotes the proliferation of serum-deprived hepatocellular carcinoma cells via upregulation of FOXO3a. *Mol Cancer* 2013;12:14. DOI: 10.1186/1476-4598-12-14.
 64. Pirozhok I., Meye A., Hakenberg O.W. et al. Serotonin and melatonin do not play a prominent role in the growth of prostate cancer cell lines. *Urol Int* 2010;84(4):452–60. DOI: 10.1159/000296296.
 65. Siddiqui E.J., Shabbir M.A., Mikhailidis D.P. et al. The effect of serotonin and serotonin antagonists on bladder cancer cell proliferation. *BJU Int* 2006;97(3):634–9. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2006.06056.x.
 66. Siddiqui E.J., Shabbir M.A., Mikhailidis D.P. et al. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J Urol* 2006;176(4):1648–53. DOI: 10.1016/j.juro.2006.06.087.
 67. Soll C., Riener M.O., Oberkofler C.E. et al. Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res* 2012;18(21):5902–10. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1813.
 68. Sonier B., Arseneault M., Lavigne C. et al. The 5-HT2A serotoninergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343(4):1053–99. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.03.080.
 69. Heinrich E., Trojan L., Friedrich D. et al. Neuroendocrine tumor cells in prostate cancer: evaluation of the neurosecretory products serotonin, bombesin, and gastrin – impact on angiogenesis and clinical follow-up. *Prostate* 2011;71(16):1752–8. DOI: 10.1002/pros.21392.
 70. Chevalier S., Defoy I., Lacoste J. et al. Vascular endothelial growth factor and signaling in the prostate: more than angiogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2002;189(12):169–79. DOI: 10.1016/s0303-7207(01)00728-6.
 71. Koppurapu P.K., Boorjian S.A., Robinson B.D. et al. Expression of cyclin D1 and its association with disease characteristics in bladder cancer. *Anticancer Res* 2013;33(12):5235–42.
 72. Chiechi A., Novello C., Magagnoli G. et al. Elevated TNFR1 and serotonin in bone metastasis are correlated with poor survival following bone metastasis diagnosis for both carcinoma and sarcoma primary tumors. *Clin Cancer Res* 2013;19(9):2473–85. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3416.
 73. Peters M.A., Walenkamp A.M., Kema I.P. et al. Dopamine and serotonin regulate tumor behavior by affecting angiogenesis. *Drug Resist Updat* 2014;17(4–6):96–104. DOI: 10.1016/j.drug.2014.09.001.

Вклад авторов

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

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

В.Г. Кучеряну, А.А. Вершинская: 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, A.A. Vershinskaya: 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 сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 09.01.2019. Принята в печать: 18.09.2019.

Article submitted: 09.01.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР)

И.В. Дармов, Я.А. Кибирев, И.В. Маракулин, С.Н. Янов

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России;
Россия, 610000 Киров, Октябрьский проспект, 119

Контакты: Ярослав Александрович Кибирев 23527@mail.ru

Бактериальные средства лечения злокачественных новообразований известны уже более ста лет, однако в клинике они нашли весьма ограниченное применение. В последнее десятилетие отмечается возрождение интереса к разработке средств биотерапии рака на основе бактерий, что связано с прогрессом в области генной инженерии и глубоким познанием механизмов инфекционного процесса и иммунитета. Целью настоящего обзора является рассмотрение современного состояния и перспектив разработки и применения препаратов на основе живых бактерий, предназначенных для лечения злокачественных опухолей. В обзоре представлены данные оценки на экспериментальных моделях противоопухолевого потенциала различных видов и штаммов бактерий; наиболее значимые результаты клинических испытаний бактериальных противоопухолевых средств; современные направления конструирования бактериальных штаммов как средств адресной доставки лекарственных субстанций в опухоли. Сделано заключение о том, что разработка бактериальных средств терапии рака является перспективным направлением экспериментальной онкологии.

Ключевые слова: злокачественная опухоль, бактериальное средство терапии, конструирование терапевтических штаммов

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-34-42

USE OF BACTERIA IN CANCER THERAPY (REVIEW)

I. V. Darmov, Ya. A. Kibirev, I. V. Marakulin, S. N. Yanov

Branch of the Federal State Establishment "48 Central Research and Development Institute" Russian Federation
Ministry of Defense (Kirov); 119 Oktyabr'skiy Prospekt, Kirov 610000, Russia

Bacterial drugs for the treatment of malignant tumors have been discovered more than a hundred years ago, but their use in clinical practice has been very limited. In the past decade, there has been a revival of interest in the development of bacterial-based cancer biotherapies, which is associated with advances in genetic engineering and in depth knowledge of the mechanisms of the infectious process and immunity. The purpose of this review is to examine the current state and prospects for the development and use of drugs based on live bacterium, intended for the treatment of malignant tumors. The review presents evaluation data on experimental models of the antitumor potential of various species and strains of bacteria; the most significant results of clinical trials of bacterial antitumor agents; current trends in the design of bacterial strains for targeted drug delivery to the tumor. It is concluded that development of bacterial drugs for cancer therapy is a perspective branch of experimental oncology.

Key words: malignant tumor, bacterial drug, therapeutic strains design

Введение

Методический подход к терапии злокачественных новообразований, основанный на использовании живых бактерий, известен с XIX в. Пионером в этой области считается американский врач W. Coley (1862–1936), который лечил больных с неоперабельной саркомой прямым введением в опухоль взвеси живых или убитых нагреванием патогенных бактерий *Streptococcus pyogenes* и *Serratia marcescens*. Лечение оказалось успешным, во многих случаях было отмечено торможение роста опухоли, иногда — полная ее деструкция, однако процесс зачастую сопровождался развитием побочных реакций [1].

Несмотря на достигнутые положительные результаты, разработанный W. Coley способ лечения вскоре после его смерти был забыт, что связано с неспособностью ученых того времени объяснить механизм терапевтического действия и снизить риск побочных реакций. Этому способствовало также широкое внедрение в клиническую практику радио- и химиотерапии, которые надолго вытеснили бактериальные средства из поля зрения онкологов.

Тем не менее к настоящему времени препараты на основе бактерий, хотя и немногочисленные, вошли в арсенал противоопухолевых средств. Так, с конца 1970-х годов в клинике успешно используют

противотуберкулезную вакцину, приготовленную из живых бактерий аттенуированного штамма BCG *Mycobacterium bovis*, для предотвращения рецидивов рака мочевого пузыря после хирургического удаления первичной опухоли [2]. Имеются данные о применении живой туляремийной вакцины на основе штамма 15 *Francisella tularensis* в комплексной терапии больных раком тела матки и легкого [3]. Для лечения онкозаболеваний предложен также иммуномодулирующий препарат, который представляет собой взвесь живых бактерий выделенного от человека штамма *Corynebacterium krestovnicova-troitskaya* [4]. Перечисленные препараты стимулируют гуморальные и клеточные звенья противоинфекционного иммунитета и способны опосредованно подавлять рост опухолей.

Между тем достижения генной инженерии, а также глубокое познание механизмов инфекционного процесса, вызываемого бактериями, привели к возрождению интереса к разработке бактериальных средств терапии опухолей и обусловили, уже на новой методической основе, бурный рост исследований в этой области. Целью настоящего обзора является рассмотрение современного состояния и перспектив разработки и применения препаратов на основе живых бактерий, предназначенных для лечения злокачественных опухолей.

Оценка противоопухолевого потенциала бактерий на экспериментальных моделях

К настоящему времени на экспериментальных моделях оценен потенциал около 10 видов бактерий как основы для создания средств терапии онкозаболеваний. К ним относятся как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, представители родов *Clostridium*, *Salmonella*, *Listeria*, *Bifidobacterium* и некоторых других (табл. 1).

Одно из основных направлений разработки бактериальных средств терапии онкозаболеваний связано с использованием анаэробных бактерий и, в частности, клостридий. Известно, что большинство солидных опухолей независимо от их размера содержит очаги гипоксии и/или некроза, возникновение которых связано с неравномерным формированием сети кровеносных сосудов в опухоли. Указанные очаги, с одной стороны, представляют собой уникальную среду, которая не встречается нигде больше в организме, а с другой — являются идеальной экологической нишей для роста анаэробных бактерий, среди которых особый интерес в рассматриваемом аспекте представляют именно клостридии.

Как таксономическая группа род *Clostridium* приобрел известность благодаря его патогенным представителям, таким как *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*. Клостридии — строгие анаэробы, однако они могут

образовывать споры, что обеспечивает их выживание в аэробных условиях. Эти споры прорастают, превращаясь в метаболически активные клетки (вегетативные формы) в благоприятных условиях (например, в ранах или испорченном мясе). При этом для вегетативных форм многих клостридий характерна высокая протеолитическая активность, которая придает им способность вызывать деструкцию опухолевой ткани. Дополнительным достоинством клостридий как возможного противоракового средства следует считать их чувствительность к широкому спектру антибиотиков, что позволяет осуществлять строгий контроль за микроорганизмами в процессе лечения.

Впервые способность спор клостридий избирательно накапливаться и прорасти в солидных опухолях была показана на примере *C. tetani* при внутривенном введении мышам еще в 1955 г. [5]. В последующем была изучена противоопухолевая активность еще нескольких видов клостридий — как непатогенных (*C. acetobutylicum* [6], *C. sporogenes* [7]), так и патогенных для людей и животных (*C. novyi* [8], *C. perfringens* [9]).

Наиболее впечатляющие результаты недавно были получены N.J. Roberts и соавт., которые провели клинко-экспериментальное исследование противоопухолевого потенциала спор аттенуированного штамма *C. novyi*-NT (NT — non toxic) при местном введении [10]. Аттенуированный штамм был получен на основе токсигенного штамма *C. novyi* дикого типа путем отбора варианта с делецией гена α -токсина. Прямое введение спор нетоксигенного штамма в опухоль значительно повышало выживаемость подопытных мышей (ортотопическая модель опухоли мозга) и приводило к мощному противораковому эффекту у собак при спонтанных карциномах мягких тканей. Используемый авторами штамм *C. novyi*-NT, обладая сильными протеолитическими свойствами, после прорастания спор вызывал редукцию и некроз опухоли [10]. Непатогенные клостридии *C. acetobutylicum* и *C. sporogenes* характеризуются менее выраженной протеолитической активностью, но их терапевтический потенциал может быть усилен путем передачи им дополнительных генов [9].

В данном контексте представляется значительным прорывом предложенный J. Т. Неар и соавт. способ, обеспечивающий стабильную интеграцию чужеродного гена в клостридиальный геном [24]. Появилась возможность встраивать в хромосому любой целевой ген, тем самым сводя к минимуму риск его утраты, обусловленный сегрегационной нестабильностью векторных плазмид. Это облегчает получение разрешения на проведение клинических испытаний при введении больному бактерий с чужеродным геном, так как гарантированно выполняется требование о стабильной интеграции гена. Примером высокого потенциала предлагаемого подхода может

Таблица 1. Виды бактерий, исследуемых в качестве средств терапии рака на экспериментальных моделях в условиях *in vivo*Table 1. Types of bacteria investigated as cancer therapies on experimental models *in vivo*

Вид, штамм бактерий Bacteria type, strain	Экспериментальная модель Experimental model	Достигнутый результат Result	Ссылка на литературный источник Reference
<i>C. tetani</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Избирательное накопление и прорастание спор в опухоли, редукция опухоли Selective spores accumulation and germination inside a tumor, tumor reduction	[5]
<i>C. acetobutyricum</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Избирательное накопление и прорастание спор в опухоли, редукция опухоли Selective spores accumulation and germination inside a tumor, tumor reduction	[6]
<i>C. sporogenes</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Частичный лизис опухоли Partial tumor lysis	[7]
<i>C. novyi</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Колонизация опухоли Tumor colonization	[8]
<i>C. perfringens</i>	Мыши, солидные опухоли Mice, solid tumors	Частичный лизис опухоли Partial tumor lysis	[9]
<i>C. novyi-NT</i>	Собаки, спонтанные опухоли Dogs, spontaneous tumors	Колонизация опухоли, продление срока жизни Tumor colonization, life extension	[10]
<i>C. novyi-NT</i>	Крысы, глиобластома Rats, glioblastoma	Колонизация опухоли, продление срока жизни Tumor colonization, life extension	[11]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, рак легкого Nude mice, lung cancer	Адресная доставка в опухолевую ткань при внутривенном введении Targeted delivery to tumor tissue when administered intravenously	[12]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, глиома Nude mice, glioma	Торможение роста опухоли, продление срока жизни Tumor growth inhibition, life extension	[13]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, метастазы рака легкого в костную ткань Nude mice, lung cancer with bone metastases	Торможение роста метастазов Metastatic growth inhibition	[14]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, рак поджелудочной железы Nude mice, pancreatic cancer	Задержка роста опухоли Tumor growth inhibition	[15]
<i>S. typhimurium</i> A1-R	Бестимусные мыши, рак яичника Nude mice, ovarian cancer	Продление срока жизни, снижение метастазирования Life extension, metastasis reduction	[16]
<i>S. typhimurium</i>	Мыши, карцинома (CT26) Mice, carcinoma (CT26)	Полное отторжение опухоли Complete tumor rejection	[17]
<i>L. monocytogenes</i>	Мыши, рак яичника Mice, ovarian cancer	Лизис опухолевых клеток Tumor cells lysis	[18]
<i>L. monocytogenes</i> ANZ-100	Мыши, рак поджелудочной железы Mice, pancreatic cancer	Продление срока жизни Life extension	[19]
<i>B. longum</i>	Крысы, рак молочной железы Rats, mammary cancer	Высокий уровень колонизации опухоли High level of tumor colonization	[20]
<i>E. coli</i>	Мыши, рак легкого (4T1) Mice, lung cancer (4T1)	Регрессия и некроз опухоли Tumor regression and necrosis	[21]
<i>E. coli</i>	Мыши, карцинома (CT26) Mice, carcinoma (CT26)	Колонизация и некроз опухоли Tumor colonization and necrosis	[22]
<i>L. acidophilus</i>	Мыши, карцинома (CT26) Mice, carcinoma (CT26)	Усиление апоптоза, подавление роста опухоли Enhanced apoptosis, tumor growth inhibition	[23]

служить встраивание гена иммуноглобулина в геном как *C. novyi*-NT, так и *C. sporogenes* [25], что создает возможность проведения комбинированной терапии антителами и клостридиями.

В целом клостридии следует рассматривать в качестве удобных векторов, обеспечивающих эффективную доставку в неопластическую ткань терапевтических генов без нанесения значимого вреда пациенту. Однако существенным недостатком клостридий является ограничение области их действия зонами гипоксии. Метастазы или небольшие по размеру опухоли, лишенные некротических зон, не могут эффективно колонизироваться клостридиями. Чтобы снять данное ограничение и нацелить бактериальные терапевтические средства также на опухоли, состоящие из жизнеспособных, снабжаемых кислородом клеток, предложено использовать факультативно анаэробные бактерии, в частности, *Salmonella typhimurium*. При этом штаммы дикого типа должны подвергаться аттенуированию для обеспечения безопасности пациента.

К настоящему времени получен ряд аттенуированных штаммов сальмонелл либо путем пассирования культур в условиях *in vitro* или *in vivo*, либо путем целенаправленной инактивации определенных генов [26, 27]. С помощью 1-го методического подхода были получены 2 метаболически дефектных штамма сальмонелл: VNP20009 (ауксотроф по пуринам) и A1-R (ауксотроф по аргинину и лейцину) [28], которые обладали повышенной тропностью к опухолевой ткани и проявили высокую эффективность при исследовании на экспериментальных моделях злокачественных опухолей [12–17, 29].

Важным результатом этих исследований явилась частичная расшифровка механизма индукции бактериями противоопухолевого эффекта. Как было установлено, бактериемия вызывает индукцию врожденного иммунитета, в частности способствует повышению уровня фактора некроза опухоли α , что облегчает колонизацию сальмонеллами солидных опухолей [30, 31]. Это сопровождается адьювантным действием сальмонелл, одновременно активирующих приобретенный иммунитет, благодаря чему повышается содержание специфичных по отношению к опухоли цитотоксических Т-лимфоцитов, способных разрушать оставшуюся опухолевую ткань [32].

Использование листерий, относящихся к факультативным аэробам, в терапии рака [18, 19] обусловлено главным образом тем, что, являясь внутриклеточными паразитами, они способны длительное время выживать в лимфоидных клетках селезенки, печени, почек, лимфатических узлов. Поэтому аттенуированные штаммы листерий считаются идеальными реципиентами для создания живых противораковых вакцин, способными обеспечивать продолжительную

экспрессию специфических опухолевых антигенов в организме больного.

Особый интерес представляют результаты оценки противоопухолевого потенциала непатогенных бактерий – представителей собственной нормофлоры человека, а именно: *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. (анаэробы), *Escherichia coli* (факультативный анаэроб) [20–23]. Показано, в частности, что бактерии *Bifidobacterium longum* способны к транслокации из кишечника во внутреннюю среду организма с фиксацией в макрофагах печени, обеспечивая при этом высокий уровень колонизации опухоли молочной железы у крыс [20]. Штаммы кишечной палочки избирательно колонизировали мышинные опухоли и вызывали их некроз [21, 23]. Оральное введение мышам пробиотических бактерий *Lactobacillus acidophilus* привело к подавлению роста опухоли, усилению апоптоза опухолевых клеток [22]. Полученные результаты позволяют надеяться на разработку в скором времени средств терапии рака на основе безопасных и безвредных пробиотических препаратов, обладающих помимо противоопухолевого эффекта широким спектром лечебно-профилактического действия.

Клинические испытания бактериальных противоопухолевых средств

Клинические испытания проводились с отдельными представителями родов *Clostridium*, *Salmonella* и *Listeria*. Наиболее значимые результаты испытаний представлены в табл. 2.

Первая попытка клинического применения спор *Clostridium histolyticum* имела место в 1947 г. [33, 34]. И хотя в этих экспериментах отмечалось избирательное накопление спор в опухолевой ткани, сопровождающееся развитием противоопухолевого эффекта, системное действие экзотоксинов было чрезмерным. Кроме того, неэффективность терапевтического действия спор в областях с нормальным содержанием кислорода приводила к рецидиву роста опухоли [33, 34]. Дальнейшие исследования были нацелены на использование нетоксигенных штаммов (видов) клостридий. Так, в 60–80-е годы XX в. в клинике противоопухолевого потенциала проводили оценку штамма M55 *C. sporogenes* [35, 36]. Больным с глиобластомой вводили внутривенно от 10^{10} спор, наблюдали частичный лизис опухоли при отсутствии серьезных осложнений от введения большой дозы спор, за исключением небольшой лихорадки. Однако избирательное размножение спор в опухоли подтвердить не удалось.

Недавние клинические испытания проводились также с непатогенными клостридиями, а именно *C. novyi*-NT [10]. В 2014 г., опираясь на положительные результаты доклинических исследований, проведенных на мышах и собаках [41, 42], N.J. Roberts и соавт. предприняли попытку лечения пациента с прогрессирующей

Таблица 2. Примеры клинических испытаний бактериальных средств терапии рака

Table 2. Examples of clinical trials of bacterial cancer therapies

Вид, штамм микроорганизма Bacteria type, strain	Контингент Contingent	Достигнутый результат Result	Ссылка на литературный источник Reference
<i>C. histolyticum</i>	Пациенты с солидными опухолями Patients with solid tumors	Избирательное накопление спор в опухоли, редукция опухоли Selective spores accumulation in a tumor, tumor reduction	[33, 34]
<i>C. sporogenes</i> (<i>C. oncolyticum</i>) M55	Пациенты с глиобластомой; внутривенное введение 10^{10} спор Patients with glioblastoma; 10^{10} spores administered intravenously	Частичный лизис опухоли, отсутствие побочного действия от системного введения большого количества спор Partial tumor lysis, no side effects from systemic administration of a large number of spores	[35, 36]
<i>C. novyi-NT</i>	1 пациент с прогрессирующей лейомиосаркомой 1 patient with progressive leiomyosarcoma	Уменьшение объема опухоли Tumor reduction	[10]
<i>S. typhimurium</i> VNP20009	24 пациента с метастазирующей меланомой; 24 patients with metastatic melanoma; 1 пациент с метастазами карциномы почки 1 patient with kidney carcinoma metastases	Индукция иммунного ответа, колонизация опухоли в 3 случаях, отсутствие противоопухолевого эффекта Immune response induction, tumor colonization in 3 patients, no antitumor effect	[37]
<i>S. typhimurium</i> TAPET-CD	3 пациента с прогрессирующими и метастазирующими солидными опухолями 3 patients with progressive and metastatic solid tumors	66 % колонизации опухолей, зарегистрированная активность цитозиндезаминазы в опухоли Tumor colonization by 66 %, registered cytosine desaminase activity in a tumor	[38]
<i>L. monocytogenes</i> ANZ-100 и CRS-207	26 пациентов с солидными опухолями (печень, поджелудочная железа, легкое, яичник) 26 patients with solid tumors (liver, pancreas, lung, ovary)	Активация противоопухолевого иммунитета безопасной вакциной Activated antitumor immunity using a safe vaccine	[39]
<i>L. monocytogenes</i> CRS-207	90 больных раком поджелудочной железы 90 patients with pancreatic cancer	Высокий уровень продления жизни High percent of life extension	[40]

лейомиосаркомой путем многократного прямого введения спор *C. novyi-NT* в опухоль и наблюдали заметную регрессию последней [10]. Полученные положительные результаты являются основанием для оптимизма при оценке перспектив клинического применения средств бактериальной терапии рака.

Клинические испытания аттенуированных штаммов *S. typhimurium* выявили индукцию иммунного ответа [37], колонизацию опухоли бактериями у 15–66 % пациентов при отсутствии значимого противоопухолевого эффекта [37, 38].

Аттенуированные штаммы *Listeria monocytogenes* ANZ-100 и CRS-207 изучали в составе живых рекомбинантных лечебных вакцин у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями, были отмечены активация противоопухолевого иммунитета и высокий уровень продления жизни при минимальной токсичности вакцины [39, 40].

Современные подходы к созданию терапевтических штаммов бактерий

Известно, что патогенные бактерии вырабатывают патогенассоциированные молекулярные структуры, которые распознаются соответствующими рецепторами иммунокомпетентных клеток, в результате чего происходит их активация и развивается иммунный ответ, в том числе противоопухолевый. С этим согласуется тот факт, что у мышей, дефектных по Toll-подобным рецепторам 4-го типа (TLR4) или MyD88-сигнальной системе, не проявляется какой-либо противоопухолевый эффект в ответ на введение сальмонелл [43, 44]. В связи с этим колонизация опухоли бактериями не может считаться облигатным механизмом действия, но, скорее всего, патоген-ассоциированные молекулярные структуры действуют как адьюванты в процессе активации иммунной системы на уровне индуцируемых лимфоидных органов.

В клинических испытаниях 2001 г. бактерии штамма *S. typhimurium* VNP20009 вводили пациентам с метастазирующей меланомой, однако у них не было зафиксировано противоопухолевого эффекта [37]. Данный штамм был получен способом неконтролируемой селекции, сопровождающейся накоплением многочисленных сопутствующих мутаций, которые могли повлиять на поведение бактерий в условиях *in vivo*. Действительно, штамм VNP20009 несет делеции в 120 генах и точковую мутацию в гене хемотаксиса *cheZ* [37, 45], которая исключает синтез жгутикового антигена — важного иммунитетстимулирующего фактора, что и приводит в конечном счете к снижению противоопухолевой эффективности штамма. В связи с этим следует признать, что нецелесообразно «выключать» те факторы вирулентности, которые безусловно важны для индукции иммунного ответа. С помощью генной инженерии микроорганизм должен быть аттенуирован частично (в оптимальной степени), как это делается в последние годы при создании вакцинных штаммов [26].

Один из приемов заключается в повышении адъювантного действия бактерий. Узнавание сальмонелл иммунной системой и индукция иммунного ответа прямо коррелируют с наличием в бактериальной клетке определенных патогенассоциированных молекулярных структур. Сальмонеллы могут выжить во враждебном окружении лишь при условии модификации указанных структур либо в случае снижения экспрессии определенных иммуногенов, например флагеллинов [46, 47]. Таким образом, стратегия конструирования рекомбинантного штамма должна заключаться в модификации иммуногенных мишеней при сохранении иммуногенности сальмонелл. В частности, было установлено, что гексаацилированная молекула липида А с высокой эффективностью стимулирует TLR4, в то время как тетраацилированный липид А действует как антагонист [48]. По этой причине мутант сальмонелл, экспрессирующий только гексаацилированный липид А, обладает повышенным терапевтическим эффектом [46]. Кроме того, было показано, что варианты сальмонелл, несущие одновременно флагеллиновые белки Fli C и Fli B, индуцируют усиление иммунного ответа хозяина при оральном введении [49]. Эти примеры показывают, что иммуногенность аттенуированных бактерий может быть усилена, если патоген-ассоциированные молекулярные структуры модифицируются таким образом, что рецепторы распознавания образов хозяина стимулируются с большей эффективностью.

Однако модификация некоторых патогенассоциированных молекулярных структур может вызывать плейотропные эффекты, приводящие к негативным последствиям для жизнедеятельности бактерий. Поэтому в конструировании бактериальных терапевти-

ческих штаммов был сделан следующий шаг — созданы бактерии с условно диким фенотипом. Предложены 2 концепции, развивающие эту идею, а именно: отсроченная аттенуация и отсроченный лизис бактерий [17, 26, 50, 51].

Соответствующие штаммы характеризуются модифицированным генотипом, но при этом проявляют условно дикий фенотип в условиях *in vivo*. Например, аттенуированные (ауксотрофные) бактерии могут экспрессировать комплементирующий ген под индуцируемым промотором типа P_{BAD} или P_{tet} . Активация промотора осуществляется в присутствии арабинозы или тетрациклина соответственно. Такие бактерии в присутствии индуктора могут размножаться в культуре, где и происходит экспрессия комплементирующего гена. В условиях *in vivo* концентрация индуктора резко снижается, вследствие чего бактерии постепенно утрачивают условно дикий фенотип и через несколько циклов деления становятся аттенуированными. Такая система отсроченной аттенуации недавно была применена для создания штамма сальмонелл с геном липополисахарида модифицированной структуры под контролем P_{BAD} . При введении в организм животного бактерии с условно диким фенотипом индуцировали выраженный иммунный ответ, значительно усиливающий противоопухолевый эффект по сравнению с бактериями, несущими только делецию. Ни одна из мышей не погибла от инфекции, а их состояние лишь кратковременно ухудшилось вскоре после введения [17].

Подобным образом в системе отсроченного лизиса синтез клеточной стенки прекращался в отсутствие арабинозы в условиях *in vivo* [51]. При этом бактерии были неспособны вызывать системную инфекцию.

Необходимо отметить, что имеется немало опухолей, полностью резистентных к бактериальной терапии, либо эффект достигается частичный и выражается лишь в задержке роста опухоли. В этом отношении более реалистичной и многообещающей стратегией представляется объединение химиотерапии с применением бактериальных средств [52].

Бактерии как средства доставки лекарственных препаратов в опухоль

Конструирование штаммов бактерий, предназначенных для адресной доставки лекарственных препаратов в опухоль, представляет собой следующее перспективное направление исследований. В настоящее время разрабатываются два методических подхода. Согласно первому создаются бактерии, которые продуцируют ферменты, конвертирующие предшественник (prodrug) — системно назначаемое неактивное вещество — в активную цитотоксическую форму. Этот способ терапии требует высокой колонизационной

активности бактерий по отношению к опухоли, чтобы обеспечить избирательное действие цитостатика.

Была изучена терапевтическая активность таких энзимов, как цитозиндезаминаза и нитроредуктаза, экспрессируемых в клостридиях или листериях [53, 54]. Однако при высокой активности этих ферментов в условиях *in vitro* они не проявили значимого терапевтического действия в условиях *in vivo*. В то же время штаммы сальмонелл оказались, по результатам доклинических и клинических исследований, эффективными средствами адресной доставки в опухоли таких ферментов, как цитозиндезаминаза или CPG2 [38, 55].

Второй методический подход предполагает использование бактерий, которые в процессе колонизации опухолей способны сами продуцировать и секретировать терапевтически активные субстанции, например бактериальные токсины (α -гемолизин [21, 56]), рекомбинантные эффекторные белки (mTNF- α , rIL-2 [57]), малые шпилечные молекулы РНК (shRNA [58, 59]).

Применительно к сальмонеллам разработка стратегии активной доставки проводится по двум перспективным направлениям. Одно из них — это вышеупомянутый отсроченный лизис. Его преимуществом является контролируемый «залповый выброс» лекарственных субстанций. Однако отсроченный лизис обеспечивает лишь однократное высвобождение ле-

карственного препарата и не позволяет осуществлять продолжительную экспрессию.

Другое направление основано на использовании бактериальных систем секреции. В этом случае осуществляют слияние гена лекарственной субстанции с сигнальной последовательностью, необходимой для доставки через ту или иную систему секреции, чтобы обеспечить непрерывное высвобождение лекарственной субстанции в опухоль [60]. Предпочтительнее должно быть отдано индуцируемым промоторам или промоторам, специфичным для опухолевой ткани [17, 61, 62].

Заключение

Таким образом, применение бактерий в качестве основы для создания средств терапии онкологических заболеваний обладает существенными достоинствами, так как обеспечивает возможность одновременно прямой доставки и регулируемой экспрессии синтеза терапевтических субстанций непосредственно в опухолевой ткани. Полученные к настоящему времени результаты доклинических исследований и первых попыток использования бактерий для лечения больных позволяют считать, что разработка бактериальных средств терапии рака является перспективным направлением экспериментальной онкологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- McCarthy E.F. The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006;26:154–8.
- Redelman-Sidi G., Glickman M.S., Bochner B.H. The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer — a current perspective. *Nat Rev Urol* 2014;11(3):153–62. DOI: 10.1038/nrurol.2014.15.
- Адамян Р.Т., Нерсисян А.К., Галстян А.М. Применение туляреминой живой вакцины в клинической онкологии. *Вопросы онкологии* 2004;50(1):68–74. [Adamyany R.T., Nersisyan A.K., Galstyan A.M. The use of tularemia live vaccine in clinical oncology practice. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology* 2004;50(1):68–74. (In Russ.)].
- Андреева З.М., Храмова Н.И., Ершова Е.Б., Бархударян В.А. Патент RU 2027755 от 27.01.1995. Штамм бактерий *Corynebacterium krestovnicova-troitskaya*, используемый для приготовления иммуностимулятора. [Andreeva Z.M., Khramova N.I., Ershova E.B., Barhudaryan V.A. Patent RU 2027755 dated January 27, 1995. The bacterial strain of *Corynebacterium krestovnicova-troitskaya* using to prepare of the immunity stimulating substance. (In Russ.)].
- Malmgren R.A., Flanagan C.C. Localization of vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administrations. *Cancer Res* 1955;15(7):473–8.
- Mose J.R., Mose G. Oncolysis by *Clostridia*. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic *Clostridia* against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Res* 1964;24(2):212–6.
- Mose J.R., Mose G. Onkolysversuche mit apathogenen, anaeroben *Sporenbildnern* am Ehrlich-Tumor der Maus. *Z Krebsforsch* 1959;63:63–74.
- Dang L.H., Bettegowda C., Huso D.L. et al. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(26):15155–60. DOI: 10.1073/pnas.251543698.
- Li Z., Fallon J., Mandely J. et al. A genetically enhanced anaerobic bacterium for oncopathic therapy of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(19):1389–400. DOI: 10.1093/jnci/djn308.
- Roberts N.J., Zhang L., Janku F. et al. Intratumoral injection of *Clostridium novyi-NT* spores induces antitumor responses. *Sci Transl Med* 2014;6(249):249ra111. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008982.
- Staedtke V., Bai R., Sun W. et al. *Clostridium novyi-NT* can cause regression of orthotopically implanted glioblastomas in rats. *Oncotarget* 2015;6(8):5536–46. DOI: 10.18632/oncotarget.3627.
- Zhang L., Tome Y., Suetsugu A. et al. Determination of the optimal route of administration of *Salmonella typhimurium* AI-R to target breast cancer in nude mice. *Anticancer Res* 2012;32(7):2501–8.
- Momiyama M., Zhao M., Kimura H. et al. Inhibition and eradication of human glioma with tumor-targeting *Salmonella typhimurium* in an orthotopic nude-mouse model. *Cell Cycle* 2012;11(3):628–32. DOI: 10.4161/cc.11.3.19116.

14. Miwa S., Yano S., Zhang Y. et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R prevents experimental human breast cancer bone metastasis in nude mice. *Oncotarget* 2014;5(16):7119–25. DOI: 10.18632/oncotarget.2226.
15. Hiroshima Y., Zhang Y., Murakami T. et al. Efficacy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R in combination with anti-angiogenesis therapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) and cell line mouse models. *Oncotarget* 2014;5(23):12346–57. DOI: 10.18632/oncotarget.2641.
16. Matsumoto Y., Miwa S., Zhang Y. et al. Intraperitoneal administration of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R inhibits disseminated human ovarian cancer and extends survival in nude mice. *Oncotarget* 2015;6(13):11369–77. DOI: 10.18632/oncotarget.3607.
17. Frahm M., Feigner S., Kocijancic D. et al. Efficiency of conditionally attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in bacterium-mediated tumor therapy. *MBio* 2015;6(2):254–15. DOI: 10.1128/mBio.00254–15.
18. Lizotte P.H., Baird J.R., Stevens C.A. et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. *Oncoimmunology* 2014;3:28926. DOI: 10.4161/onci.28926.
19. Keenan B.P., Saenger Y., Kafrouni M.I. et al. A *Listeria* vaccine and depletion of T-regulatory cells activate immunity against early stage pancreatic intraepithelial neoplasms and prolong survival of mice. *Gastroenterology* 2014;146(7):1784–94. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.02.055.
20. Yazawa K., Fujimori M., Nakamura T. et al. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2001;66(2):165–70. DOI: 10.1023/a:1010644217648.
21. St Jean A.T., Swofford C.A., Panteli J.T. et al. Bacterial delivery of *Staphylococcus aureus* α -hemolysin causes regression and necrosis in murine tumors. *Mol Ther* 2014;22(7):1266–74. DOI: 10.1038/mt.2014.36.
22. Kocijancic D., Felgner S., Frahm M. et al. Therapy of solid tumors using probiotic Symbioflor-2: restraints and potential. *Oncotarget* 2016;7(16):22605–22. DOI: 10.18632/oncotarget.8027.
23. Chen C.C., Lin W.C., Kong M.S. et al. Oral inoculation of probiotics *Lactobacillus acidophilus* NCFM suppresses tumour growth both in segmental orthotopic colon cancer and extra-intestinal tissue. *Br J Nutr* 2012;107(11):1623–34. DOI: 10.1017/S0007114511004934.
24. Heap J.T., Ehsaan M., Cooksley C.M. et al. Integration of DNA into bacterial chromosomes from plasmids without a counter-selection marker. *Nucleic Acids Res* 2012;40(8):59. DOI: 10.1093/nar/gkr1321.
25. Groot A.J., Mengesha A., van der Wall E. et al. Functional antibodies produced by oncolytic clostridia. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;364(4):985–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.10.126.
26. Wang S., Kong Q., Curtiss R. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb Pathog* 2013;58:17–28. DOI: 10.1016/j.micpath.2012.10.006.
27. Hoffman R.M., Zhao M. Methods for the development of tumor-targeting bacteria. *Expert Opin Drug Discov* 2014;9(7):741–50. DOI: 10.1517/17460441.2014.916270.
28. Hoffman R.M. Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs. *Curr Opin Biotechnol* 2011;22(6):917–23. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.03.009.
29. Zhao M., Suetsugu A., Ma H. et al. Efficacy against lung metastasis with a tumor-targeting mutant of *Salmonella typhimurium* in immunocompetent mice. *Cell Cycle* 2012;11(1):187–93. DOI: 10.4161/cc.11.1.18667.
30. Leschner S., Westphal K., Dietrich N. et al. Tumor invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is accompanied by strong hemorrhage promoted by TNF- α . *PLoS One* 2009;4(8):6692. DOI: 10.1371/journal.pone.0006692.
31. Crull K., Bumann D., Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;62(1):75–83. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2011.00790.x.
32. Stern C., Kasnitz N., Kocijancic D. et al. Induction of CD4(+) and CD8(+) anti-tumor effector T cell responses by bacteria mediated tumor therapy. *Int J Cancer* 2015;137(8):2019–28. DOI: 10.1002/ijc.29567.
33. Felgner S., Kocijancic D., Frahm M., Weiss S. Bacteria in cancer therapy: renaissance of an old concept. *Int J Microbiol* 2016;2016:8451728. DOI: 10.1155/2016/8451728.
34. Barbe S., Van Mellaert L., Anne J. The use of clostridial spores for cancer treatment. *J Appl Microbiol* 2006;101(3):571–8. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2006.02886.x.
35. Carey R.W., Holland J.F., Whang H.Y. et al. Clostridial oncolysis in man. *Eur J Cancer* 1967;3(1):37–46. DOI: 10.1016/0014-2964(67)90060-6.
36. Lemmon M.J., van Zijl P., Fox M.E. et al. Anaerobic bacteria as a gene delivery system that is controlled by the tumor microenvironment. *Gene Ther* 1997;4(8):791–6. DOI: 10.1038/sj.gt.3300468.
37. Toso J.F., Gill V.J., Hwu P. et al. Phase I study of the intravenous administration of attenuated *Salmonella typhimurium* to patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 2002;20(1):142–52. DOI: 10.1200/JCO.2002.20.1.142.
38. Nemunaitis J., Cunningham C., Senzer N. et al. Pilot trial of genetically modified, attenuated *Salmonella* expressing the *E. coli* cytosine deaminase gene in refractory cancer patients. *Cancer Gene Ther* 2003;10(10):737–44. DOI: 10.1038/sj.cgt.7700634.
39. Le D.T., Brockstedt D.G., Nir-Paz R. et al. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin Cancer Res* 2012;18(3):858–68. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2121.
40. Le D.T., Wang-Gillam A., Picozzi V. et al. Safety and survival with GVAX pancreas prime and *Listeria monocytogenes* – expressing mesothelin (CRS-207) boost vaccines for metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(12):1325–33. DOI: 10.1200/JCO.2014.57.4244.
41. Van Mellaert L., Barbe S., Anne J. *Clostridium* spores as anti-tumour agents. *Trends Microbiol* 2006;14(4): 190–6. DOI: 10.1016/j.tim.2006.02.002.
42. Krick E.L., Sorenmo K.U., Rankin S.C. et al. Evaluation of *Clostridium novyi-NT* spores in dogs with naturally occurring tumors. *Am J Vet Res* 2012;73(1):112–8. DOI: 10.2460/ajvr.73.1.112.
43. Lee C.H., Wu C.L., Shiau A.L. Toll-like receptor 4 mediates an antitumor host response induced by *Salmonella choleraesuis*. *Clin Cancer Res* 2008;14(6):1905–12. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2050.
44. Kaimala S., Mohamed Y.A., Nader N. et al. *Salmonella*-mediated tumor regression involves targeting of tumor myeloid suppressor cells causing a shift to M1-like phenotype and reduction in suppressive capacity. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63(6):587–99. DOI: 10.1007/s00262-014-1543-x.
45. Broadway K.M., Denson E.A., Jensen R.V., Scharf B.E. Rescuing chemotaxis of the anticancer agent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium VNP20009. *J Biotechnol* 2015;211:117–20. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.07.010.

46. Needham B.D., Carroll S.M., Giles D.K. et al. Modulating the innate immune response by combinatorial engineering of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110(4):1464–9. DOI: 10.1073/pnas.1218080110.
47. Stewart M.K., Cummings L.A., Johnson M.L. et al. Regulation of phenotypic heterogeneity permits *Salmonella* evasion of the host caspase-1 inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(51):20742–7. DOI: 10.1073/pnas.1108963108.
48. Saitoh S., Akashi S., Yamada T. et al. Lipid A antagonist, lipid IVa, is distinct from lipid A in interaction with Toll-like receptor 4 (TLR4)-MD-2 and ligand-induced TLR4 oligomerization. *Int Immunol* 2004;16(7):961–9. DOI: 10.1093/intimm/dxh097.
49. Eom J. S., Seok Kim J., Im Jang J. et al. Enhancement of host immune responses by oral vaccination to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* harboring both *FliC* and *FljB* flagella. *PLoS One* 2013;8(9):74850. DOI: 10.1371/journal.pone.0074850.
50. Curtiss R. 3rd, Wanda S.Y., Gunn B.M. et al. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains with regulated delayed attenuation in vivo. *Infect Immun* 2009;77(3):1071–82. DOI: 10.1128/IAI.00693-08.
51. Kong W., Wanda S.Y., Zhang X. et al. Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(27): 9361–6. DOI: 10.1073/pnas.0803801105.
52. Hiroshima Y., Zhang Y., Zhao M. et al. Tumor-targeting *Salmonella typhimurium* AI-R in combination with Trastuzumab eradicates HER-2-positive cervical cancer cells in patient-derived mouse models. *PLoS One* 2015;10(6):0120358. DOI: 10.1371/journal.pone.0120358.
53. Green L.K., Storey M.A., Williams E.M. et al. The flavin reductase *MsuE* is a novel nitroreductase that can efficiently activate two promising next-generation prodrugs for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Cancers* 2013;5(3):985–97. DOI: 10.3390/cancers5030985.
54. Kubiak A.M., Minton N.P. The potential of clostridial spores as therapeutic delivery vehicles in tumour therapy. *Res Microbiol* 2015;166(4):244–54. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.006.
55. Friedlos F., Lehouritis P., Ogilvie L. et al. Attenuated *Salmonella* targets prodrug activating enzyme carboxypeptidase G2 to mouse melanoma and human breast and colon carcinomas for effective suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 2008;14(13):4259–66. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4800.
56. Swofford C.A., St Jean A.T., Panteli J.T. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* α -hemolysin as a protein drug that is secreted by anticancer bacteria and rapidly kills cancer cells. *Biotechnol Bioeng* 2014;111(6):1233–45. DOI: 10.1002/bit.25184.
57. Barbe S., van Mellaert L., Theys J. et al. Secretory production of biologically active rat interleukin-2 by *Clostridium acetobutylicum* DSM792 as a tool for anti-tumor treatment. *FEMS Microbiol Lett* 2005;246(1):67–73. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.03.037.
58. Tian Y., Guo B., Jia H. et al. Targeted therapy via oral administration of attenuated *Salmonella* expression plasmid-vectored Stat3-shRNA cures orthotopically transplanted mouse HCC. *Cancer Gene Ther* 2012;19(6):393–401. DOI: 10.1038/cgt.2012.12.
59. Blache C.A., Manuel E.R., Kaltcheva T.I. et al. Systemic delivery of *Salmonella typhimurium* transformed with IDO shRNA enhances intratumoral vector colonization and suppresses tumor growth. *Cancer Res* 2012;72(24):6447–56. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0193.
60. Xu X., Hegazy W.A., Guo L. et al. Effective cancer vaccine platform based on attenuated *Salmonella* and a type III secretion system. *Cancer Res* 2014;74(21):6260–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1169.
61. Swofford C.A., van Dessel N., Forbes N.S. Quorum-sensing *Salmonella* selectively trigger protein expression within tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(11):3457–62. DOI: 10.1073/pnas.1414558112.
62. Leschner S., Deyneko I.V., Lienenklaus S. et al. Identification of tumor-specific *Salmonella Typhimurium* promoters and their regulatory logic. *Nucleic Acids Res* 2012;40(7):2984–94. DOI: 10.1093/nar/gkr1041.

Вклад авторов

И.В. Дармов: обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;

Я.А. Кибирев: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и редактирование рукописи;

И.В. Маракулин: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и редактирование рукописи;

С.Н. Янов: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и редактирование рукописи.

Authors' contributions

I.V. Darmov: reviewing of publications of the article's theme, data analysis and interpretation, article writing;

Ya.A. Kibirev: reviewing of publications of the article's theme, discussing, manuscript text editing;

I.V. Marakulin: reviewing of publications of the article's theme, discussing, manuscript text editing;

S.N. Yanov: reviewing of publications of the article's theme, discussing, manuscript text editing.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 15.03.2019. Принята в печать: 18.09.2019.

Article submitted: 15.03.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.

НЕКАНОНИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЫ КАК ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ФОРМИРОВАНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК К РЕТИНОИДНОЙ ТЕРАПИИ

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, Е.М. Чевкина

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

Контакты: Андрей Викторович Комельков komelkov@gmail.com

Ретиновая кислота (РК) является одним из наиболее функционально значимых внутриклеточных метаболитов витамина А, регулирующих важнейшие физиологические процессы, включая дифференцировку клеток, органов и тканей. РК успешно применяется в терапии острого промиелоцитарного лейкоза. Препараты на основе РК и других природных и синтетических ретиноидов активно разрабатываются для лечения и других онкопатологий, включая различные солидные опухоли. Однако применение РК в терапии злокачественных опухолей сильно ограничено быстрым приобретением клетками РК-резистентности. Механизмы формирования устойчивости к РК до сих пор малоизвестны, что объясняется, по-видимому, большим количеством генов, транскрипция которых прямо или опосредованно регулируется РК, в том числе генов, регулирующих активность и метаболизм самой РК. Ситуация дополнительно усложняется сравнительно недавно обнаруженной негеномной, или неканонической, активностью РК, которая заключается в нетранскрипционной регуляции ключевых протеинкиназ, задействованных в опухолевой прогрессии. Обзор посвящен анализу данных литературы о неканонической активности РК. В нем изложены современные представления об основных механизмах, реализующих каноническую геномную активность РК, представлены имеющиеся на сегодняшний день сведения об РК-зависимой нетранскрипционной регуляции протеинкиназ ERK1/2, PI3K/AKT, p38MAPK и PKC, рассмотрены возможные механизмы, реализующие данную активность РК, а также значение РК-зависимой активации внутриклеточных сигнальных путей в формировании РК-резистентности и изменении злокачественного потенциала малигнизированных клеток.

Ключевые слова: ретиновая кислота, неканоническая активность, ядерные рецепторы, протеинкиназа, РК-резистентность

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-43-50

NON-CANONICAL ACTIVITY OF RETINOIC ACID AS A POSSIBLE MECHANISM OF RETINOID RESISTANCE IN CANCER THERAPY

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov, M.E. Akselrod, E.M. Tchekina

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

Retinoic acid (RA) is one of the most functionally active intracellular metabolites of vitamin A, regulating the key physiological processes, including the differentiation of cells, organs and tissues. RA is successfully applied in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Drugs based on RA and other natural and synthetic retinoids are being actively developed for the treatment of other oncopathologies, including various solid tumors. However, the use of RA in the treatment of malignant tumors is restricted by the rapid acquisition of RA-resistance. The mechanisms of RA-resistance formation are still poorly understood, what could be explained apparently by the large number of genes directly or indirectly being regulated by RA at transcription level, including genes regulating the activity and metabolism of RA itself. The situation is further complicated by the relatively recently discovered non-genomic or non-canonical activity of RA, which consists in the non-transcriptional regulation of key protein kinases involved in tumor progression. The review is devoted to the analysis of published data on non-canonical activity of RA. The review provides a modern view on the main mechanisms implementing the canonical genomic activity of the RA, presents available information on the RA-dependent non-transcriptional regulation of ERK1/2, PI3K/AKT, p38MAPK and PKC protein kinases and possible mechanisms mediating this activity as well as potential significance of the RA-dependent activation of intracellular signaling pathways in the formation of RA-resistance and the malignant potential of transformed cells.

Key words: Retinoic acid, non-canonical activity, nuclear receptors, protein kinase, RA-resistance

Введение

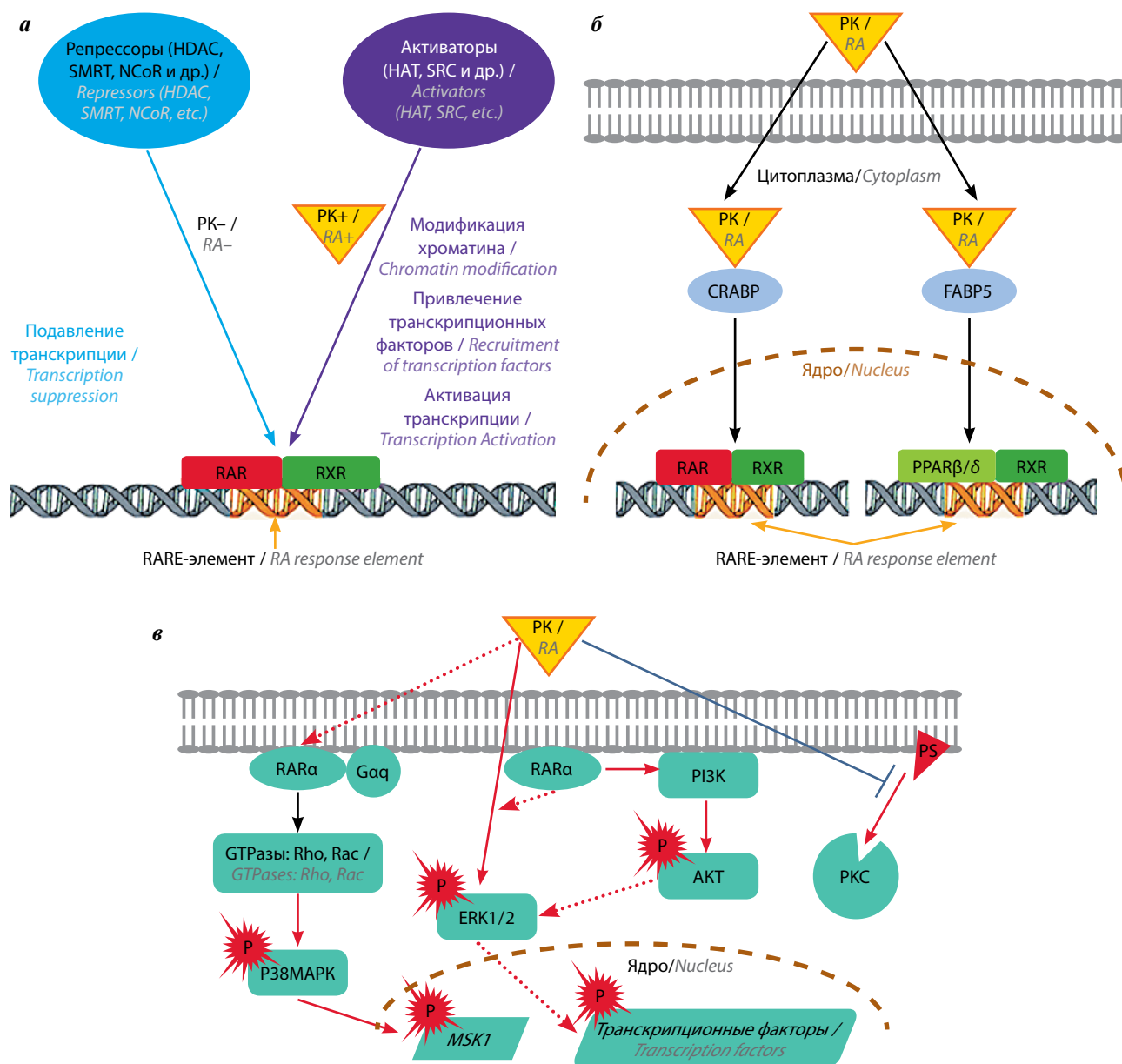
Ретиноевая кислота (РК) является первым открытым морфогеном и играет важнейшую роль в эмбриональном развитии, а также регулирует множество системных процессов в организме, включая ремоделирование тканей, различные этапы дифференцировки иммунных клеток и функционирования иммунной системы. Внутриклеточные функции РК также связаны со стимуляцией дифференцировки, проведением апоптотических сигналов и негативной регуляцией пролиферации. В клетке РК существует в виде нескольких изомеров, наиболее активными и представленными из которых являются полностью транс-РК (all-trans retinoic acid, ATRA), 9-цис-РК и 13-цис-РК. В клетке РК синтезируется из предшественников — ретинола (витамин А) и его эфиров, которые окисляются до ретинальдегида ферментами ретинолдегидрогеназами (алкогольдегидрогеназы ADH1, ADH2, ADH3 и ADH4), а затем до РК ферментами ретинальдегидрогеназами (RALDH1, RALDH2 и RALDH3). Удаление избытков РК в клетке осуществляется посредством ее катаболизма ферментами системы цитохромов, что приводит к образованию так называемых полярных метаболитов, которые являются физиологически менее активными соединениями. В связи с продифференцировочной активностью в контексте канцерогенеза РК играет преимущественно антионкогенную (опухоль-супрессорную) роль. Для многих типов опухолей показано, что РК стимулирует дифференцировку, активирует процесс апоптоза, снижает способность к неприкрепленному росту, подавляет пролиферационную активность и ангиогенез [1]. Все это способствует снижению выживаемости опухолевых клеток и роста опухоли. В связи с этим в экспериментальной онкологии рассматриваются различные подходы к лечению онкологических заболеваний на основе РК, ее природных или синтетических аналогов и других ретиноидов. В настоящее время предпринимаются попытки использования РК для терапии таких нозологических форм, как саркома Капоши, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак шейки матки, рак яичников, нейробластома, и других злокачественных опухолей. Наиболее успешно ATRA применяется в клинической практике для терапии острого промиелоцитарного лейкоза [2, 3]. Однако до сих пор использование РК в терапии злокачественных солидных опухолей сильно ограничено прежде всего за счет быстрого приобретения устойчивости малигнизированными клетками, а также вследствие большого количества побочных эффектов [4].

Транскрипционная активность ретиноевой кислоты и молекулярные механизмы ее реализации

Ядерные рецепторы РК. Основным и наиболее известным механизмом, посредством которого РК

оказывает свое действие на клетки, является регуляция транскрипции. Считается, что РК регулирует активность более 500 генов (ретиноид-респонсивные гены). Функциональная активность РК реализуется посредством взаимодействия и активации ее ядерных рецепторов (см. рисунок, часть а). Эти белки относятся к семейству рецепторов стероидных и тиреоидных гормонов и представляют собой лиганд-индуцируемые транскрипционные факторы. Взаимодействие с лигандом приводит к активации ядерных рецепторов и стимуляции транскрипции генов, в промоторе которых имеются определенные последовательности — ретиноид-респонсивные элементы (retinoic acid response element, RARE). Основными типами рецепторов, связывающих РК, являются белки RAR (retinoic acid receptor), RXR (retinoid X receptor), а также PPAR (peroxisomal proliferator-activated receptor). Наиболее эффективным рецептором РК считается RAR α (наибольшая аффинность связывания с РК), с рецепторами RAR связывается транс-РК, а также 9-цис-РК, лигандом RXR является 9-цис-РК, которая является биологически менее активной формой РК. Среди рецепторов PPAR, по-видимому, только изоформа PPAR β/δ способна специфически связывать РК. Среди рецепторов RXR белок RXR α играет, вероятно, основную роль в передаче сигнала от РК. Экспрессия рецепторов РК регулируется самими рецепторами (создавая петли обратной связи), а также другими рецепторами того же семейства, такими как ER α [5]. Рецепторы RAR, как и PPAR β/δ , функционируют в виде гетеродимера с белками RXR. Гетеродимер RAR-RXR взаимодействует с последовательностью RARE в промоторе ретиноид-респонсивных генов. На сегодняшний день считается, что в отсутствие лиганда-агониста гетеродимер RXR-RAR связан с корепрессорами SMRT или NCoR, а также с другими факторами, подавляющими транскрипцию, такими как ДНК-метилтрансферазы или деацетилазы гистонов. Связывание с РК приводит к изменению конформации в лиганд-связывающем домене гетеродимера, что, в свою очередь, приводит к высвобождению из комплекса корепрессоров и связыванию коактиваторов транскрипции, таких как белки SRC-1, -2 и -3, а также гистоновых ацетилтрансфераз (НАТ) или гистоновых аргининметилтрансфераз. Это приводит к модификации гистонов, привлечению РНК-полимеразы II и активации транскрипции [1].

Мишени транскрипционной активности РК. Таргетные гены, активируемые РК, включают регуляторы транспорта и метаболизма ретиноидов, в том числе самой РК, например гены, кодирующие белки, связывающие ретинол (CRBP1/2), белки, связывающие РК (CRABP1/2), белки катаболизма РК (CYP26A1) и др. Среди мишеней РК много представителей генов,



Внутриклеточная активность ретиноевой кислоты: а – транскрипционная (каноническая) активность PK; б – участие белков, связывающих PK, в ее доставке к ядерным рецепторам; в – нетранскрипционная (неканоническая) активность PK. Красным цветом отмечены PK-зависимые пути активации протеинкиназ ERK1/2, AKT и p38MAPK. Пунктиром отмечены гипотетические механизмы. Звездочкой отмечено фосфорилирование, PS – фосфатидилсерин

Intracellular activity of retinoic acid: а – transcriptional (canonical) activity of RA; б – participation of RA-binding proteins in RA delivery to the nuclear receptors; в – non-transcriptional (noncanonical) activity of RA. The RA-dependent pathways of ERK1/2, AKT and p38MAPK protein kinases activation are indicated in red. Dotted lines indicate hypothetical mechanisms. Stars indicate phosphorylation, PS – phosphatidylserine

кодирующих гормоны (например, гормон роста), ферменты, вовлеченные в синтез различных стероидных гормонов (например, EDH17B2), мембранных рецепторов, эритропоэтин, рецептор интерлейкина-2 α, различные сигнальные белки и белки, регулирующие состав внеклеточного матрикса (тканевой активатор плазминогена, гены ламинина В1, β3-интегрин и др.). Также PK, по-видимому, контролирует экспрессию ряда белков, регулирующих важнейшие опухоли-

ассоциированные сигнальные пути, например NF-κB, интерферон γ, трансформирующий ростовой фактор β, фактор роста эндотелия сосудов, белки, обладающие опухоль-супрессорной активностью, такие как p53 и AP-2 [3, 6–9]. К мишеням PK-RAR относятся Btg2, p53-зависимый ген В-клеточной транслокации, гены каспазы-7 (PK-респонсивный ген) и каспазы-9 (опосредованная регуляция), а также гены активирующих их сериновых протеаз [10, 11]. Также показано

РК-зависимое уменьшение экспрессии некоторых генов, связанное со снижением пролиферации, например, Birc5 (сурвивин) и Bcl-2 [12]. К другим генам, регулируемым РК с помощью активации RAR, относятся TNF-зависимый белок TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, или Apo-2L), C/EBPepsilon (CCAAT/enhancer binding protein), UBE1L (ubiquitin-activating enzyme E1-like protein) и др. [13–15]. Есть данные об РК-зависимом усилении экспрессии фактора транскрипции SOX9 и опухолевого супрессора PDCD4 [16, 17]. Экспрессия рецептора RAR β также регулируется РК-RAR α . Считается, что этот белок обладает опухоль-супрессорной функцией в эпителиальных клетках [18]. В частности, показано, что экзогенная экспрессия RAR β приводит к РК-зависимому и РК-независимому апоптозу и задержке прохождения клеточного цикла [19]. Известно также, что экспрессия RAR β утрачивается или эпигенетически подавляется (метилирование промотора, компактизация хроматина) на ранних стадиях прогрессии в клетках некоторых типов солидных опухолей [20].

Доставка РК к ядерным рецепторам. Внутриклеточный транспорт гидрофобной молекулы РК и ее доставку к различным типам рецепторов осуществляют белки, принадлежащие к большому семейству внутриклеточных липидсвязывающих белков (iLBP, intracellular Lipid Binding Proteins). К этому семейству относят белки, связывающие РК, CRABP1 и CRABP2 (Cellular Retinoic Acid Binding Proteins 1 и 2), а также белки из группы FABPs (fatty acid binding proteins), которые связывают различные жирные кислоты и их производные. Среди белков FABP связывать РК способен преимущественно FABP5 и со значительно меньшей аффинностью – FABP4. Белки iLBP фактически представляют собой ядерно-цитоплазматические «шаттлы». В отсутствие лигандов они локализованы в цитоплазме, взаимодействие с лигандами вызывает конформационные изменения, приводящие либо к открытию первичной последовательности сигнала ядерной локализации, либо к формированию третичной пространственной структуры, «узнаваемой» как сигнал ядерной локализации (в случае белков CRABP) [21, 22]. В любом случае это создает возможность взаимодействия с α -импортинами, и белки iLBP перемещаются в ядро, где связываются с соответствующим рецептором и «передают» РК (см. рисунок, часть б). Соответственно, взаимодействие РК с белками iLBP не только предохраняет ее от гидрофильной среды, но и опосредует ее внутриклеточные функции, доставляя РК соответствующим рецепторам и стимулируя их транскрипционную активность. Три белка суперсемейства iLBPs: CRABP2, FABP5 и FABP4 избирательно взаимодействуют с ядерными рецепторами RAR α , PPAR β/δ и PPAR γ соответствен-

но и селективно проводят сигнал от РК к регулируемым ими генам. Несмотря на то, что FABP5 помимо РК может связывать и другие лиганды, только взаимодействие с РК приводит к его ядерной транслокации и дальнейшему связыванию с рецептором PPAR β/δ [23].

Неканоническая (нетранскрипционная) активность ретиноевой кислоты

Так называемая негеномная (non-genomic), или неканоническая, активность РК обнаружена не так давно и заключается в нетранскрипционной активации регуляторных белков и сигнальных путей, включая важнейшие протеинкиназы, известные своим участием в канцерогенезе и опухолевой прогрессии. Эта активность характеризуется быстрым эффектом (коротким временем экспозиции с РК от 5 до 60 мин), сохраняется при ингибировании транскрипции и/или транскрипционной активности рецепторов РК и осуществляется в цитоплазме или на плазматической мембране (ПМ). Так, в ряде работ показана кратковременная РК-зависимая стимуляция протеинкиназ АКТ и ERK1/2, не связанная с транскрипционной активностью ядерных рецепторов RAR. Такой эффект показан для клеток A549 немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) в двух работах одной группы авторов [24]. В двух работах другого авторского коллектива сходный феномен показан для клеток нейробластомы SH-SY-5Y [25, 26]. Наконец, в двух работах третьей группы исследователей эффект РК в отношении нетранскрипционной активации данных киназ продемонстрирован на модели эмбриональных стволовых клеток (ESC) и клеток карциномы яичника мыши (mouse ovarian cancer, MOVCAR), причем на этих моделях впервые показано участие белка CRABP1 в этом процессе [27, 28].

Данные указывают на то, что действие РК может быть реализовано по принципу, аналогичному действию стероидных гормонов, у которых есть ядерные рецепторы и активность которых может реализовываться по 2 основным механизмам, оказывая долгосрочный эффект, возникающий после нескольких часов (в среднем после 6 ч) и опосредуемый транскрипционной активностью рецепторов, а также кратковременное воздействие, не связанное с транскрипционной активацией.

Однако сходство описанного эффекта РК в указанных работах заключается лишь в демонстрации общего феномена неканонической активности в отношении активации клеточного сигналинга. В остальном данные перечисленных работ очень противоречивы как в отношении функционального значения для клетки (дифференцировка и апоптоз или, наоборот, стимуляция пролиферации и выживания), так и в отношении молекулярных механизмов,

опосредующих эту активацию (включая механизмы с участием RAR в непосредственной активации PI3K/АКТ или механизмы, независимые от RAR).

S.D. Persaud и соавт. выявили участие белка CRABP1 и даже показали, что CRABP1 необходим для RAR-независимой (происходящей в цитоплазме) активации ERK1/2 PK в эмбриональных стволовых клетках (ESC) [27]. Авторы обнаружили 2 типа стимуляции ERK1/2 под воздействием ATRA — краткосрочную (при воздействии ATRA на клетки менее 1 ч) и долгосрочную (более 8 ч). CRABP1 не влияет на долгосрочную активацию, но необходим для реализации кратковременной активации ERK1/2. Интересно, что эта активация не связана ни с ядерными рецепторами PK (что было доказано в экспериментах с подавлением их активности), ни с классическим способом передачи сигнала через мембранные рецепторы. Обнаруженная CRABP1-зависимая краткосрочная активация ERK1/2 приводила к накоплению в ядре белка p27, задержке клеточного цикла в G1-фазе и снижению пролиферации.

В более поздней работе с использованием той же экспериментальной модели этой же группой авторов был показан еще один механизм, с помощью которого PK и синтетические ретиноиды осуществляют CRABP1-зависимую нетранскрипционную активацию ERK1/2 и стимуляцию апоптоза. В частности, ERK1/2 способствует активации фосфатазы PP2A, которая стимулирует дефосфорилирование p27, что в итоге приводит к апоптозу или задержке клеток в G1-фазе клеточного цикла. Авторы делают вывод, что в отсутствие CRABP1 PK-зависимой активации ERK1/2 не происходит, как это было показано на клетках карциномы яичников мыши [27]. В этом отношении важно отметить, что, по нашим данным, в клетках НМРЛ при отсутствии эндогенной экспрессии данного белка эффект PK-зависимой краткосрочной активации как ERK1/2, так и АКТ имеет место и хорошо выражен (линии H460 и A549) [29]. Этот же эффект для клеток A549 показан и другими авторами [30].

Еще одним белком, активацию которого связывают с нетранскрипционной активностью PK, является MAP-киназа p38. PK-зависимая активация p38 показана двумя группами авторов на клетках рака молочной железы MCF7, рака шейки матки HeLa, эмбриональных фибробластах мыши MEF и F9 тератокарциномы мыши. В работах одной группы было показано, что PK по до сих пор малоизвестному механизму активирует фосфорилирование p38, что обеспечивает работу коактиваторов RAR, участвующих в ремоделировании и деконденсации хроматина [31]. Согласно позднее предложенному авторами сценарию нетранскрипционная PK-зависимая активация p38 является необходимым условием работы самих белков RAR и реализации канонической активности

PK. Активированная киназа p38 фосфорилирует киназу MSK1, которая, в свою очередь, фосфорилирует RAR α по остатку серина S369, расположенному в лиганд-связывающем домене, что позволяет осуществлять связывание белкового комплекса TFIИH (Transcription Factor II H) и последующее фосфорилирование остатка серина S77 в N-терминальном домене RAR α (2-е активирующее фосфорилирование, осуществляемое входящей в комплекс циклинзависимой киназой cdk7/cyclin H). Кроме того, MSK1 фосфорилирует гистон H3 по сайту S10. В итоге каскад фосфорилирований, инициированный p38-MSK1, обеспечивает транслокацию суперкомплекса RAR α /TFIИH к RARE-элементам промоторов целевых генов и активирует их транскрипцию. Таким образом, например, происходит регуляция экспрессии гена *CYP26A1*. Важно, что опухолевые клетки, в которых происходит дерегулирование p38MAPK/MSK1-пути, не отвечают на стимуляцию PK. Соответственно, PK-резистентные клетки рака молочной железы SKBR3, в отличие от чувствительных клеток MCF7, характеризовались отсутствием PK-зависимой активации p38MAPK/MSK1-каскада и усиления экспрессии *CYP26A1* в ответ на PK [32].

По данным авторов, таким же образом может происходить и активация экспрессии RAR β , обладающего опухоль-супрессорными функциями, эпигенетическое подавление которого связывают с PK-резистентностью. Согласно данным другой работы этих же авторов описанные события происходят на ПМ. PK стимулирует пул молекул RAR α , локализованных в липидных рафтах, к образованию комплекса с заякоренным там белком G α q (G protein alpha), что является необходимым условием активации p38 в ответ на PK. При этом PK-резистентные клетки рака молочной железы (BT474, SKBR3, MDA-MB453 и MDA-MB361) характеризовались отсутствием или снижением активации p38MAPK, а присутствующий на мембранных рафтах RAR α не связывался с белком G α q. Эти данные указывают на то, что активация p38 может быть важнейшим фактором, определяющим чувствительность клеток к PK и обеспечивающим ее каноническую активность [33].

В то же время данные других авторов, которые также обнаружили эффект PK-зависимой активации p38 на клетках MCF7 (и линии острого промиелоцитарного лейкоза), с одной стороны, подтверждают его отсутствие в PK-резистентных клетках, что указывает на необходимость активации p38 для проведения канонической активности PK и поддержания PK-чувствительности. С другой стороны, авторы показали, что PK-зависимая активация p38 приводит к негативной регуляции дифференцировки (снижает классический эффект PK). Более того, подавление PK-зависимой активации p38 не только не усиливало

экспрессию ретиноид-респонсивных генов, но и приводило к усилению дифференцировки и РК-зависимого подавления пролиферации [34]. По данным авторов, эффект РК в отношении активации p38 реализовывался посредством RAR-зависимой стимуляции малой ГТФазы Ras и сопровождался активностью MAPKAPK-2 киназы.

Интересно, что в цитируемой ранее работе по РК-зависимой нетранскрипционной активации киназы АКТ в клетках НМРЛ A549 авторы предполагают другой механизм с участием RAR α и Ras. Согласно этим данным белок RAR α изначально не присутствует на ПМ, но транслоцируется туда в ответ на стимуляцию РК, где активирует АКТ с последующей активацией Ras [24]. При этом, как и в предыдущей цитируемой работе по активации p38, активация АКТ приводит к обратному эффекту — блокирует классическую транскрипционную активность РК, усиливает выживание и инвазивность клеток и стимулирует РК-резистентность клеток НМРЛ. Авторы предлагают механизм возникновения РК-резистентности клеток НМРЛ в результате неканонической активности РК, приводящей к нетранскрипционной активации АКТ. Согласно данной модели ATRA связывает RAR α , стимулируя его транслокацию к ПМ, мембранный RAR α рекрутирует и активирует PI3K-АКТ-сигнальный комплекс, что приводит, с одной стороны, к активации малой ГТФазы Ras и Ras-зависимой стимуляции выживания и инвазивной активности, с другой — к репрессии транскрипции ядерного RAR α и подавлению экспрессии RAR α -зависимых мишеней РК, обладающих опухоль-супрессорной активностью, таких как RAR β 2 и p53. К сходному результату (стимуляция роста, выживания и подвижности клеток) приводила и обнаруженная той же группой авторов РК-зависимая активация ERK1/2, опосредуемая нетранскрипционной активностью RAR α [30].

В клетках нейробластомы, одной из двух нозологий, для которых был показан эффект РК-зависимой нетранскрипционной активации АКТ, согласно данным одних авторов, активация PI3K/АКТ-пути также способствовала выживанию клеток и снижению их дифференцировки [25]. По данным авторов другого исследования на тех же клетках нейробластомы,

РК-зависимая нетранскрипционная активация PI3K/АКТ и ERK1/2 стимулировала дифференцировку [26].

Еще одним механизмом, посредством которого осуществляется негеномная активность РК, является, по-видимому, негативная регуляция РК α , серин-треониновой киназы, участвующей в регуляции важнейших клеточных функций, включая рост, дифференцировку, апоптоз и старение, а также активно задействованной в опухолевой прогрессии. В нескольких работах показано, что ATRA способна непосредственно и с высокой аффинностью связывать данную протеинкиназу [35]. Это взаимодействие приводит к подавлению активности РК α *in vitro*, предположительно за счет конкуренции за связывание с фосфатидилсеринем, одним из основных активаторов данной киназы. Такой эффект РК и других ретиноидов может вносить свой вклад в реализацию опухоли-супрессорной активности РК, включая подавление пролиферации и стимуляцию дифференцировки [36]. На рисунке (часть в) схематично представлены основные мишени нетранскрипционной активности РК и пути их активации/подавления.

Заключение

Как видно из представленных данных (а это практически вся имеющаяся информация по этому вопросу), ситуация с РК-зависимой нетранскрипционной активацией важнейших регуляторных сигнальных путей очень малопонятна и противоречива как в отношении молекулярных механизмов, так и в отношении эффекта на свойства злокачественных клеток и на формирование РК-резистентности. Возможно, это объясняется очень ограниченным числом экспериментальных моделей и отсутствием (за редким исключением) сравнения РК-чувствительных и РК-резистентных клеток в отношении неканонической активности РК. Кроме того, представляется важным исследовать, насколько эффект неканонической активности РК в отношении различных киназ присутствует одновременно в одних и тех же клетках. Очевидно, что нетранскрипционная активация важнейших сигнальных путей может играть важную роль в реализации активности РК, а также в регуляции чувствительности/резистентности клеток к РК как терапевтическому агенту, что требует дальнейшего подробного изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Di Masi A., Leboffe L., de Marinis E. et al. Retinoic acid receptors: from molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med* 2015;41:1–115. DOI: 10.1016/j.mam.2014.12.003.
2. Chen M.-C., Hsu S.-L., Lin H., Yang T.-Y. Retinoic acid and cancer treatment. *Biomedicine (Taipei)* 2014;4(4):22–2. DOI: 10.7603/s40681-014-0022-1.
3. Connolly R.M., Nguyen N.K., Sukumar S. Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1651–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
4. Chlapek P., Slavikova V., Mazanek P. et al. Why differentiation therapy sometimes fails: molecular mechanisms of resistance to retinoids. *Int J Mol Sci* 2018;19(1):132. DOI: 10.3390/ijms19010132.

5. Ross-Innes C.S., Stark R., Holmes K.A. et al. Cooperative interaction between retinoic acid receptor- α and estrogen receptor in breast cancer. *Genes Dev* 2010;24(2):171–82. DOI: 10.1101/gad.552910.
6. Al Tanoury Z., Piskunov A., Rochette-Egly C. Vitamin A and retinoid signaling: genomic and nongenomic effects. *J Lipid Res* 2013;54(7):1761–75. DOI: 10.1194/jlr.R030833.
7. Mrass P., Rendl M., Mildner M. et al. Retinoic acid increases the expression of p53 and proapoptotic caspases and sensitizes keratinocytes to apoptosis. *Cancer Res* 2004;64(18):6542–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1129.
8. Zhang H., Rosdahl I. Expression profiles of p53, p21, bax and bcl-2 proteins in all-trans-retinoic acid treated primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol* 2004;25(2):303–8.
9. Luscher B., Mitchell P.J., Williams T., Tjian R. Regulation of transcription factor AP-2 by the morphogen retinoic acid and by second messengers. *Genes Dev* 1989;3(10):1507–17. DOI: 10.1101/gad.3.10.1507.
10. Donato L.J., Suh J.H., Noy N. Suppression of mammary carcinoma cell growth by retinoic acid: the cell cycle control gene Btg2 is a direct target for retinoic acid receptor signaling. *Cancer Res* 2007;67(2):609–15. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-0989.
11. Donato L.J., Noy N. Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signaling. *Cancer Res* 2005;65(18):8193–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1177.
12. Raffo P., Emionite L., Colucci L. et al. Retinoid receptors: pathways of proliferation inhibition and apoptosis induction in breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 2000;20(3a):1535–43.
13. Altucci L., Rossin A., Raffelsberger W. et al. Retinoic acid-induced apoptosis in leukemia cells is mediated by paracrine action of tumor-selective death ligand TRAIL. *Nat Med* 2001;7(6):680–6. DOI: 10.1038/89050.
14. Kitareewan S., Pitha-Rowe I., Sekula D. et al. UBE1L is a retinoid target that triggers PML/RAR α degradation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(6):3806–11. DOI: 10.1073/pnas.052011299.
15. Park D.J., Chumakov A.M., Vuong P.T. et al. CCAAT/enhancer binding protein epsilon is a potential retinoid target gene in acute promyelocytic leukemia treatment. *J Clin Invest* 1999;103(10):1399–408. DOI: 10.1172/JCI2887.
16. Afonja O., Juste D., Das S. et al. Induction of PDCD4 tumor suppressor gene expression by RAR agonists, antiestrogen and HER-2/neu antagonist in breast cancer cells. Evidence for a role in apoptosis. *Oncogene* 2004;23(49):8135–45. DOI: 10.1038/sj.onc.1207983.
17. Afonja O., Raaka B.M., Huang A. et al. RAR agonists stimulate SOX9 gene expression in breast cancer cell lines: evidence for a role in retinoid-mediated growth inhibition. *Oncogene* 2002;21(51):7850–60. DOI: 10.1038/sj.onc.1205985.
18. De Thè H., Vivanco-Ruiz M.M., Tiollais P. et al. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 1990;343(6254):177–80. DOI: 10.1038/343177a0.
19. Liu Y., Lee M.O., Wang H.G. et al. Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 1996;16(3):1138–49. DOI: 10.1128/MCB.16.3.1138.
20. Sirchia S.M., Ren M., Pili R. et al. Endogenous reactivation of the RARbeta2 tumor suppressor gene epigenetically silenced in breast cancer. *Cancer Res* 2002;62(9):2455–61.
21. Tchekina E.M. Retinoic Acid Binding Proteins and Cancer: Similarity or Polarity? *Cancer Therapy & Oncology Int J* 2017;8(2):555733. DOI: 10.19080/ctoij.2017.08.555733.
22. Чевкина Е.М., Фаворская И.А. Белки CRABP – родственники или однофамильцы? *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):6–16. [Tchekina E.M., Favorskaya I.A. CRABP proteins – relatives or homonyms? *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2015;2(2):6–16. (In Russ.)].
23. Noy N. Non-classical transcriptional activity of retinoic acid. *Subcell Biochem* 2016;81:179–99. DOI: 10.1007/978-94-024-0945-1_7.
24. Garcia-Regalado A., Vargas M., Garcia-Carranca A. et al. Activation of Akt pathway by transcription-independent mechanisms of retinoic acid promotes survival and invasion in lung cancer cells. *Mol Cancer* 2013;12:44. DOI: 10.1186/1476-4598-12-44.
25. López-Carballo G., Moreno L., Masiá S. et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/akt signaling pathway by retinoic acid is required for neural differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2002;277(28):25297–304. DOI: 10.1074/jbc.m201869200.
26. Masiá S., Alvarez S., de Lera A.R., Baretino D. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol* 2007;21(10):2391–402. DOI: 10.1210/me.2007-0062.
27. Persaud S.D., Lin Y.-W., Wu C.-Y. et al. Cellular retinoic acid binding protein I mediates rapid non-canonical activation of ERK1/2 by all-trans retinoic acid. *Cell Signal* 2013;25(1):19–25. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.09.002.
28. Persaud S.D., Park S.W., Ishigami-Yuasa M. et al. Erratum: Corrigendum: All trans-retinoic acid analogs promote cancer cell apoptosis through non-genomic Crabp1 mediating ERK1/2 phosphorylation. *Sci Rep* 2016; 6(1):27678. DOI: 10.1038/srep27678.
29. Еникеев А.Д., Комельков А.В., Зборовская И.Б. и др. Неканоническая активность ретиноевой кислоты в отношении активации протеинкиназ в трансформированных клетках различного происхождения. *Успехи молекулярной онкологии* 2018; 5(4):127–30. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-127-130. [Enikeev A.D., Komelkov A.V., Zborovskaya I.B. et al. Non-canonical activity of retinoic acid in relation to the activation of protein kinases in transformed cells of different origin. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):127–30. (In Russ.)].
30. Quintero Barceinas R.S., Garcia-Regalado A., Aréchaga-Ocampo E. et al. All-Trans Retinoic Acid Induces Proliferation, Survival, and Migration in A549 Lung Cancer Cells by Activating the ERK Signaling Pathway through a Transcription-Independent Mechanism. *Biomed Res Int* 2015;2015:404368. DOI: 10.1155/2015/404368.
31. Gianni M., Parrella E., Raska I. et al. P38MAPK-dependent phosphorylation and degradation of SRC-3/AIB1 and RAR α -mediated transcription. *EMBO J* 2006;25(4):739–51. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600981.
32. Bruck N., Vitoux D., Ferry C. et al. A coordinated phosphorylation cascade initiated by MSK1 directs RAR α recruitment to target gene promoters. *Nature Precedings* 2008. DOI: 10.1038/npre.2008.2107.1.
33. Piskunov A., Rochette-Egly C. A retinoic acid receptor RAR α pool present in membrane lipid rafts forms complexes with G protein α Q to activate p38MAPK.

- Oncogene 2011;31(28):3333–45.
DOI: 10.1038/onc.2011.499.
34. Alsayed Y., Uddin S., Mahmud N. et al. Activation of Rac1 and the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in response to all-trans-retinoic acid. J Biol Chem 2000;276(6):4012–9.
DOI: 10.1074/jbc.m007431200.
35. Ochoa W.F., Torrecillas A., Fita I. et al. Retinoic Acid Binds to the C2-Domain of Protein Kinase Ca^{+} . Biochemistry 2003;42(29):8774–9.
DOI: 10.1021/bi034713g.
36. Radomska-Pandya A., Chen G., Czernik P.J. et al. Direct interaction of all-trans-retinoic acid with protein kinase C (PKC). J Biol Chem 2000;275(29):22324–30.
DOI: 10.1074/jbc.m907722199.

Вклад авторов

А.Д. Еникеев, А.В. Комельков: написание текста статьи;
А.Д. Еникеев, М.Е. Аксельрод: подбор и анализ публикаций по теме статьи;
А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод: оформление статьи;
Е.М. Чевкина: разработка плана, дизайна статьи, анализ рукописи.

Authors' contributions

A.D. Enikeev, A.V. Komelkov: article writing;
A.D. Enikeev, M.E. Akselrod: reviewing of publications of the article's theme;
A.V. Komelkov, M.E. Akselrod: submitting articles;
E.M. Tchekina: developing the research design, article analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Д. Еникеев/A.D. Enikeev: <https://orcid.org/0000-0002-7628-8616>
А.В. Комельков/A.V. Komelkov: <https://orcid.org/0000-0003-0766-163X>
М.Е. Аксельрод/M.E. Akselrod: <https://orcid.org/0000-0003-2778-7870>
Е.М. Чевкина/E.M. Tchekina: <https://orcid.org/0000-0001-8837-7969>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Российского Фонда фундаментальных исследований, проект № 19-015-00027 А.

Financing. The study was performed with the support of Russian Foundation for Basic Research, project No 19-015-00027 A.

Статья поступила: 07.08.2019. Принята в печать: 28.10.2019.

Article submitted: 07.08.2019. Accepted for publication: 28.10.2019.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ микроРНК В КАЧЕСТВЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И ПРОГНОСТИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ МЕЛАНОМЫ

С.В. Чулкова^{1,2}, Д.А. Рябчиков¹, И.А. Дудина³, А.М. Казаков¹, А.В. Егорова², К.С. Титов⁴,
М.Н. Хагажеева¹, И.А. Гладилина^{1,2}, З.М. Галаева², Н.В. Лепкова², Н.Н. Тупицын¹

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

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

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи
и медицинских технологий ФМБА России»; Россия, 115682 Москва, Ореховый бульвар, 28;

⁴ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова Департамента
здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Несмотря на недавние достижения таргетной и иммунной терапии, 5-летняя общая выживаемость при постановке диагноза меланомы на III–IV стадии составляет 50 и 10–20 % соответственно. Современные биомаркеры меланомы, которые используются в клинической практике, не обладают достаточной эффективностью при ранней диагностике и оценке прогноза. В последнее десятилетие циркулирующие микроРНК (миРНК) все чаще стали рассматриваться в качестве идеальных биомаркеров меланомы. В данной статье представлены особенности биогенеза миРНК, а также приведен критический обзор циркулирующих миРНК как перспективных диагностических и прогностических биомаркеров меланомы.

Ключевые слова: микроРНК, меланома, циркулирующие биомаркеры, канцерогенез

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-51-56

THE PROSPECTS FOR THE USE OF microRNA AS DIAGNOSTIC AND PROGNOSTIC MELANOMA BIOMARKERS

S.V. Chulkova^{1,2}, D.A. Ryabchikov¹, I.A. Dudina³, A.M. Kazakov¹, A.V. Egorova², K.S. Titov⁴, M.N. Khagazheeva¹,
I.A. Gladilina^{1,2}, Z.M. Galaeva², N.V. Lepkova², N.N. Tupitsyn¹

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

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

³FSBI FNKC FMBA of Russia; 28 Bul'var Orekhoviy, Moscow 115682, Russia;

⁴MCSC the Loginov Moscow Clinical Scientific Center Is State Institution Funded By Moscow Health Department;
86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia

Despite recent advances in targeted and immune therapy, 5-year overall survival in stages III–IV of melanoma is 50 and 10–20 %, respectively. Modern melanoma biomarkers, which are used in clinical practice, are not sufficiently effective for early diagnosis and prognosis assessment. In the last decade, circulating microRNAs (miRNAs) have come to be regarded as “ideal” melanoma biomarkers. This article presents the characteristics of miRNA biogenesis, as well as provides a critical review of circulating miRNAs as promising diagnostic and prognostic melanoma biomarkers.

Key words: microRNA, melanoma, circulating biomarkers, carcinogenesis

Введение

За последние 20 лет понимание молекулярных основ развития и прогрессирования меланомы выросло в геометрической прогрессии. Меланома — клинически разнообразное и молекулярно гетерогенное заболевание, имеющее большое количество перспек-

тивных диагностических и прогностических биомаркеров различных классов, а также потенциальных мишеней для воздействия лекарственных агентов [1].

Несмотря на недавние достижения таргетной и иммунной терапии, 5-летняя общая выживаемость при постановке диагноза меланомы на III–IV стадии

составляет лишь 50 и 10–20 % соответственно [2]. Современные биомаркеры меланомы, которые используются в клинической практике для диагностики и оценки эффективности лечения, не обладают достаточной эффективностью. Например, высокий уровень лактатдегидрогеназы в сыворотке крови пациентов с меланомой указывает на текущее (не на прогнозируемое) прогрессирование заболевания а концентрация кальций-связывающего белка S100B резко увеличена лишь на III–IV стадии [3–5]. Это создает острую необходимость поиска новых циркулирующих биомаркеров, которые бы позволили выявлять меланому на ранних стадиях, прогнозировать риски прогрессирования заболевания и определять оптимальный вариант лечения.

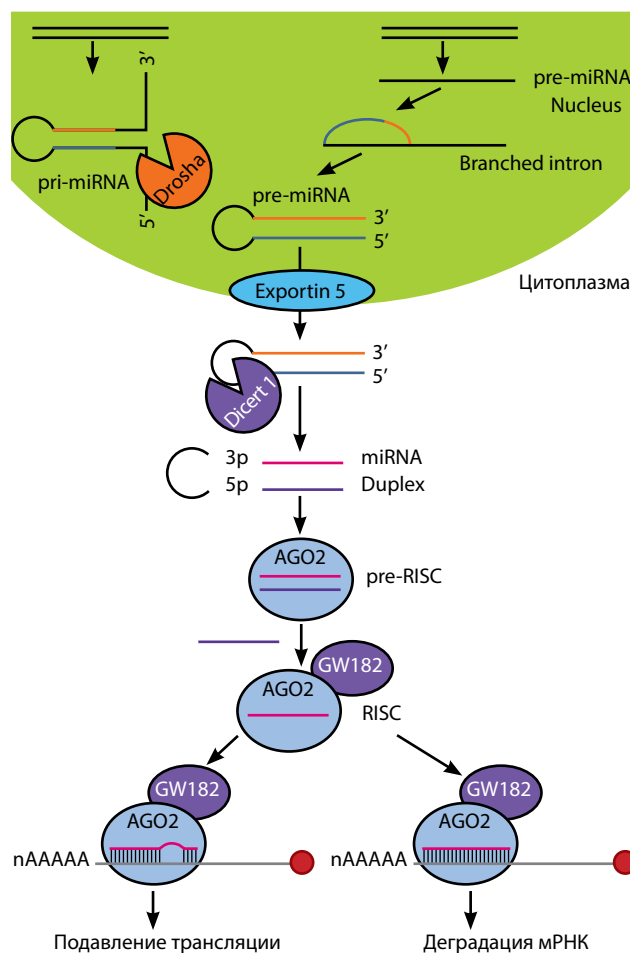
В последнее десятилетие особое внимание сосредоточено на небольших некодирующих последовательностях РНК—микроРНК (миРНК), которые влияют на экспрессию большого числа генов и являются важными регуляторами многих клеточных процессов: пролиферации, дифференцировки, регенерации, миграции, апоптоза. По данным мировой литературы, миРНК имеют стабильный уровень в сыворотке крови, устойчивы к разрушению РНКазой и другими ферментами, обладают высокой специфичностью и чувствительностью, поэтому претендуют на роль идеальных биомаркеров [1]. В данной статье представлены особенности биогенеза миРНК, а также приведен критический обзор циркулирующих миРНК как перспективных диагностических и прогностических биомаркеров меланомы.

Биогенез, функции и внеклеточный транспорт микроРНК

МиРНК представляет собой группу небольших (19–25 нуклеотидов) белок-некодирующих последовательностей РНК, которые регулируют экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. С момента открытия Y. Lee и соавт. 1-й миРНК в 1993 г. у нематоды *Caenorhabditis elegans* число новых молекул увеличивается ежегодно в десятки и сотни раз [6]. Согласно базе данных miRBase, 38 589 зрелых миРНК зарегистрировано у 271 вида. Известно, что в геноме человека кодируется 2661 миРНК, которые регулируют работу около 30 % генов [1].

Основные функции миРНК – связывание с определенной последовательностью мРНК и нарушение процесса трансляции, что приводит к изменению или предотвращению синтеза белка [7]. Развитие технологий секвенирования позволило определить, что посттранскрипционный контроль экспрессии генов осуществляется при участии белков Argonaute (AGO). МиРНК являются наиболее хорошо охарактеризованными AGO-ассоциированными посттранскрипционными регуляторами, которые следуют по специфическому пути биогенеза с участием ферментов комплекса Drosha/DGCR8 и Dicer [8, 9].

Рассмотрим более подробно биогенез миРНК, представленный на рисунке. Молекулы-предшественники миРНК (pri-miRNAs) транскрибируются в ядре с их родственных генов. Как только миРНК транскрибируется, она подвергается дальнейшему процессингу, чтобы стать зрелой миРНК [10]. Итак, pri-miRNAs расщепляются ферментами Drosha и DGCR8 с образованием 60–70 нуклеотидных предшественников миРНК (pre-miRNAs) [10, 11]. Далее pre-miRNAs транспортируются в цитоплазму с помощью Exportin-5 при участии регулятора нуклеоплазматического транспорта – Ran-GTP. В цитоплазме pre-miRNA расщепляются ферментом Dicer, в результате чего образуется небольшой миРНК-дуплекс [12–14]. Одна из цепей дуплекса является направляющей и далее из нее будет образована зрелая миРНК. Направляющая цепь миРНК взаимодействует с белком AGO2, который является каталитическим компонентом RNA-induced silencing complex (RISC). Впоследствии другая комплементарная цепь исключается из комплекса [15].



Биогенез миРНК (адаптировано из [1])
miRNA biogenesis (adapted from [1])

Зрелая миРНК направляет RISC к специфическим мишеням на мРНК. Следует отметить, что только зрелая миРНК способна обеспечить распознавание в мРНК последовательности, которая была бы комплементарна ключевой последовательности (seed sequence) миРНК [10]. Посадка RISC-комплекса на мРНК-мишень происходит по правилу спаренных оснований Уотсона–Крика, инициируя подавление экспрессии генов либо через механизм подавления трансляции, либо путем деградации мРНК. Было доказано, что степень комплементарности последовательностей между миРНК и мишенью на мРНК определяет механизм подавления: достаточная (почти идеальная) комплементарность приводит к деградации мРНК, а недостаточная (несовершенная) приведет к подавлению трансляции [16]. Из-за неабсолютного соответствия последовательности между миРНК и мишенью 1 миРНК может подавлять большое количество прямых генов-мишеней, а 1 мРНК может регулироваться несколькими миРНК [17].

Почему же циркулирующие миРНК рассматриваются в качестве идеальных биомаркеров? МиРНК, как и многие другие опухолевые биомаркеры, также появляются в кровотоке после апоптоза или некроза опухолевых клеток, но данный путь не является основным. В кровотоке миРНК обычно инкапсулированы и циркулируют в комплексе с липидными частицами, образуя экзосомы. Также молекулы миРНК в системном кровотоке часто связаны с различными защитными белками — AGO2 или нуклеофозином. Именно поэтому циркулирующие миРНК стабильны, не разрушаются в кровотоке и имеют период полураспада до 24 ч [18].

В кровотоке миРНК присутствуют в чрезвычайно низких концентрациях, но достаточных для обнаружения с использованием стандартной методики количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени [1]. Можно выделить несколько причин, приводящих к количественным и качественным различиям в экспрессии специфических миРНК у пациентов с меланомой по сравнению с контрольной группой. Во-первых, это связано с увеличением экспрессии миРНК, обычно онкогенных, опухолевыми клетками и/или, напротив, с уменьшением экспрессии миРНК (как правило, онкосупрессорных). Во-вторых, не только опухолевые клетки высвобождают миРНК. Такое свойство также установлено у Т-лимфоцитов и других представителей опухолевого микроокружения, поэтому выделение миРНК в кровотоки происходит постоянно, не прерывисто [19]. Выдвинута гипотеза, что такое сложное взаимодействие миРНК с различными клетками может являться формой межклеточной коммуникации, хотя механизмы, посредством которых определенные миРНК секретируются и поглощаются, остаются неизвестными.

Циркулирующие микроРНК как диагностические маркеры меланомы

Недавние исследования сообщают о значительном изменении профиля экспрессии миРНК в сыворотке и плазме крови пациентов с меланомой по сравнению с контрольной группой. Исследовательская группа под руководством P. Leidinger в 2010 г. была одной из первых, которая оценила экспрессию более 900 миРНК у 24 пациентов с меланомой по сравнению с 20 здоровыми людьми [20]. Используя методику микрочипирования и последующей количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, авторы идентифицировали 21 миРНК, уровень которых при меланоме снижен, и 30 миРНК, уровень которых повышен. Авторы указали, что использование диагностической сигнатуры из 16 миРНК (let-7d, miРНК-186, -18a, -145, -99a, -664, -501-5p, -378, -9c, -1280, -365, -1249, -328, -422a, -30d и -17) позволяет с 95 % специфичности и 98,9 % чувствительности выявить пациентов с меланомой. Необходимо отметить, что треть пациентов имели IV стадию заболевания, и данная сигнатура не может быть использована при ранней диагностике, но данное исследование продемонстрировало перспективность изучения миРНК как будущих диагностических биомаркеров. Существует большое количество аналогичных исследований, сравнивающих экспрессию миРНК у пациентов с меланомой I–IV стадии и здоровой контрольной группой [21–23]. Авторами было выделено большое количество молекул миРНК, экспрессия которых имела статистически значимую разницу между группами, но эти данные представляют больше научный интерес и не могут быть использованы в повседневной клинической практике.

Сравнение профиля циркулирующих миРНК при I–II, III–IV стадии меланомы и здоровой группой — следующий этап изучения диагностических миРНК. С. Margue и соавт., исследовав 1066 молекул миРНК ($n = 126$) с использованием количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени, определили, что экспрессия миРНК-204-5p, -182-5p, -301a-3p, -200c-3p, -28-5p, -27a-3p, -197-3p и -374a-5p понижена у пациентов с меланомой I–IV стадии по сравнению с контрольной группой, а экспрессия миРНК-193b-3p, -720, -205-5p, -126-5p, -211-5p, -720, -206, -550a-3p, -627-5p и -629-5p, напротив, повышена [22]. Вместе с тем они определили, что миРНК-301-3p, -200c-3p, -126-5p, -374a-5p и -211-5p являются потенциальными биомаркерами меланомы I–II стадии, а остальные миРНК могут быть использованы только для диагностики меланомы III–IV стадии. В других исследованиях были установлены особенности экспрессии миРНК-200c-3p, -29c-5p, -324-3p у пациентов с меланомой III–IV стадии по сравнению со здоровой контрольной группой [23–25]. При III–IV стадии меланомы 5-летняя общая выживаемость составляет 10–50 %, выбор лечебных методик ограничен,

поэтому перспективен поиск миРНК как диагностических маркеров I–II стадии. К сожалению, на сегодняшний день не выделены специфичные молекулы миРНК, которые могут быть эффективно использованы для ранней диагностики меланомы.

Особый интерес представляют работы по сравнению профиля экспрессии миРНК меланомы и доброкачественных невусов. В 2010 г. в исследовании I. Satzger и соавт. были идентифицированы 3 миРНК (миРНК-15b, -210 и -34a), которые могут быть использованы при дифференциальной диагностике меланомы и меланоцитарного невуса [26]. Уровень миРНК-15b и -210 был повышен при меланомах по сравнению с доброкачественными невусами, в то время как уровень миРНК-34a понижен. Кроме того, в 2012 г. Y. Xu и соавт. определили, что миРНК-203, -205 значительно активированы при злокачественной меланоме по сравнению с доброкачественными невусами [27]. Далее, в 2013 г. J. Kozubek и соавт. пришли к выводу, что уровень экспрессии миРНК-203, -204-5p, -205-5p, -211-5p, -23b-3p, -26a-5p и -26b-5p значительно снижен при меланоме по сравнению с доброкачественными невусами ($n = 101$) [28]. Эта тема заслуживает дальнейшего изучения, так как клиническая и гистологическая дифференциальная диагностика меланомы и диспластического невуса часто осложнена, а появление дополнительной опции неинвазивной диагностики позволило бы уточнить результат.

В настоящее время только в одном исследовании изучен экзосомально-ассоциированный пул миРНК у пациентов с меланомой. E. Alegre и соавт. продемонстрировали, что уровень миРНК-125b был значительно снижен в сывороточных экзосомах пациентов с прогрессирующей меланомой по сравнению с больными меланомой без прогрессирования и здоровыми людьми [29]. Однако не было обнаружено различий при сравнении уровней сывороточной миРНК в данных группах. Важно, что в другом исследовании под руководством S. Achberger показано, что уровни миРНК-125b в плазме повышены у пациентов с уvealной меланомой по сравнению со здоровой контрольной группой, причем уровень миРНК-125b при метастазировании выше, чем при ранних стадиях [30]. Необходимо отметить, что плазма и сыворотка имеют разные профили экспрессии миРНК, что, возможно, связано с различной чувствительностью к условиям экстракции во время приготовления сыворотки/плазмы или обогащения экзосом.

Циркулирующие микроРНК как прогностические маркеры меланомы

На сегодняшний день для идентификации циркулирующих миРНК как прогностических биомаркеров меланомы было предпринято уже несколько попыток разными группами ученых. Обнаружение таких

биомаркеров позволило бы разделить пациентов на группы высокого и низкого риска рецидива после хирургического лечения меланомы. N.H. Fleming и соавт. в 2015 г. продемонстрировали, что уровни миРНК-150, -15b, -425 и -30d в сыворотке крови повышаются с увеличением стадии меланомы [31]. Оказалось, что сигнатура из этих 4 миРНК совместно с оценкой стадии позволяет эффективно выявлять рецидивы меланомы и стратифицировать с высокой чувствительностью пациентов на группы высокого и низкого риска рецидивов (RFS $p < 0,001$, общая выживаемость $p = 0,005$). Авторами достоверно установлено, что уровень миРНК-15b в сыворотке значительно увеличен после случившегося рецидива по сравнению с дорецидивными показателями ($p < 0,001$).

Группа ученых под руководством E.B. Friedman в 2012 г. при исследовании более 300 миРНК идентифицировали сигнатуру из 5 молекул (миРНК-150-5p, -15b-5p, -199a-5p, -33a-5p и -425-5p), которые могут быть использованы для стратификации пациентов на группы высокого и низкого риска со значительной разницей безрецидивной выживаемости как в когорте обнаружения ($n = 80$), так и валидации ($n = 50$) ($p = 0,0036$, $p = 0,0093$ соответственно) [32]. Как и в исследовании N.H. Fleming и соавт., уровень миРНК-150-5p был повышен в сыворотке пациентов с меланомой высокого риска рецидива, а уровень сывороточной миРНК-15b-5p, напротив, был понижен в данной группе пациентов [31].

Оценка уровней миРНК в сыворотке крови пациентов с целью прогноза и мониторинга процесса метастазирования является заманчивой идеей, так как на IV стадии 5-летняя общая выживаемость составляет $< 15\%$ из-за высокой устойчивости опухоли к химиолучевой терапии [33, 34]. D. Hanniford и соавт. в 2015 г. продемонстрировали снижение экспрессии миРНК-382 и -516b, которые подавляли инвазию *in vivo* и метастазирование *in vitro*, в агрессивных первичных меланомах по сравнению с неагрессивными (95 % доверительный интервал – 25,6–50,2; миРНК-382: 19,5, 95 % доверительный интервал – 12,2–26,9, $p = 0,009$; миРНК-516b: 12,5, 95 % доверительный интервал – 7,7–17,4, $p < 0,001$, t-критерий Стьюдента) [35]. В исследовании G. Saldanha и соавт. 2016 г. определена прогностическая роль миРНК-10b: экспрессия миРНК-10b была в 3,7 раза выше у пациентов с метастатическим заболеванием по сравнению с контрольной группой ($p = 0,005$) [36]. M. Qi и соавт. в 2014 г. обнаружили, что миРНК-146, -27, -877 и -186 дифференциально экспрессированы при метастатических меланомах (контрольная группа – неметастатическая меланома кожи) ($p < 0,05$) [37].

V. Armand-Labit и соавт. в 2016 г. представили многообещающий прогностический показатель, обнаружив, что миРНК-1246 и -185 достоверно ассоциированы с метастатической меланомой

с чувствительностью 90,5 % и специфичностью 89,1 % [38]. L. Cui и соавт. обнаружили, что miРНК-301a активируется при метастатической меланоме, что коррелирует с плохим прогнозом [39]. И наоборот, подавление экспрессии опухолевого супрессора меланомы miРНК-365 в исследовании под руководством J. Vai и соавт. коррелировало с метастазированием в лимфатические узлы и клинической стадией заболевания [40].

Заключение

Заболеваемость меланомой с каждым годом растет во всем мире и, несмотря на разработку новых методов лечения, резистентность к терапии также

увеличивается. В данной статье мы описали сложность биогенеза miРНК при меланоме, доказали, что данные молекулы играют решающую роль в канцерогенезе. Уже сделаны первые шаги в изучении miРНК как перспективных диагностических и прогностических биомаркеров, но данные неполные и часто противоречивые. Важно повторить эти исследования после разработки серии стандартизированных эталонных процедур для количественного определения циркулирующих miРНК, чтобы обеспечить воспроизводимость полученных результатов. Только тогда некоторые из описанных miРНК могут быть использованы в клинической практике при ранней диагностике, оценке прогноза и эффективности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mumford S.L., Towler B.P., Pashler A.L. et al. Circulating MicroRNA biomarkers in melanoma: tools and challenges in personalised medicine. *Biomolecules* 2018;8(2):21. DOI: 10.3390/biom8020021.
- Cancer Research UK Melanoma Survival (accessed on 13 January 2018). Available on: <http://www.cancer-researchuk.org/about-cancer/melanoma/survival>.
- Finck S.J., Giuliano A.E., Morton D.L. LDH and melanoma. *Cancer* 1983;51(5):840–3. DOI: 10.1002/1097-0142(19830301)51:5<840::AID-CNCR28205-10516>3.0.CO;2-7.
- Deichmann M., Benner A., Bock M. et al. S100- β , melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 1999;17(6):1891–6. DOI: 10.1200/JCO.1999.17.6.1891.
- Karonidis A., Mantzourani M., Gogas H., Tsoutsos D. Serum S100- β levels correlate with stage, N status, mitotic rate and disease outcome in melanoma patients independent to LDH. *J Buon* 2017;22(5):1296–302.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75(5):843–54. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Carmell M.A., Xuan Z., Zhang M.Q., Hannon G.J. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev* 2002;16(21):2733–42. DOI: 10.1101/gad.1026102.
- Okamura K., Phillips M.D., Tyler D.M. et al. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15(4):354–63. DOI: 10.1038/nsmb.1409.
- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
- Рябчиков Д.А., Абдуллаева Э.И., Дудина И.А. и др. Роль микро-РНК в канцерогенезе и прогнозе злокачественных новообразований молочной железы. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России* 2018;18(2):1–20. Доступно по: <http://vestnik.mrcrr.ru/vestnik/v18/docs/ryabchikov.pdf>. [Ryabchikov D.A., Abdullaeva E.I., Dudina I.A. et al. The role of micro-RNA in cancerogenesis and breast cancer prognosis. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo tsentra rentgenoradiologii Minzdrava Rossii* = *J of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center* 2018; 18(2):[1–20]. DOI: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- Lee Y., Ahn C., Han J. et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003;425(6956):415–9. DOI: 10.1038/nature01957.
- Iwasaki S., Kobayashi M., Yoda M. et al. Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol Cell* 2010;39(2):292–9. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.05.015.
- Kawamata T., Tomari Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci* 2010;35(7):368–76. DOI: 10.1016/j.tibs.2010.03.009.
- Kwak P.B., Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19(2):145–51. DOI: 10.1038/nsmb.2232.
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003;115(2):209–16. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00801-8.
- Macfarlane L.A., Murphy P.R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* 2010;11(7):537–61. DOI: 10.2174/138920210793175895.
- Selbach M., Schwanhauser B., Thierfelder N. et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455:58–63. DOI: 10.1038/nature07228.
- Sohel M.H. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achiev Life Sci* 2016;10:175–86. DOI: 10.1016/j.als.2016.11.007.
- Romano G., Kwong L.N. miRNAs, melanoma and microenvironment: an intricate network. *Int J Mol Sci* 2017;18(11):2354. DOI: 10.3390/ijms18112354.
- Leidinger P., Keller A., Borries A. et al. High-throughput miRNA profiling of human melanoma blood samples. *BMC Cancer* 2010;10:262. DOI: 10.1186/1471-2407-10-262.
- Van Laar R., Lincoln M., van Laar B. Development and validation of a plasma-based melanoma biomarker suitable for clinical use. *Br J Cancer* 2018;118:857–66. DOI: 10.1038/bjc.2017.477.
- Margue C., Reinsbach S., Philippidou D. et al. Comparison of a healthy miRNome with melanoma patient miRNomes: are microRNAs suitable

- serum biomarkers for cancer? *Oncotarget* 2015;6:12110–27. DOI: 10.18632/oncotarget.3661.
23. Fogli S., Polini B., Carpi S. et al. Identification of plasma microRNAs as new potential biomarkers with high diagnostic power in human cutaneous melanoma. *Tumour Biol* 2017;39(5):1010428317701646. DOI: 10.1177/1010428317701646.
 24. Philippidou D., Schmitt M., Moser D. et al. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma. *Cancer Res* 2010;70(10):4163–73. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4512.
 25. Greenberg E., Besser M.J., Ben-Ami E. et al. A comparative analysis of total serum miRNA profiles identifies novel signature that is highly indicative of metastatic melanoma: a pilot study. *Biomarkers* 2013;18:502–8. DOI: 10.3109/1354750X.2013.816777.
 26. Satzger I., Mattern A., Kuettler U. et al. MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. *Int J Cancer* 2010;126(11):2553–62. DOI: 10.1002/ijc.24960.
 27. Xu Y., Brenn T., Brown E.R. et al. Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br J Cancer* 2012;106(3):553–61. DOI: 10.1038/bjc.2011.568.
 28. Kozubek J., Ma Z., Fleming E. et al. In-depth characterization of microRNA transcriptome in melanoma. *PLoS One* 2013;8(9):72699. DOI: 10.1371/journal.pone.0072699.
 29. Alegre E., Sanmamed M.F., Rodriguez C. et al. Study of circulating microRNA-125b levels in serum exosomes in advanced melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138(6):828–32. DOI: 10.5858/arpa.2013-0134-OA.
 30. Achberger S., Aldrich W., Tubbs R. et al. Circulating immune cell and microRNA in patients with uveal melanoma developing metastatic disease. *Mol Immunol* 2014;58:182–6. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.018.
 31. Fleming N.H., Zhong J., da Silva I.P. et al. Serum-based miRNAs in the prediction and detection of recurrence in melanoma patients. *Cancer* 2015;121(1):51–9. DOI: 10.1002/cncr.28981.
 32. Friedman E.B., Shang S., de Miera E.V. et al. Serum microRNAs as biomarkers for recurrence in melanoma. *J Transl Med* 2012;10:155. DOI: 10.1186/1479-5876-10-155.
 33. Stark M.S., Bonazzi V.F., Boyle G.M. et al. miR-514a regulates the tumour suppressor NF1 and modulates BRAFi sensitivity in melanoma. *Oncotarget* 2015;6(19):17753–63.
 34. Garbe C., Eigentler T.K. Diagnosis and treatment of cutaneous melanoma: State of the art 2006. *Melanoma Res* 2007;17:117–27. DOI: 10.1097/CMR.0b013e328042bb36.
 35. Hanniford D., Segura M.F., Zhong J. et al. Identification of metastasis-suppressive microRNAs in primary melanoma. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2015;107(3):494. DOI: 10.1093/jnci/dju494.
 36. Saldanha G., Elshaw S., Sachs P. et al. microRNA-10b is a prognostic biomarker for melanoma. *Mod Pathol* 2016;29(2):112–21. DOI: 10.1038/modpathol.2015.149.
 37. Qi M., Huang X., Zhou L., Zhang J. Identification of differentially expressed microRNAs in metastatic melanoma using next-generation sequencing technology. *Int J Mol Med* 2014;33(5):1117–21. DOI: 10.3892/ijmm.2014.1668.
 38. Armand-Labit V., Meyer N., Casanova A. et al. Identification of a circulating microRNA profile as a biomarker of metastatic cutaneous melanoma 2016; *Acta Derm Venereol* 96(1):29–34.
 39. Cui L., Li Y., Lv X. et al. Expression of microRNA-301a and its functional roles in malignant melanoma. *Cell Physiol Biochem* 2016;40(1–2):230–44. DOI: 10.1159/000452540.
 40. Bai J., Zhang Z., Li X., Liu H. MicroRNA-365 inhibits growth, invasion and metastasis of malignant melanoma by targeting NRP1 expression. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(5):4913–22.

Вклад авторов

С.В. Чулкова, Д.А. Рябчиков, И.А. Дудина: написание текста рукописи;
 М.Н. Хагажева, А.М. Казаков, А.В. Егорова, И.А. Гладиллина, З.М. Галаева: обзор публикаций по теме статьи;
 Н.В. Лепкова, К.С. Титов: разработка дизайна исследования;
 Н.Н. Тупицын: анализ рукописи.

Authors' contributions

S.V. Chulkova, D.A. Ryabchikov, I.A. Dudina: article writing;
 M.N. Khagazheeva, A.M. Kazakov, A.V. Egorova, I.A. Gladilina, Z.M. Galaeva: reviewing of publications of the article's theme;
 N.V. Lepkova, K.S. Titov: developing the research design;
 N.N. Tupitsyn: manuscript analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

С.В. Чулкова/S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
 Д.А. Рябчиков/D.A. Ryabchikov: <https://orcid.org/0000-0003-2670-236>
 К.С. Титов/K.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>
 Н.Н. Тупицын/N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 20.05.2019. Принята в печать: 18.09.2019.

Article submitted: 20.05.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ИММУНОТЕРАПИИ РЕТИНОБЛАСТОМЫ

Т.Л. Ушакова^{1,2}, И.С. Долгополов¹, З.А. Соколова¹, Г.З. Чкадуа¹, Н.С. Титов³, Ю.М. Букреев¹,
Ю.А. Серов¹, О.В. Горовцова¹, Д.А. Булетов¹, Н.А. Козлов¹, В.Г. Поляков^{1,2,3}

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

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 123242 Москва, ул. Баррикадная 2;

³ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова 1

Контакты: Татьяна Леонидовна Ушакова ushtat07@mail.ru

Введение. Внутриглазные опухоли, плохо поддающиеся химиотерапевтическому воздействию, являются основной причиной удаления глаза при попытках органосохраняющего лечения.

Цель исследования — поиск новых эффективных и безопасных органосохраняющих методов лечения интраокулярной рефрактерной и рецидивной ретинобластомы (РБ).

Материалы и методы. В исследование были включены самки кроликов породы шиншилла. В правый глаз каждому животному интравитреально была имплантирована клеточная линия WERI-Rb-1 (РБ человека). Левый глаз оставался интактным. После получения устойчивого интраокулярного роста РБ и его пролонгации в пораженный и в контрольный глаз К1 интравитреально были введены человеческие цитотоксические лимфоциты (ЦТЛ) в концентрации 1×10^6 в 0,1 мл суспензии, а К2 — 5×10^6 в 0,1 мл соответственно.

Результаты. Гистологическое исследование удаленных правых глаз животных подтвердило наличие узлового разрастания злокачественной мелкокруглоклеточной опухоли на границе сосудистой и сетчатой оболочек (эпицентр в сосудистой оболочке) на задней стенке глаза. Отмечена скудная лимфоидная инфильтрация без признаков лечебного патоморфоза. В левых удаленных глазах животных отмечена сохранность гистологических структур глазного яблока без дистрофических изменений клеток сетчатой и сосудистой оболочек. В области лимба — единичный микроочаг лимфогистиоцитарного инфильтрата (без элементов опухоли). В сосудистой оболочке — единичные рассеянные лимфоциты.

Заключение. Непродолжительный период наблюдения за ростом опухоли не позволил сделать выводы об эффективности человеческих ЦТЛ, но используемые в эксперименте концентрации ЦТЛ не привели к дистрофическим изменениям клеток сетчатки и сосудистой оболочки глаза, что является важным фактором в преодолении токсичности предлагаемой адоптивной иммунотерапии. На следующем этапе мы детально изучим цитотоксическое воздействие на здоровые структуры глаза и эффективность человеческих ЦТЛ на большем количестве пораженных опухолью глаз кроликов, применяя различные концентрации и кратность введения.

Ключевые слова: ретинобластома, экспериментальное органосохраняющее лечение, адоптивная интравитреальная иммунотерапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-57-64

EXPERIMENTAL IMMUNOTHERAPY MODEL OF RETINOBLASTOMA

T.L. Ushakova^{1,2}, I.S. Dolgoplov¹, Z.A. Sokolova¹, G.Z. Chkadua¹, N.S. Titov³, Yu.M. Bukreev¹, Yu.A. Serov¹,
O.V. Gorovtsova¹, D.A. Buletov¹, N.A. Kozlov¹, V.G. Polyakov^{1,2,3}

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

²Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia;
2 Barricadnaya St., Moscow 123242, Russia;

³Pirogov Medical University of the Ministry of Health of Russia, 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia

Introduction. The main reason for enucleation of the eye when attempting organ-preserving treatment are intraocular tumors that do not respond well to chemotherapy.

Purpose. The aim of the study was to find new effective and safe organ-preserving methods of treatment of intraocular refractory and recurrent retinoblastoma (RB).

Materials and methods. The study included female chinchilla rabbits. The cell line of human RB was intravitreally inserted into the right eye of each animal. The left eye was a control. After obtaining a stable intraocular growth of RB and prolongation of the growth of RB, human cytotoxic lymphocytes (CTL) were intravitreally injected into the affected and control eye K1 at a concentration of 1×10^6 in 0.1 ml suspension and K2 — 5×10^6 in 0.1 ml, respectively.

Results. Histological examination of the removed right eyes in animals confirmed the presence of nodal growth of malignant small-cell tumor on the border of the vascular and retinal membranes (epicenter in the choroid) on the posterior wall of the eye. There was scant lymphoid infiltration, without signs of therapeutic pathomorphosis. In the removed animal's left eyes there is a preservation of histological structures of the eyeball, without dystrophic changes in the cells of the retina and vascular membranes. In the area of limb unit microcap lymphohistiocytic infiltration (with no elements of the tumor). In the choroid single scattered lymphocytes.

Conclusion. A short period of observation of the tumor did not allow conclusions about the effectiveness of CTL, but the concentrations of CTL used in the experiment did not lead to dystrophic changes in retinal cells and the choroid of the eye, which is an important factor in overcoming the toxicity of the proposed adoptive immunotherapy. At the next stage of the experiment, in our opinion, it is necessary to study in more detail the cytotoxic effect on healthy structures of the eye and the effectiveness of CTL in a larger number of affected rabbit eyes, using their different concentrations and multiplicity of administration.

Key words: retinoblastoma, experimental organ-preserving treatment, adoptive intravitreal immunotherapy

Введение

Наличие отсеков при запущенной форме интраокулярной ретинобластомы (РБ) резко ограничивает возможности сохранения глаза [1, 2]. Системная химиотерапия часто не способна воздействовать на опухолевые отсеки на сетчатке и в стекловидном теле — минимальный ответ на химиотерапию частично обусловлен устойчивостью отсеков опухоли к химиотерапии или аваскулярными участками в полости стекловидного тела и субретинальном пространстве, что затрудняет адекватное проникновение доставляемых лекарств [1, 3–6]. Дополнительное назначение к первичному лечению интравитреальной химиотерапии с целью повышения биодоступности химиопрепаратов демонстрирует впечатляющий контроль над отсеками опухоли в стекловидном теле, а также субретинальными отсеками и рецидивирующими опухолями сетчатки с минимальными осложнениями [3–9]. Лечение мелфаланом широко используют в качестве интравитреальной химиотерапии, несмотря на его высокую токсичность, при этом общая органная выживаемость достигает 68 % [3–5, 7]. С различной степенью успеха использованы такие препараты, как топотекан и метотрексат. Комбинация топотекана и мелфалана является оптимальной для рефрактерных и рецидивирующих отсеков или опухолей сетчатки [6, 8–13]. Тем не менее, несмотря на разработанные схемы дополнительной интравитреальной химиотерапии, у ряда пациентов наблюдается сбой, опухоль на лечение не отвечает, что приводит к энуклеации глаза [3–7, 10]. Это подчеркивает необходимость разработки альтернативных методов органосохраняющего лечения детей с резидуальной болезнью и внутриглазными рецидивами, оценки эффективности и безопасности применения локальной адоптивной иммунотерапии, возможности которой активно

изучаются с конца 1990-х годов, когда была убедительно продемонстрирована ее эффективность в лечении пациентов с меланомой и мелкоклеточным раком легкого [14, 15].

Цель исследования — создание надежных жизнеспособных гетеротрансплантированных моделей человеческой РБ у кроликов для определения эффективности адоптивной иммунотерапии в виде человеческих цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) в контроле над опухолями сетчатки и их отсеками.

Материалы и методы

Дизайн исследования. В экспериментальное исследование включены 2 лабораторных животных — кролики-самки породы шиншилла. В работе использованы методы: офтальмологическая диагностика с применением мидриатической ретиальной камеры с фотоархивом, культивирование и имплантация лабораторным животным клеточной линии РБ человека и человеческих ЦТЛ, а также выполнение энуклеации глаз с последующим гистологическим исследованием.

Критерии соответствия — доступность для исследователя всех требуемых клинических и лабораторных данных животных, включенных в исследование.

Критерии включения:

- здоровые кролики-самки породы шиншилла с массой тела не менее 3500 г;
- отсутствие органных дисфункций.

Критерий исключения:

- Выраженное истощение лабораторных животных.

Условия проведения. С 1-го дня исследования и до его окончания лабораторных животных содержали в условиях вивария Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Блохина (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина)

с наличием экструдированных кормов и свободного доступа к воде. Исследование было проведено сотрудниками НИИ детской онкологии и гематологии, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Продолжительность исследования. В исследование были включены 2 кролика (K1 и K2) – самки породы шиншилла в период с 18.06.2018 по 02.08.2018. До 18.06.2018 лабораторных животных выдерживали в карантине в течение 2 нед.

Результаты

Создание модели внутриглазной опухоли (РБ человека) в стекловидном теле глаз кролика породы шиншилла. Цель – добиться устойчивого роста внутриглазной РБ. Иммуносупрессию осуществляли ежедневными внутримышечными инъекциями циклоспорина А (CsA; Sandimmune 50 мг/мл; Novartis Pharma, Basel, Switzerland). Доза циклоспорина А составляла 15 мг/кг/сут в течение 3 дней (начало иммуносупрессии – 18.06.2018) до имплантации клеточной линии человеческой РБ в глаз (дата имплантации – 21.06.2018) и на протяжении последующих дней до устойчивого роста опухоли (дата устойчивого роста опухоли – 12.07.2018). Во время наблюдения за животными ежедневно оценивались признаки токсичности циклоспорина А, такие как гипертрофия десен, слюнотечение, диарея и снижение массы тела.

WERI-Rb-1 (РБ человека из ATCC-коллекции, США) была предоставлена лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % эмбриональной телячьей сывороткой с добавлением L-глутамина, 10 мм HEPES, 1,0 мм пирувата натрия, антибиотика в инкубаторе при 37 °C; 5 % CO₂. Плотность клеток суспензионной культуры WERI-Rb-1 составляла 2 × 10⁶ клеток/мл.

На 3-е сутки после иммуносупрессии животным K1 и K2 в стекловидное тело правого глаза (интравитреально) были имплантированы клетки WERI-Rb-1 в концентрации 3 × 10⁶ клеток/мл в объеме 0,1 мл. Левый глаз интактный – контрольный.

21.06.2018 ввели интравитреально в правый глаз K1 и K2 по 0,1 мл клеток WERI-Rb-1 в концентрации 3 × 10⁶ клеток/мл. Повторное интравитреальное введение 0,1 мл клеток WERI-Rb-1 в концентрации 5 × 10⁶ клеток/мл проведено 05.07.2018 одному из животных (K1) в правый глаз в связи с отсутствием внутриглазного роста опухоли.

Контроль за состоянием глаз кроликов после имплантации клеточной линии РБ человека осуществляли еженедельно, используя ретинальную камеру

с архивированием фотографий глазного дна обоих глаз.

Генерация цитотоксических Т-лимфоцитов. Дендритные клетки (ДК) и цитотоксические Т-лимфоциты культивировали в среде RPMI1640, содержащей 2 % сыворотки/плазмы человека (IV группы крови), глутамин (2 мМ), гентамицин (40 нг/мл), HEPES-буфер (10 мМ), β-меркаптоэтанол (50 мкМ). Клетки культивировали в термостате при 37 °C и 5 % CO₂. Для получения человеческих ЦТЛ проводили совместное культивирование лимфоцитов периферической крови с аллогенными ДК. Из 20 мл цельной гепаринизированной крови донора выделяли обогащенную фракцию лимфоцитов, определяли количество клеток и вносили на чашку Петри (D = 60 мм) 5 × 10⁶ лимфоцитов в 5 мл полной культуральной среды. К лимфоцитам добавляли 0,5 × 10⁶ аллогенных ДК и совместно культивировали в течение 5–7 дней. Далее проводили повторную стимуляцию лимфоцитов аллогенными ДК, при этом культуру лимфоцитов переносили в новую чашку Петри (D = 100 мм) и доводили объем культуральной среды до 10 мл. Затем, через 2–3 дня, пролиферирующие лимфоциты переносили в культуральный флакон (75 см²) и добавляли 1,5 × 10⁶ аллогенных ДК, а также интерлейкин-2 (конечная концентрация – 100 МЕ/мл), объем среды доводили до 30 мл. Последующие рестимуляции проводили через каждые 2–3 дня, внося в культуру ЦТЛ аллогенные ДК и интерлейкин-2, при этом пролиферирующую популяцию лимфоцитов разводили культуральной средой в 3 раза. На последних этапах генерации ЦТЛ рестимуляцию проводили без аллогенных ДК, добавляя в культуральную среду только интерлейкин-2. Качество цитотоксических Т-лимфоцитов оценивали при помощи проточной цитофлуориметрии. Для этого исследовали экспрессию поверхностных и внутриклеточных антигенов: CD3, CD4, CD8, NKG2D, HLA-DR, Perforin, Granzyme B. По окончании культивирования ЦТЛ отмывали от культуральной среды, определяли количество и подвергали криоконсервации.

Оценка влияния человеческих ЦТЛ на здоровый глаз кролика при интравитреальном введении. В здоровый (левый) глаз K1 24.07.2018 ввели 1 × 10⁶ человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл, а в здоровый (левый) глаз K2 ввели 5 × 10⁶ человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. К завершению эксперимента через 10 дней (02.08.2018) оба кролика обследованы. Цифровые изображения глазного дна зарегистрированы до эвтаназии. После смерти оба глаза энуклеированы и немедленно зафиксированы в 10 % формалине. Глаза переданы для секции и окрашены гематоксилин-эозином. Предполагалось оценить степень токсического воздействия ЦТЛ на оболочки глаза и внутриглазные структуры.

Оценка влияния человеческих ЦТЛ на внутриглазную модель человеческой РБ у кроликов. После

получения устойчивого роста опухоли в стекловидном теле правого глаза 24.07.2018 интравитреально ввели ЦТЛ человека. В больной (правый) глаз К1 ввели 1×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. В больной (правый) глаз К2 ввели 5×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. К завершению эксперимента через 10 дней (02.08.2018) оба кролика обследованы. Цифровые изображения глазного дна и ультразвуковое исследование глаз зарегистрированы до эвтаназии. После смерти оба глаза энуклеированы и немедленно зафиксированы в 10 % формалине. Глаза переданы для секции и окрашены гематоксилин-эозином. Предполагалось оценить степень токсического воздействия ЦТЛ на оболочки глаза и внутриглазные структуры, степень инвазии оболочек глаза опухолью, экстрасклеральный рост и степень лечебного патоморфоза. На момент окончания иммуносупрессии перед имплантацией клеточной линии человеческой РБ 21.06.2018 состояние лабораторных животных оценивалось как удовлетворительное, без органических дисфункций. Ежедневно после имплантации 21.06.2018 клеток WERI-Rb-1 осуществлялся поднаркозный осмотр глаз кроликов на ретинальной камере. На 7-й день после имплантации при офтальмоскопии у К1 не было признаков опухолевого роста, у К2 отмечен начальный рост РБ на сетчатке (рис. 1).

Повторное интравитреальное введение 0,1 мл клеток WERI-Rb-1 в концентрации 5×10^6 клеток/мл было проведено на 14-й день в правый глаз К1 в связи с сомнительным ростом опухоли, что продемонстрировано на рис. 2.

На 7-й день после повторного интравитреального введения клеток WERI-Rb-1 у К1 отмечен рост РБ (рис. 3), после пролонгации роста опухоли на 33-й день было проведено интравитреальное введение человеческих ЦТЛ (рис. 4). В здоровый (левый) глаз и пораженный РБ (правый) глаз К1 ввели 1×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл. В здоровый (левый) глаз и пораженный РБ (правый) глаз К2 ввели 5×10^6 человеческих ЦТЛ в объеме 0,1 мл.

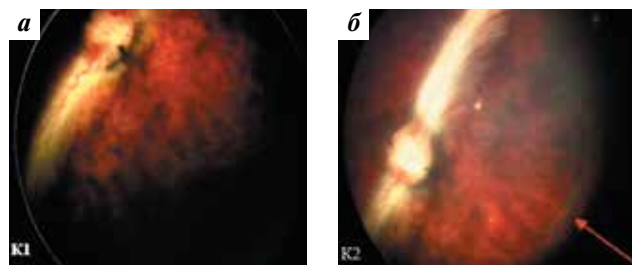


Рис. 1. Глазное дно на 7-й день: а – после имплантации клеток WERI-Rb-1 OD K1 без признаков роста РБ; б – после имплантации WERI-Rb-1 OD K2 начальный рост РБ на сетчатке (помечено стрелкой)

Fig. 1. Fundus on the 7th day: а – after implantation of WERI-Rb-1 OD K1 cells without signs of RB growth; б – after implantation of WERI-Rb-1 OD K2 initial RB growth on the retina (marked with an arrow)

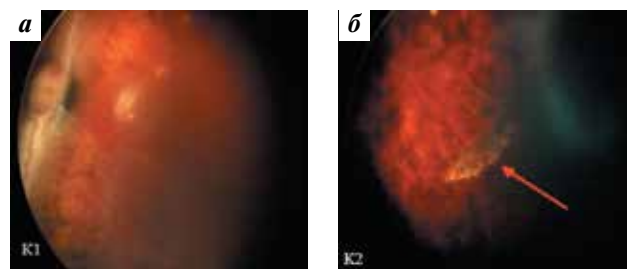


Рис. 2. Глазное дно на 14-й день: а – после имплантации клеток WERI-Rb-1 OD K1 без признаков роста РБ; б – после имплантации клеток WERI-Rb-1 OD K2 продолженный рост РБ (помечено стрелкой)

Fig. 2. Fundus on the 14th day: а – after implantation of WERI-Rb-1 OD K1 cells without signs of RB growth; б – after implantation of WERI-Rb-1 OD K2 cells continued growth of RB (marked with an arrow)

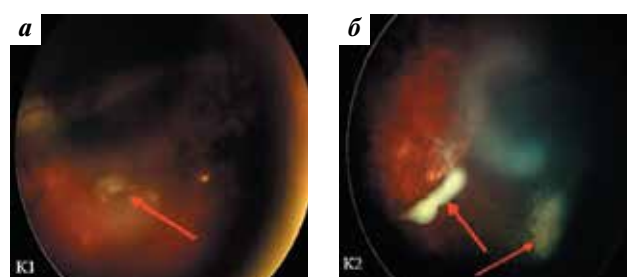


Рис. 3. Глазное дно: а – на 7-й день после повторной имплантации клеток WERI-Rb-1 отмечен рост РБ в OD K1; б – на 21-й день после имплантации клеток WERI-Rb-1 продолженный рост РБ в OD K2 (помечено стрелками)

Fig. 3. Fundus: а – on the 7th day after re-implantation of cells WERI-Rb-1 marked growth of RB in OD K1; б – on the 21st day after implantation of cells WERI-Rb-1 continued growth of RB in OD K2 (marked with arrows)

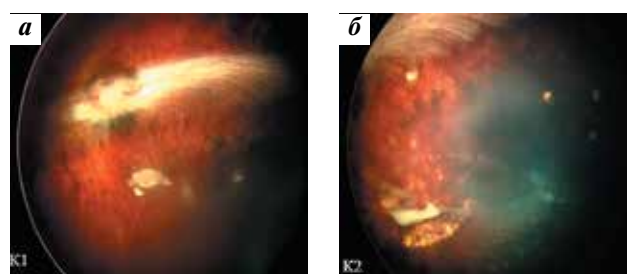


Рис. 4. Глазное дно на 33-й день после имплантации клеток WERI-Rb-1, продолженный рост опухоли в OD у К1 (а) и К2 (б)

Fig. 4. Fundus on the 33rd day after implantation of cells WERE-Rb1 continued tumor growth in OD in K1 (a) and K2 (b)

К завершению эксперимента через 10 дней (02.08.2018) после введения человеческих ЦТЛ оба кролика обследованы. Цифровые изображения глазного дна зарегистрированы до эвтаназии (рис. 5, 6). Нежелательные местные проявления в виде воспаления, атрофии, отека, некроза, отслойки сетчатки, катаракты, гемофтальма и других не выявлены.

После эвтаназии К1 и К2 оба глаза у каждого животного энуклеированы и немедленно зафиксированы в 10 % формалине. Глаза переданы для секции

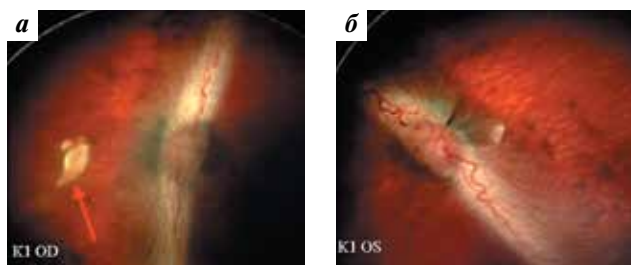


Рис. 5. Глазное дно: а – глазное дно OD K1, опухолевые очаги; б – нормальное глазное дно OS K1

Fig. 5. Fundus: a – fundus OD K1, tumor foci; б – normal fundus OS K1

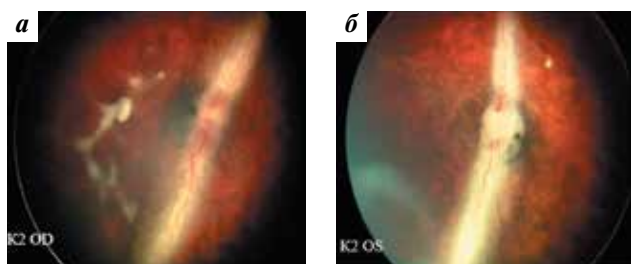


Рис. 6. Глазное дно: а – глазное дно OD K2, опухолевые очаги; б – нормальное глазное дно OS K2

Fig. 6. Fundus: a – fundus OD K2, tumor foci; б – normal fundus OS K2

и окрашены гематоксилин-эозином. Предполагалось оценить степень токсического воздействия ЦТЛ на оболочки глаза и внутриглазные структуры, степень инвазии оболочек глаза опухолью, экстрасклеральный рост и степень лечебного патоморфоза.

В правых пораженных опухолью глазах K1 и K2 были обнаружены очаги разрастания мелкокругло-клеточной опухоли сетчатки (рис. 7) с распространением

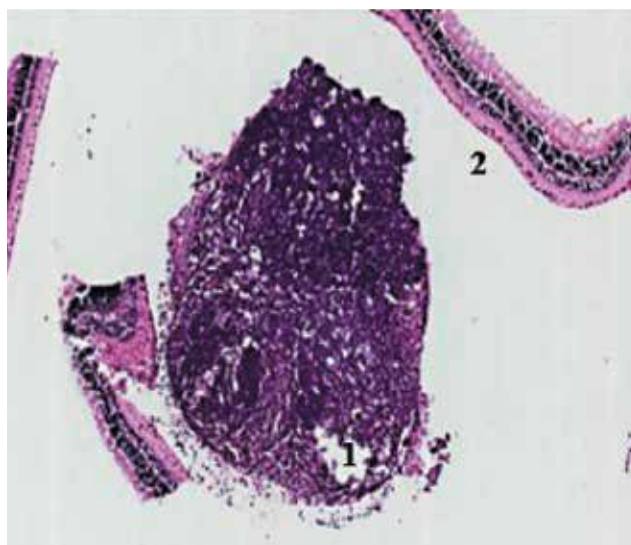


Рис. 7. Мелкокруглоклеточная опухоль сетчатки: 1 – опухолевый очаг, 2 – сетчатка

Fig. 7. Small cell retinal tumor: 1 – tumor focus, 2 – retina

на хориоидею (рис. 8), без экстрасклерального роста и признаков лечебного патоморфоза, со скудной лимфоидной инфильтрацией, без дистрофических изменений оболочек глаза. В обоих левых (контрольных) глазах K1 и K2 в области лимба выявлены единичные микроочаги лимфогистиоцитарного инфильтрата (точка инъекции при введении человеческих ЦТЛ).

Обсуждение

Адоптивная иммунотерапия подразумевает перенос больному иммунных клеток, обладающих активностью в отношении опухоли. Цитотоксический Т-лимфоцит может распознать клетку-мишень по крайней мере двумя способами: 1-й – антигензависимый, т. е. Т-лимфоцит узнает фрагмент опухолевого антигена вместе с молекулой главного комплекса гистосовместимости I класса на поверхности опухолевой клетки; 2-й – антигеннезависимый, т. е. за счет взаимодействия молекулы NKG2D на Т-лимфоците и стресс-индуцированных молекул MICA, MICB, ULBP1 на опухолевой клетке. В случае аллогенной системы, когда лимфоциты от одного человека, а опухоль (клеточная линия РБ) от другого, распознавание клетки-мишени может идти только 2-м способом. Новый виток интереса к адоптивной иммунотерапии связан с разработкой и внедрением в практику технологии CAR-T-клеточной терапии. Химерные CAR-T-клетки против клеточного поверхностного рецептора CD 19 показали свою высокую эффективность в лечении рецидивных и рефрактерных форм В-клеточных лимфобластных опухолей [16, 17]. В настоящее время ведутся исследования I фазы по применению адоптивной иммунотерапии при солидных опухолях,

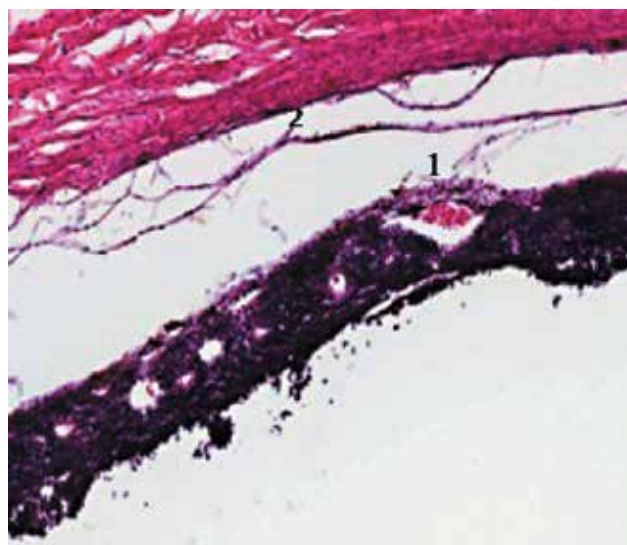


Рис. 8. Мелкокруглоклеточная опухоль сетчатки: 1 – инфильтрация опухолью хориоидеи; 2 – склера

Fig. 8. Small cell retinal tumor: 1 – infiltration by tumor choroid; 2 – sclera

таких как нейробластома, гепатоцеллюлярная карцинома, саркомы мягких тканей и глиомы головного мозга [18]. Применение человеческих ЦТЛ при макроскопической РБ может быть оправданным с целью создания внутриглазного иммунитета, так как известно, что глаз обладает весьма скудной лимфатической системой. С помощью иммуногистохимического окрашивания на маркеры эндотелия лимфатических сосудов (Pdrn и LYVE-1) и при гистологическом исследовании было показано наличие лимфатической системы в следующих структурах: в конъюнктиве, лимбе роговицы, цилиарном теле, слезной железе, интраорбитальной части твердой мозговой оболочки зрительного нерва и экстраокулярных мышцах. Кроме этого, есть доказательства наличия макрофагов в хориоиде, что можно рассматривать как часть лимфатической системы. В общем внутриглазная лимфатическая система у человека представлена только в цилиарном теле [19]. В нашем исследовании для создания модели макроскопической интраокулярной РБ, оценки токсического и возможно терапевтического действия ЦТЛ мы использовали глаза кролика, учитывая некоторую схожесть его строения с глазом человека и возможность регистрации глазных симптомов с помощью ретинальной камеры.

Заключение

Интравитреальное введение WERI-Rb-1 после предварительной иммуносупрессии привело к устой-

чивому росту опухоли в глазах испытуемых через 3 нед после имплантации. Для устойчивого роста опухоли *in vivo* необходима достаточная концентрация опухолевых клеток в 1 мл культуры, не менее 3×10^6 . Созданная модель человеческой РБ глаза кролика может хорошо визуализироваться с помощью ретинальной камеры. Введение человеческих ЦТЛ в концентрации от 1×10^6 до 5×10^6 в 0,1 мл не привело к дистрофическим и воспалительным изменениям в сетчатке и сосудистой оболочке здоровых глаз, за исключением обнаруженного единичного микроочага вблизи лимба, а также отмечены единичные лимфоциты в хориоиде, что может быть вариантом нормы. Скудная лимфоидная инфильтрация наблюдалась вокруг опухолевых разрастаний во всех образцах. Непродолжительный период наблюдения за опухолью не позволил сделать выводы об эффективности предложенного способа лечения, но используемые в эксперименте количества человеческих ЦТЛ не привели к дистрофическим изменениям клеток сетчатки и сосудистой оболочки глаза, что является важным фактором в преодолении токсичности предлагаемой адоптивной иммунотерапии. В дальнейшем мы планируем более подробно изучить цитотоксическое воздействие человеческих ЦТЛ на здоровые структуры глаза кролика, а также оценить эффективность применяемого метода, варьируя дозу и кратность введения человеческих ЦТЛ, и время наблюдения.

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

- Shields C.L., Honavar S.G., Shields A.J. et al. Factors predictive of recurrence of retinal tumors, vitreous seeds, and subretinal seeds following chemoreduction for retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2002;120(4):460–4. DOI: 10.1001/archophth.120.4.460.
- Gündüz K., Günel I., Yalçındağ N. et al. Causes of chemoreduction failure in retinoblastoma and analysis of associated factors leading to eventual treatment with external beam radiotherapy and enucleation. *Ophthalmology* 2004;111(10):1917–24. DOI: 10.1016/j.ophtha.2004.04.016.
- Berry J.L., Bechtold M., Shah S. et al. Not all seeds are created equal: seed classification is predictive of outcomes in retinoblastoma. *Ophthalmology* 2017;124(12):1817–25. DOI: 10.1016/j.ophtha.2017.05.03.
- Ghassemi F., Shields C.L. Intravitreal melphalan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *Arch Ophthalmol* 2012;130(10):1268–71. DOI: 10.1001/archophth.2012.1983.
- Shields C.L., Manjandavida F.P., Arepalli S. et al. Intravitreal melphalan for persistent or recurrent retinoblastoma vitreous seeds: preliminary results. *JAMA Ophthalmol* 2014;132(3):319–25. DOI: 10.1001/jamaophth.2013.7666.
- Rao R., Honavar S.G., Sharma V., Reddy V.A.P. Intravitreal topotecan in the management of refractory and recurrent vitreous seeds in retinoblastoma. *Br J Ophthalmol* 2018;102(4):490–5. DOI: 10.1136/bjophth-2017-310641.
- Kiratli H., Koç İ., Varan A., Akyüz C. Intravitreal chemotherapy in the management of vitreous disease in retinoblastoma. *Eur J Ophthalmol* 2017;27(4):423–7. DOI: 10.5301/ejo.5000921.
- Abramson D.H., Catalanotti F., Brodie S.E. et al. Intravitreal chemotherapy and laser for newly visible subretinal seeds in retinoblastoma. *Ophthalmic Genet* 2018;39(6):353–6. DOI: 10.1080/13816810.2018.1443343.
- Abramson D.H., Ji X., Francis J.H. et al. Intravitreal chemotherapy in retinoblastoma: expanded use beyond intravitreal seeds. *Br J Ophthalmol* 2018;103(4):488–93. DOI: 10.1136/bjophth-2018-312037.
- Kivelä T., Eskelin S., Paloheimo M. et al. Intravitreal methotrexate for retinoblastoma. *Ophthalmology* 2011;118(8):1689. DOI: 10.1016/j.ophtha.2011.02.005.
- Ghassemi F., Shields C.L., Ghadimi H. et al. Combined intravitreal melphalan and topotecan for refractory or recurrent vitreous seeding from retinoblastoma. *JAMA Ophthalmol* 2014;132(8):936–41. DOI: 10.1001/jamaophth.2014.414.
- Долгушин Б.И., Ушакова Т.Л., Погребняков И.В. и др. Роль селективной

- интраартериальной и интравитреальной химиотерапии в органосохраняющем лечении детей с ретинобластомой. Забайкальский медицинский вестник 2018;1:7–24. [Dolgushin B.I., Ushakova T.L., Pogrebnayakov I.V. et al. The role of selective intraarterial and intravitreal chemotherapy in the organ-preserving treatment of children with retinoblastoma. *Zabaykal'skiy meditsinskiy vestnik* = *The Transbaikalian medical Bulletin* 2018;1:7–24. (In Russ.)].
13. Горовцова О.В., Ушакова Т.Л., Поляков В.Г. Современные возможности органосохраняющего лечения детей с интраокулярной ретинобластомой. Онкопедиатрия 2018;5(3):175–87. DOI: 10.15690/onco.v5i3.1935. [Gorovtsova O.V., Ushakova T.L., Polyakov V.G. Modern possibilities of organ-preserving treatment in children with intraocular retinoblastoma. *Onkopediatriya* = *Oncopediatrics* 2018;5(3):175–87. (In Russ.)].
 14. Luke J.J., Flaherty K.T., Ribas A., Long G.V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 2017;14(8):463–82. DOI: 10.1038/nrclinonc.2017.43.
 15. Mayor M., Yang N., Sterman D. et al. Immunotherapy for non-small cell lung cancer: current concepts and clinical trials. *Eur J Cardiothorac Surg* 2016;49(5):1324–33. DOI: 10.1093/ejcts/ezv371.
 16. Rotolo A., Karadimitris A., Ruella M. Building upon the success of CAR T19: chimeric antigen receptor T cells for hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 2017;59(9):2040–55. DOI: 10.1080/10428194.2017.1403024.
 17. Neelapu S.S., Locke F.L., Bartlett N.L. et al. Axicabtagene ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2017;377(26):2531–44. DOI: 10.1056/NEJMoa1707447.
 18. Tesfaye M., Savoldo B. Adoptive cell therapy in treating pediatric solid tumors. *Curr Oncol Rep* 2018;20(9):73. DOI: 10.1007/s11912-018-0715-9.
 19. Shintaro N., Hafezi-Moghadam A., Ishibashi T. Review Article. Lymphatics and Lymphangiogenesis in the Eye. *J Ophthalmol* 2012;2012:783163. DOI: 10.1155/2012/783163.

Благодарность. Авторы выражают благодарность заведующему отделением онкоофтальмологии и радиологии ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России доктору медицинских наук А.А. Яровому за предоставленную возможность доложить о результатах данного исследования на научно-практической конференции «Федоровские чтения – 2019».

Acknowledgment. The authors would like to express their gratitude to the head of the Department of Oncophthalmology and Radiology, S.N. Fedorov NMRC “MNTK “Eye Microsurgery”, Doctor of Medical Sciences A.A. Yarovoy for the opportunity to report the results of the study at the scientific and practical conference “Fedorov Readings – 2019”.

Вклад авторов

Т.Л. Ушакова: разработка дизайна исследования, офтальмологическое обследование лабораторных животных, имплантации клеточной линии РБ человека, интравитреальное введение человеческих ЦТЛ, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
И.С. Долгополов: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
З.А. Соколова: культивирование клеточной линии РБ человека, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Г.З. Чкадуа: разработка дизайна исследования, культивирование человеческих ЦТЛ; анализ полученных данных, написание текста рукописи;
Н.С. Титов: сбор информации о международных данных по созданию модели внутриглазной опухоли у лабораторных животных;
Ю.М. Букреев: организация содержания лабораторных животных, иммуносупрессивная подготовка животных;
Ю.А. Серов: офтальмологическое обследование лабораторных животных, энуклеация глаз лабораторным животным; обзор данных по лимфатической системе глаза;
О.В. Горовцова: офтальмологическое обследование лабораторных животных;
Д.А. Булетов: энуклеация глаз лабораторным животным;
Н.А. Козлов: гистологическое исследование, интерпретация полученных данных с фотоархивом;
В.Г. Поляков: критические замечания, коррекция, редактирование.

Authors' contributions

T.L. Ushakova: developing the research design, ophthalmologic examination of laboratory animals; implanting human RB cell line, intravitreal administration of human CTLs; analysis of obtained data, writing the manuscript;
I.S. Dolgoplov: developing the research design, analysis of obtained data, writing the manuscript;
Z.A. Sokolova: cultivating human RB cell line; analysis of obtained data, writing the manuscript;
G.Z. Chkadua: developing the research design cultivating human CTLs; analysis of obtained data, writing the manuscript;
N.S. Titov: collecting international data on an intraocular tumor model in laboratory animals;
Yu.M. Bukreev: maintenance of laboratory animals, animals' immunosuppressive preparation;
Yu.A. Serov: ophthalmologic examination of laboratory animals; eye enucleation to the laboratory animals; reviewing data on the lymphatic eye system;
O.V. Gorovtsova: ophthalmologic examination of laboratory animals;
D.A. Buletov: eye enucleation to the laboratory animals;
O.N. Kozlov: histological examination, interpreting obtained data using the photo archive;
V.G. Polyakov: critical comments, correction, editing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.Л. Ушакова/T.L. Ushakova: <https://orcid.org/0000-0003-3263-6655>
И.С. Долгополов/I.S. Dolgoplov: <https://orcid.org/0000-0001-9777-1220>
З.А. Соколова/Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>
Г.З. Чкадуа/G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-4633-049X>
Н.С. Титов/N.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0002-5151-4920>

Ю.А. Серов/S.Yu. Serov: <https://orcid.org/0000-0003-0634-3314>
О.В. Горовцова/O.V. Gorovtsova: <https://orcid.org/0000-0001-5402-062X>
Д.А. Булетов/D.A. Buletov: <https://orcid.org/0000-0002-8559-6709>
Н.А. Козлов/N.A. Kozlov: <https://orcid.org/0000-0003-3852-3969>
В.Г. Поляков/V.G. Polyakov: <https://orcid.org/0000-0002-8096-0874>

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

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: 11.08.2019. **Принята в печать:** 18.09.2019.
Article submitted: 11.08.2019. **Accepted for publication:** 18.09.2019.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

Г.З. Чкадуа, А.А. Борунова, И.Б. Шоуа, И.С. Долгополов, Р.И. Пименов, И.Н. Михайлова,
Т.Н. Заботина, М.А. Барышникова

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

Контакты: Георгий Зурабович Чкадуа gechkadua@yandex.ru

Введение. Применение клеточных технологий в медицине предполагает возможность длительного хранения клеточного продукта без утраты его жизнеспособности и основных свойств. Методики криоконсервации клеток, применяемые в клинике, довольно разнообразны и могут сильно отличаться друг от друга. Тем не менее в самом методе можно выделить 2 части: 1-я — замораживающая среда, в которой находятся клетки, 2-я — способ криоконсервации. В данной работе мы исследуем метод, который используют в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина для криоконсервации костного мозга у онкологических больных (взрослых и детей) для последующей трансплантации. Замораживающая среда состоит из полиглюкина (95 %) и диметилсульфоксида (5 %), а криоконсервация происходит в парах жидкого азота (-160°C).

Цель исследования — показать, что предлагаемый способ криоконсервации дендритных клеток высокоэффективен, прост, воспроизводим и наиболее удобен для клинического применения.

Материалы и методы. Зрелые дендритные клетки, которые культивировали из моноцитов периферической крови, подвергали криоконсервации, после чего исследовали, как меняются жизнеспособность, экспрессия основных поверхностных антигенов и стимулирующая активность в отношении аллогенных Т-лимфоцитов.

Результаты. Криоконсервация приводила к гибели незначительной части клеток, а повторная заморозка увеличивала долю мертвых клеток. Между тем разница в экспрессии основных поверхностных антигенов у свежих, криоконсервированных и повторно криоконсервированных дендритных клеток была статистически недостоверна. Уровень стимулирующей активности свежих и криоконсервированных дендритных клеток был одинаковым, тогда как повторная криоконсервация приводила к достоверному снижению пролиферации аллогенных Т-лимфоцитов.

Заключение. Представленный метод криоконсервации позволяет эффективно сохранять жизнеспособность и основные функции дендритных клеток. Для введения вакцины больному после разморозки дендритных клеток достаточно развести их изотоническим раствором, что наиболее удобно для клинического применения.

Ключевые слова: криоконсервация, дендритные клетки, аллогенная стимуляция лимфоцитов

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-65-75

CRYOPRESERVATION OF HUMAN DENDRITIC CELLS FOR CLINICAL USE

G.Z. Chkadua, A.A. Borunova, I.B. Shoua, I.S. Dolgoplov, R.I. Pimenov,
I.N. Mikhailova, T.N. Zabolina, M.A. Baryshnikova

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

Introduction. The increasing clinical use of cellular technologies suggests the possibility of long-term storage of the cellular product while maintaining its viability and basic properties. The procedures of cell's cryopreservation used in laboratory as well in clinical practice differ a lot. Each method includes two tasks to solve: what is the optimal freezing medium to use and what cryopreservation procedure to prefer. In this paper, we present the method utilized in our center for bone marrow cell cryopreservation. The freezing was carried out in nitrogen vapor after adding the medium containing 95 % dextran [average mw 50000–70000] and 5 % dimethylsulfoxid.

Purpose. To show that the proposed method of cryopreservation of dendritic cells is highly effective, simple, reproducible and most convenient for clinical use.

Materials and methods. Viability, expression of surface antigens and stimulating activity towards allogeneic T lymphocytes of cryopreserved mature dendritic cells cultured from peripheral blood monocytes were evaluated.

Results. The first cryopreservation resulted in the death of a small amount of cells. The second freezing procedure increased the proportion of dead cells. Meanwhile, the difference in the expression of the surface antigens in fresh, cryopreserved and re-cryopreserved dendritic cells was not statistically significant. The level of stimulating activity of fresh and cryopreserved dendritic cells did not significantly differ. Conversely the proliferation of allogeneic T lymphocytes was decreased after stimulation with re-cryopreserved dendritic cells.

Conclusion. The presented method of cryopreservation allows to preserve the viability and basic functions of dendritic cells. After thawing dendritic vaccine could be administered to patients after being diluted in an isotonic saline without washing, which makes this method the most convenient for clinical use.

Key words: cryopreservation, dendritic cells, allogenic lymphocyte stimulation

Введение

В настоящее время применение клеточных технологий в медицине имеет широкое распространение, и одной из первых технических задач, которую приходится решать, является консервация клеток с сохранением их жизнеспособности и функций. Для эукариотических клеток единственным способом консервации является криоконсервация. Данный метод уже давно используется как в экспериментальных работах, так и в клинической практике, и, пожалуй, общим во всех протоколах является только наличие криофилактика диметилсульфоксида (ДМСО) в составе замораживающей среды. В остальном же методики отличаются довольно сильно, а именно: составом среды, содержанием ДМСО, программой криоконсервации, а также манипуляциями, следующими после разморозки клеток. Для того чтобы метод криоконсервации был эффективным, ему необходимо отвечать ряду требований: 1-е и главное — после разморозки клетки должны сохранять жизнеспособность и свои функции; 2-е — метод должен быть относительно прост, воспроизводим и по возможности дешев. Клиническое его применение накладывает дополнительные условия относительно замораживающей среды, которая не должна содержать ксеногенных белков. В случае, когда используются дифференцированные клетки, например дендритные клетки (ДК), не обладающие способностью к пролиферации, очень важно, чтобы после разморозки максимально возможное количество клеток сохраняло жизнеспособность. Также следует уменьшить количество манипуляций, следующих после разморозки, и свести к минимуму временной промежуток между разморозкой клеток и введением их больному.

Замораживающая среда, по сути, состоит из 2 компонентов: криофилактика ДМСО (его содержание чаще всего составляет 10–20 %) и среды, в которой его растворяют. Отличия в составе среды очень большие: это и культуральная жидкость, содержащая сыворотку человека, раствор альбумина и глюкозы, и чистая сыворотка человека и т. д. [1–7]. Программы криоконсервации также могут сильно отличаться друг от друга, например, ампулы с клетками кладут в пластиковый контейнер, во внутренней камере которого находится изопропиловый спирт, после этого контейнер помещают в низкотемпературный морозильник, и через несколько часов замороженные клетки переносят в жидкий азот [1–3, 6, 7]. Альтернативным

способом является криоконсервация с помощью программного замораживателя, который способен понижать температуру со скоростью 1–2 градуса в минуту [5]. Манипуляции, следующие после разморозки клеток, в основном сводятся к отмывке от замораживающей среды и переводу клеток в изотонический раствор.

Дендритные клетки относят к профессиональным антигенпрезентирующим клеткам, при помощи которых можно получить направленный иммунный ответ против антигенов, которыми они были «нагружены» [8]. Зрелые ДК, которыми вакцинируют онкологических больных, обладают рядом характеристик, в частности экспрессией на поверхности таких антигенов, как CD54, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC, HLA-DR. Также зрелые ДК обладают сильной активирующей способностью в отношении аллогенных Т-лимфоцитов, которые после совместного культивирования начинают интенсивно пролиферировать. Таким образом, для оценки предлагаемого способа криоконсервации необходимо сравнить следующие характеристики свежих и замороженных ДК: 1) жизнеспособность клеток, 2) иммунофенотип ДК, 3) пролиферативную активность аллогенных Т-лимфоцитов.

За основу был взят метод криоконсервации костного мозга, разработанный в 1986 г. ведущим научным сотрудником отделения переливания крови с банком костного мозга ВОНЦ АМН СССР Д.М. Мхеидзе. Суть его заключается в том, что клетки ресуспендируют в замораживающей среде, состоящей из полиглюкина и ДМСО, криопробирки с клетками кладут в коробку из многослойной фанеры, после чего ее помещают в пары жидкого азота. Спустя 1 ч замороженные клетки можно переносить в жидкий азот на хранение. Перед использованием ДК размораживают при комнатной температуре, разводят изотоническим раствором или фосфатно-солевым буфером (PBS) и внутривенно вводят больному.

Цель исследования — показать, что предлагаемый способ криоконсервации ДК высокоэффективен, прост, воспроизводим, физиологичен и наиболее удобен для клинического применения.

Материалы и методы

Культивирование дендритных клеток

Дендритные клетки получали путем культивирования моноцитов периферической крови человека (здоровых доноров и онкологических больных,

получающих вакцинотерапию) по отработанной методике с небольшими изменениями [9]. Ранее нами было показано, что качество получаемых ДК не зависит от того, кто являлся донором крови — здоровый человек или онкологический больной. Из гепаринизированной крови при помощи среды для выделения лимфоцитов (MP Biomedicals, США) выделяли моноклеары периферической крови. После этого клетки ресуспендировали в полной среде (ПС) и доводили плотность клеток до 5 млн/мл. Состав ПС: RPMI 1640 (Gibco, США), сыворотка крови человека IV группы (2 %), L-глутамин (2 мМ), HEPES буфер (10 мМ), гентамицин (40 нг/мл), β -меркаптоэтанол (50 мкМ). Для получения ДК в чашку Петри $d = 100$ мм (Falcon, США) вносили 10 мл ПС, содержащей 50 млн моноклеаров периферической крови и инкубировали в термостате (5 % CO_2 , 37 °C). Через 1,5 ч среду с неприкрепившимися клетками (лимфоцитами) отбирали, а к клеткам, адгезированным на пластике (моноцитам), добавляли 10 мл свежей ПС, содержащей гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ) (Shering-Plough, США) (конечная концентрация 80 нг/мл) и интерлейкин-4 (ИЛ-4) (Gibco, США) (конечная концентрация 10 нг/мл). На 2-е сутки культивирования добавляли 1 мл свежей ПС, содержащей 800 нг ГМ-КСФ и 100 нг ИЛ-4. На 3-и сутки культивирования для осуществления дифференцировки ДК производили полную замену среды на 10 мл свежей ПС, содержащей 100 нг фактора некроза опухоли α (Gibco, США) и 10 мкг простагландина E_2 (Cayman Chemical Company, США). Через 48 ч свободно плавающие ДК собирали, отмывали от культуральной среды, определяли их количество и использовали в дальнейших экспериментах.

Криоконсервация дендритных клеток

Отмытые ДК ресуспендировали в замораживающей среде из расчета 10 млн клеток на 1 мл среды. Состав замораживающей среды: 95 % полиглюкина (Биохимик, Россия), 5 % ДМСО (MP Biomedicals, США). Криопробирки с суспензией ДК переносили в коробку из многослойной фанеры (толщина стенок — 1 см) и помещали ее в пары жидкого азота (–160 °C). Через 1 ч ампулы переносили в жидкий азот для хранения. Повторную криоконсервацию осуществляли следующим образом: криопробирку с замороженными клетками размораживали при комнатной температуре (+20 °C), после чего ампулу снова помещали в коробку и проводили криоконсервацию по схеме, описанной выше.

Имунофенотипирование дендритных клеток

Имунофенотипирование зрелых ДК проводили на 5-е сутки культивирования методом проточной цитометрии. По окончании культивирования ДК

собирали, отмывали от культуральной среды и разделяли на 3 части. Первую часть использовали для иммунофенотипирования, тогда как остальные 2 части подвергали однократной и повторной криоконсервации. Анализ иммунофенотипа клеток проводили на цитофлуориметре FACSCalibur (BD, США). Для иммунофенотипирования ДК однократно и повторно криоконсервированные клетки размораживали при комнатной температуре, разводили PBS в 3 раза, разносили по пробиркам и проводили инкубацию с антителами к исследуемым антигенам по стандартной методике. В работе использовали моноклональные антитела к CD54, CD80, CD83, HLA-ABC, меченные FITC (Beckman Coulter, США), антитела, меченные PE к CD86, HLA-DR (Beckman Coulter, США) и к CCR7 (R&D Systems, США), и соответствующие изотипические контроли, конъюгированные с FITC или PE (Beckman Coulter, США).

Об экспрессии исследуемых антигенов судили по значению средней интенсивности флуоресценции (MFI). Для сопоставления результатов различных экспериментов полученные данные переводили из абсолютных в относительные значения MFI. Это обусловлено тем, что настройки проточного цитофлуориметра от опыта к опыту могут различаться между собой. Для получения относительных величин значение MFI исследуемого антигена делили на значение MFI соответствующего изотипического контроля. Для обработки данных использовали программу WinMDI 2.8.

Исследование жизнеспособности дендритных клеток

Жизнеспособность ДК определяли методом окрашивания Annexin V, конъюгированного с FITC (Invitrogen, США), согласно инструкции производителя. Однократно и повторно замороженные ДК размораживали при комнатной температуре, разводили PBS в 3 раза и проводили аналогичное окрашивание Annexin V.

Аллогенная стимуляция Т-лимфоцитов

Пролиферацию Т-лимфоцитов исследовали при помощи витального флуоресцентного красителя CFSE (Fluka, США), который проникает в ядро клетки, а после ее деления поровну распределяется между дочерними клетками, и, соответственно, интенсивность свечения клеток падает. Для аллогенной стимуляции использовали общую популяцию лимфоцитов, которую получали после удаления моноцитов из моноклеаров периферической крови за счет адгезии последних на пластик. Полученные лимфоциты ресуспендировали в 1 мл ПС и добавляли CFSE (конечная концентрация 5 мкг/мл), после 5 мин инкубации при комнатной температуре

Таблица 1. Сравнение жизнеспособности зрелых ДК до и после криоконсервации

Table 1. Comparison of viability of mature dendritic cells before and after cryopreservation

Annexin V (n = 10)	Среднее значение мертвых клеток (%) $\bar{X}$ (S) Average dead cells value (%) $\bar{X}$ (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значимость разницы, t Significance, t
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
Свежие ДК Fresh DC	7,8 (1,1)	6,9	8,6	5,5	9,3	Свежие/Крио (t < 0,0001) Fresh/Cryo (t < 0,0001) Свежие/Крио 2 (t < 0,001) Fresh/Cryo 2 (t < 0,001) Крио/Крио 2 (t < 0,005) Cryo/Cryo 2 (t < 0,005)
Крио ДК Cryopreserved DC	10,3 (2,03)	8,8	11,7	6,9	13,8	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	16,2 (5,4)	12,3	20,2	9,8	28,01	

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: ДК – дендритные клетки.
Note. Here and in Table 2, 3: DC – dendritic cells.

окрашенные клетки дважды отмывали, определяли их количество и наносили 5 млн в 5 мл ПС на чашку Петри d = 60 мм (Falcon, США). Далее к лимфоцитам добавляли 0,5 млн свежих или замороженных, или повторно замороженных аллогенных ДК. Контролем на спонтанную пролиферацию служила культура клеток без добавления ДК, а контролем на индуцированную пролиферацию были лимфоциты с добавлением интерлейкина-2 (ронколейкин, Россия) (150 Ед/мл). Так как после разморозки ДК не отмывали, то в чашки Петри со свежими ДК, а также в контрольные пробы вносили аналогичное количество замораживающей среды. Спустя 6 сут культуры клеток собирали, отмывали от среды и проводили окрашивание при помощи антител к CD3-антигену, конъюгированных с РЕ (Beckman Coulter, США). Анализ пролиферации осуществляли методом проточной цитометрии, для этого проводили гейтирование CD3-положительных клеток, после чего оценивали количество Т-лимфоцитов со сниженной интенсивностью флуоресценции по каналу FL1.

Статистическая обработка результатов

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0, значения считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждения

Оценка жизнеспособности дендритных клеток

Первым параметром при оценке эффективности криоконсервации является жизнеспособность, т.е. какая доля клеток погибла, а какая осталась живой. Жизнеспособность определяли при помощи окра-

шивания Annexin V, который позволяет выявлять гибнущие клетки на самых ранних стадиях. Исходные значения мертвых клеток до замораживания не превышали 10 %, тогда как после криоконсервации количество мертвых ДК увеличивалось на 2–5 %, а повторная криоконсервация приводила к дальнейшему росту погибших клеток (рис. 1). Объединенные данные экспериментов приведены в табл. 1, разница в жизнеспособности клеток между группами статистически значима.

Определение иммунофенотипа дендритных клеток

Для исследования выбрали антигены, которые, с одной стороны, хорошо экспрессированы на поверхности зрелых ДК, а с другой – имеют ключевое значение при реализации основных функций ДК: молекула адгезии ICAM-1 – CD54; костимуляторные молекулы CD80 и CD86; маркер зрелых ДК – CD83; молекулы главного комплекса гистосовместимости I (HLA-ABC) и II (HLA-DR) классов; хемокиновый рецептор CCR7, обеспечивающий миграцию ДК в лимфоузлы. Криоконсервация, а также повторная криоконсервация не меняли уровень экспрессии исследуемых антигенов по сравнению со свежими ДК (рис. 2). Объединенные данные экспериментов приведены в табл. 2.

Аллогенная стимуляция Т-лимфоцитов

ДК обладают выраженной активационной способностью в отношении аллогенных Т-лимфоцитов, это обусловлено высокой экспрессией молекул главного комплекса гистосовместимости I и II классов, а также костимуляторных молекул CD80 и CD86 на поверхности ДК. После 6 сут совместного культивирования пролиферацию регистрировали у 30 %

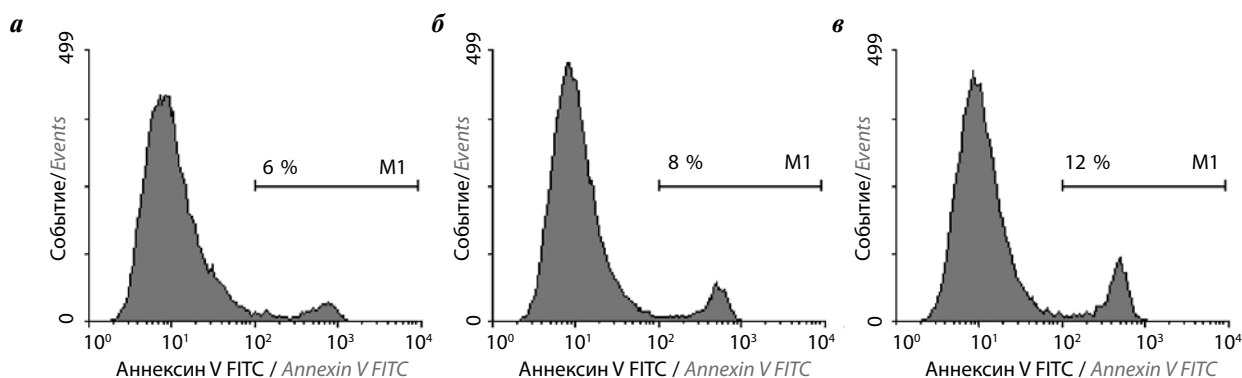


Рис. 1. Исследование жизнеспособности зрелых ДК методом проточной цитометрии. По оси абсцисс — интенсивность свечения клеток, по оси ординат — количество событий. Маркер определяет процент мертвых клеток, связавших Annexin V: а — свежие ДК; б — криоконсервированные ДК; в — повторно криоконсервированные ДК. Здесь и далее на рис. 2–4: ДК — дендритные клетки

Fig. 1. Flow cytometry analysis of viability of mature DC. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events. Marker determines the percentage of dead cells that have bound Annexin V: a — fresh DC; б — cryopreserved DC; в — re-cryopreserved DC. Here and in Fig. 2–4: DC — dendritic cells

Таблица 2. Сравнение экспрессии антигенов на зрелых ДК до и после криоконсервации

Table 2. Comparison of antigen expression on mature DC before and after cryopreservation

Маркеры Markers	Среднее значение MFI $\bar{X}$ (S) Average dead MFI $\bar{X}$ (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значимость разницы, <i>t</i> Significance, <i>t</i>
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
CD54 (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	30,8 (6,8)	20,02	41,6	21,01	36,6	Свежие/Крио (<i>t</i> <0,7) Fresh/Cryo (<i>t</i> <0,7) Свежие/Крио 2 (<i>t</i> <0,6) Fresh/Cryo 2 (<i>t</i> <0,6) Крио/Крио 2 (<i>t</i> <0,2) Cryo/Cryo 2 (<i>t</i> <0,2)
Крио ДК Cryopreserved DC	30,3 (6,4)	20,05	40,5	22,7	38,4	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	31,7 (6,2)	21,8	41,6	25,01	39,8	
CD80 (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	9,1 (1,4)	6,8	11,4	7,2	10,4	Свежие/Крио (<i>t</i> <0,6) Fresh/Cryo (<i>t</i> <0,6) Свежие/Крио 2 (<i>t</i> <0,8) Fresh/Cryo2 (<i>t</i> <0,8) Крио/Крио 2 (<i>t</i> <0,5) Cryo/Cryo 2 (<i>t</i> <0,5)
Крио ДК Cryopreserved DC	9,01 (2,01)	5,7	12,2	6,4	10,6	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	9,1 (1,8)	6,2	12,1	7,2	10,8	
CD83 (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	5,3 (0,5)	4,5	6,1	4,6	5,8	Свежие/Крио (<i>t</i> <0,2) Fresh/Cryo (<i>t</i> <0,2) Свежие/Крио 2 (<i>t</i> <0,1) Fresh/Cryo 2 (<i>t</i> <0,1) Крио/Крио 2 (<i>t</i> <0,7) Cryo/Cryo 2 (<i>t</i> <0,7)
Крио ДК Cryopreserved DC	4,9 (0,6)	3,9	5,9	4,5	5,9	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	4,9 (0,5)	4,04	5,8	4,4	5,7	

Окончание табл. 2

The end of table 2

Маркеры Markers	Среднее значение MFI $\bar{X}$ (S) Average dead MFI $\bar{X}$ (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значимость разницы, <i>t</i> Significance, <i>t</i>
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
CD86 (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	348,8 (171,3)	76,1	621,4	184,9	537,5	Свежие/Крио (t <0,5) Fresh/Cryo (t <0.5) Свежие/Крио 2 (t <0,4) Fresh/Cryo 2 (t <0.4) Крио/Крио 2 (t <0,5) Cryo/Cryo 2 (t <0.5)
Крио ДК Cryopreserved DC	319,8 (95,3)	168,1	471,5	223,5	412,8	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	306,6 (83,7)	173,3	439,9	213,5	387,5	
HLA-ABC (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	210,4 (50,8)	129,5	291,3	161,3	274,6	Свежие/Крио (t <0,5) Fresh/Cryo (t <0.5) Свежие/Крио 2 (t <0,8) Fresh/Cryo 2 (t <0.8) Крио/Крио 2 (t <0,9) Cryo/Cryo 2 (t <0.9)
Крио ДК Cryopreserved DC	216,9 (59,6)	122,07	311,8	161,6	298,4	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	216,1 (68,3)	107,3	324,9	160,8	313,01	
HLA-DR (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	50,3 (26,8)	7,5	93,1	28,3	89,3	Свежие/Крио (t <0,4) Fresh/Cryo (t <0.4) Свежие/Крио 2 (t <0,4) Fresh/Cryo 2 (t <0.4) Крио/Крио 2 (t <0,3) Cryo/Cryo 2 (t <0.3)
Крио ДК Cryopreserved DC	55,8 (26,9)	12,8	98,7	28,9	85,6	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	44,4 (16,9)	17,4	71,4	30,9	66,6	
CCR-7 (<i>n</i> = 10)						
Свежие ДК Fresh DC	6,7 (3,5)	1,1	12,3	3,8	11,8	Свежие/Крио (t <0,7) Fresh/Cryo (t <0.7) Свежие/Крио 2 (t <0,7) Fresh/Cryo 2 (t <0.7) Крио/Крио 2 (t <0,8) Cryo/Cryo 2 (t <0.8)
Крио ДК Cryopreserved DC	6,5 (2,8)	1,9	11,1	4,1	10,6	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	6,4 (1,9)	3,2	9,5	4,5	9,1	

популяции Т-лимфоцитов (рис. 3). Объединенные данные экспериментов приведены в табл. 3, разница в пролиферативной активности в группах со свежими и криоконсервированными ДК была статистически недостоверна, тогда как повторная криоконсервация приводила к снижению пролиферации Т-лимфоцитов.

Исследование свойств дендритных клеток после длительного хранения

В исследование были включены невостробованные образцы дендритноклеточных вакцин больных меланомой, которые хранились в жидком азоте более 10 лет. Так как образцов было всего 4, то статистическая обработка полученных результатов была

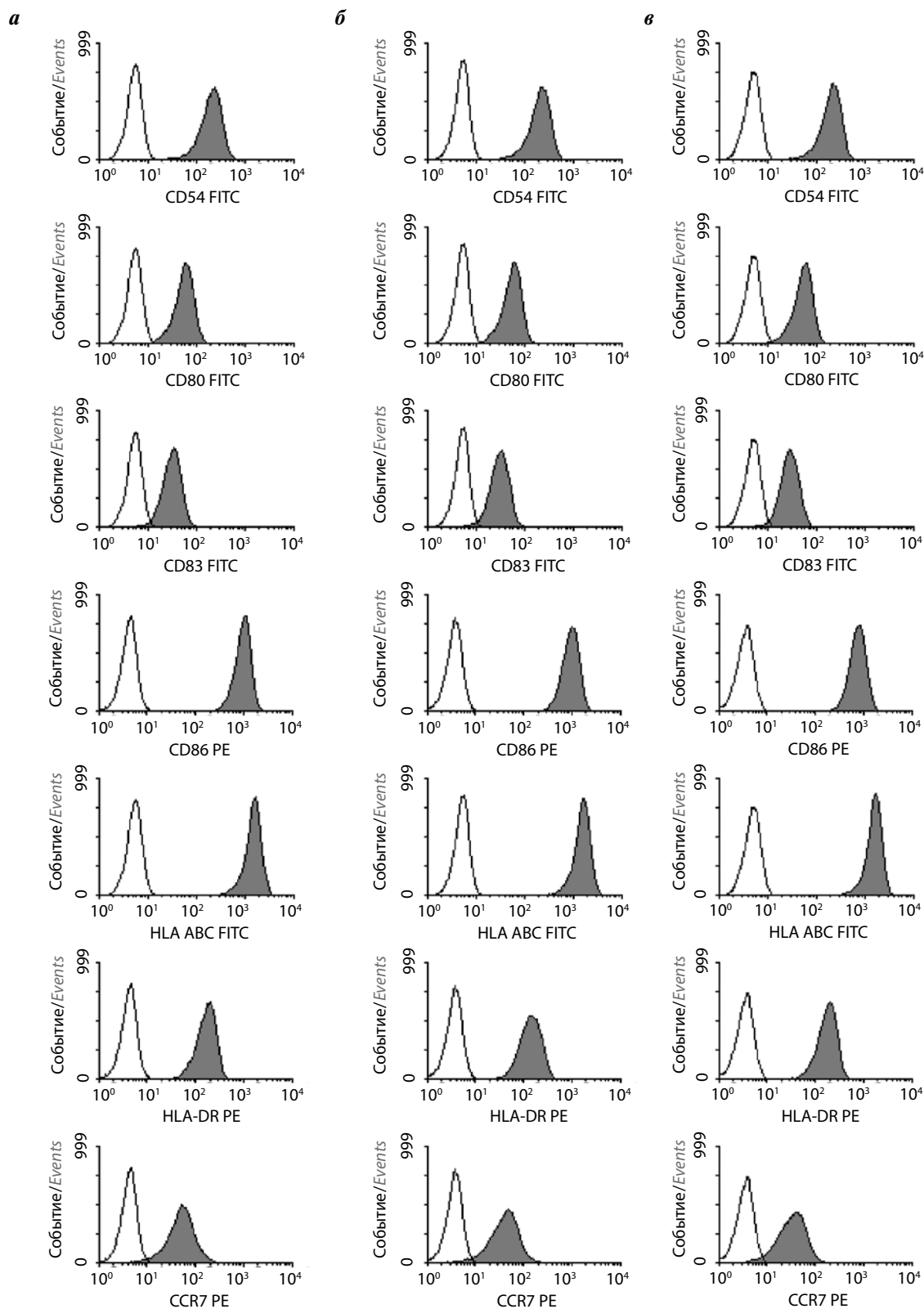


Рис. 2. Исследование экспрессии антигенов на зрелых ДК методом проточной цитометрии. Гистограммы серого цвета — исследуемые антигены, прозрачные гистограммы с черной линией — изотипические контроли. По оси абсцисс — интенсивность свечения клеток, по оси ординат — количество событий: а — свежие ДК; б — криоконсервированные ДК; в — повторно криоконсервированные ДК

Fig. 2. Flow cytometry analysis of antigen expression on mature DC. Grey histograms — examined antigens, clear histograms with bold line — isotypic controls. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events: a — fresh DC; б — cryopreserved DC; в — re-cryopreserved DC

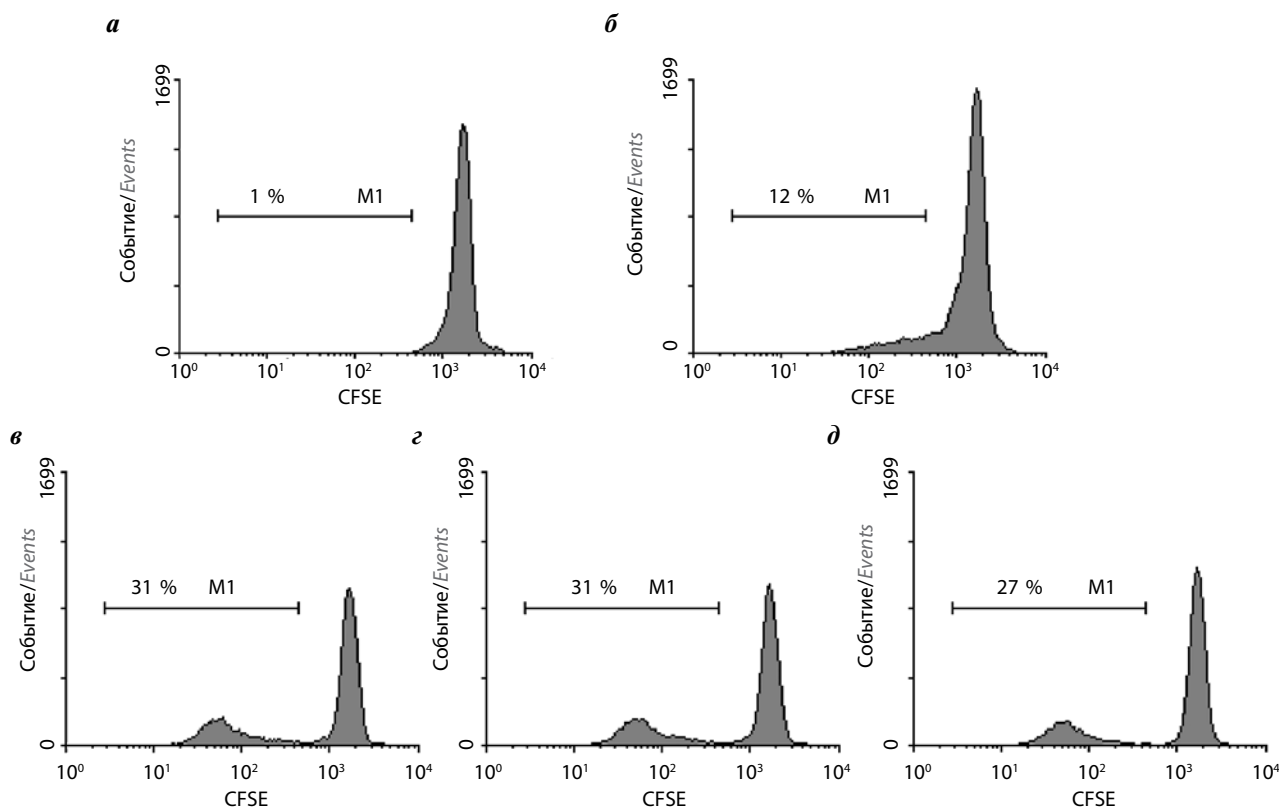


Рис. 3. Исследование аллогенной стимуляции T-лимфоцитов зрелыми ДК методом проточной цитометрии. По оси абсцисс — интенсивность свечения клеток, по оси ординат — количество событий. Маркер определяет процент поделившихся клеток: а — контроль 1 (лимфоциты без добавления ДК); б — контроль 2 (лимфоциты + интерлейкин-2); в — лимфоциты + свежие ДК; г — лимфоциты + криоконсервированные ДК; д — лимфоциты + повторно криоконсервированные ДК

Fig. 3. Flow cytometry analysis of allogenic T-lymphocyte stimulation by mature dendritic cells. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events. Marker determines the percentage of proliferated cells: а — control 1 (lymphocytes w/o DC); б — control 2 (lymphocytes + interleukin-2); в — lymphocytes + fresh DC; г — lymphocytes + cryopreserved DC; д — lymphocytes + re-cryopreserved DC

Таблица 3. Сравнение пролиферативной активности T-лимфоцитов после аллогенной стимуляции зрелыми ДК до и после криоконсервации
Table 3. Comparison of proliferation of T-lymphocytes after allogenic stimulation by mature DC

CFSE (n = 10)	Количество поделившихся клеток (%) $\bar{X}$ (S) Number of cells (%) of $\bar{X}$ (S)	95 % доверительный интервал для среднего 95 % confidence interval		Мин. Min.	Макс. Max.	Значение разницы, t Significance, t
		Нижняя граница Lower bound	Верхняя граница Upper bound			
Контроль 1 (без ДК) The control 1 (without DC)	1,3 (0,4)	1,02	1,6	1,0	2,00	Контроль 1/Свежие (t < 0,001) The control 1/Fresh (t < 0,001) Контроль 2/Свежие (t < 0,001) The control 2/Fresh (t < 0,001) Свежие/Крио (t < 1,0) Fresh/Cryo (t < 10) Свежие/Крио 2 (t < 0,001) Fresh/Cryo 2 (t < 0,001) Крио/Крио 2 (t < 0,001) Cryo/Cryo 2 (t < 0,001)
Контроль 2 (интерлейкин-2) The control 2 (interleukin-2)	13,3 (2,05)	12,02	14,6	10,0	16,0	
Свежие ДК Fresh DC	32,6 (2,05)	31,3	33,9	30,0	36,0	
Крио ДК Cryopreserved DC	32,6 (1,9)	31,4	33,9	30,0	35,0	
Повторно крио ДК Repeatedly cryopreserved DC	26,3 (1,5)	25,3	27,3	24,0	28,0	

невозможна. В этом исследовании после разморозки определяли жизнеспособность ДК и экспрессию основных поверхностных антигенов. Несмотря на длительное хранение, размороженные ДК сохраняли свою жизнеспособность и экспрессию антигенов (рис. 4).

В НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2003 г. ведутся клинические исследования по вакцинотерапии ДК онкологических больных [10, 11]. Первоначально, когда число больных было небольшим, вакцинацию проводили свежими ДК. Впоследствии

в связи с увеличением числа пациентов ДК стали подвергать криоконсервации и хранить в жидком азоте до момента их использования. Отличительной реакцией организма на введение ДК является гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) в местах введения клеток (рис. 5). Это реакция, характеризующая развитие клеточного иммунного ответа на антигены, которыми были «нагружены» ДК. Криоконсервированные ДК размораживали, разводили изотоническим раствором и вводили внутривенно больному. Как свежие, так и криоконсервированные

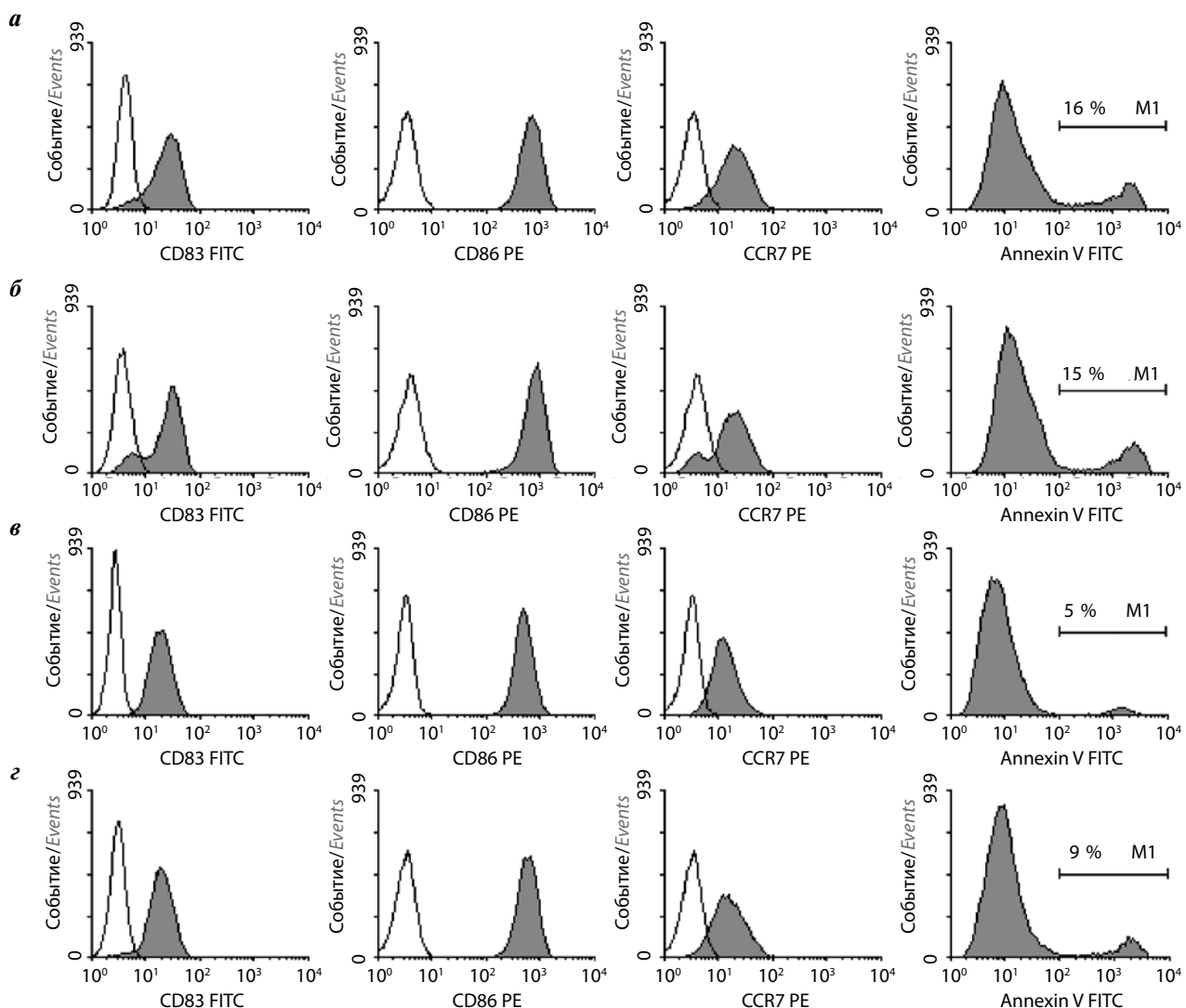


Рис. 4. Исследование экспрессии антигенов и жизнеспособности зрелых ДК после длительного (более 10 лет) хранения в жидком азоте. По оси абсцисс — интенсивность свечения клеток, по оси ординат — количество событий. Гистограммы серого цвета — исследуемые антигены, прозрачные гистограммы с черной линией — изотипические контроли. Маркер определяет процент мертвых клеток, связавших Annexin V: а — ДК больного Ю.М. М. (12 лет в жидком азоте); б — ДК больной К.Е. А. (11 лет в жидком азоте); в — ДК больной К.М. В. (10 лет в жидком азоте); г — ДК больной Н.А. А. (11 лет в жидком азоте)

Fig. 4. Flow cytometry analysis of antigen expression and viability of mature dendritic cells after more than 10 years storage in liquid nitrogen. X axis shows the intensity of fluorescence, Y axis shows the number of events. Grey histograms — examined antigens, clear histograms with bold line — isotypic controls. Marker determines the percentage of dead cells that have bound Annexin V: а — DC of patient Yu.M. M. (12 years in liquid nitrogen); б — DC of patient K.E. A. (11 years in liquid nitrogen); в — DC of patient K.M. V. (10 years in liquid nitrogen); г — DC of patient N.A. A. (11 years in liquid nitrogen)



Рис. 5. Реакция гиперчувствительности замедленного типа у больного Д.М.И. (нейробластома) в местах введения дендритноклеточной вакцины

Fig. 5. Delayed type hypersensitivity reaction of patient D.M.I. with neuroblastoma after injection of dendritic cell vaccine

ДК вызывали аналогичные иммунные реакции у пациентов и формировали противоопухолевый иммунный ответ.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют об эффективности предложенного способа криоконсервации ДК. Помимо высоких показателей жизнеспособности и сохранения основных функций дендритных клеток, наш метод демонстрирует удобство для клинического применения, так как после разморозки

достаточно развести клетки нужным раствором и ввести их больному. Наш многолетний опыт клинического применения дендритноклеточных вакцин позволяет утверждать, что данный способ криоконсервации ДК сохраняет иммуностимулирующие способности ДК даже после длительного хранения и повторной криоконсервации. В состав замораживающей среды входят только стандартные соединения, такие как полиглюкин и ДМСО. Если сыворотка крови, которую часто используют как компонент замораживающей среды, отличается от партии к партии, а также может быть контаминирована вирусами, то полиглюкин лишен этих недостатков. Кроме того, следует отметить, что криоконсервация в парах жидкого азота надежнее, чем использование низкотемпературного морозильника или программного замораживателя, так как не зависит от электрического тока. В нашем случае низкое содержание ДМСО (всего 5 %) также дает преимущество, а именно снижает токсический эффект на клетки и позволяет после разморозки не отмывать их, а только развести буфером и сразу ввести пациенту. Таким образом, описанный способ криоконсервации ДК эффективен и надежен, а состав замораживающей среды стандартен, физиологичен и не требует отмывки после разморозки, что сводит к минимуму количество манипуляций, следующих после разморозки клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- John J., Hutchinson J., Dalglish A., Pandha H. Cryopreservation of immature monocyte-derived dendritic cells results in enhanced cell maturation but reduced endocytic activity and efficiency of adenoviral transduction. *J Immunol Methods* 2003;272:35. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00430-1.
- Thumann P., Moc I., Humrich J. et al. Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* 2003;277(1–2):1–16. DOI: 10.1016/S0022-1759(03)00102-9.
- Zobywalski A., Javorovic M., Frankenberger B. et al. Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J Transl Med* 2007;5:18. DOI: 10.1186/1479-5876-5-18.
- Sundarasetty B., Kloess S., Oberschmidt O. et al. Generation of lentivirus-induced dendritic cells under GMP-compliant conditions for adaptive immune reconstitution against cytomegalovirus after stem cell transplantation. *J Trans Med* 2015;13:240. DOI: 10.1186/s12967-015-0599-5.
- Nava S., Lisini D., Pogliani S. et al. Safe and reproducible preparation of functional dendritic cells for immunotherapy in glioblastoma patients. *Stem Cells Transl Med* 2015;4:1164–72. DOI: 10.5966/sctm.2015-0091.
- Ponsaerts P., van Tendeloo V., Cools N. et al. mRNA-electroporated mature dendritic cells retain transgene expression, phenotypic properties and stimulatory capacity after cryopreservation. *Leukemia* 2002;16:1324–30. DOI: 10.1038/sj.leu.2402511.
- Zhou Q., Zhang Y., Zhao M. et al. Mature dendritic cell derived from cryopreserved immature dendritic cell shows impaired homing ability and reduced anti-viral therapeutic effects. *Sci Rep* 2016;6:39071. DOI: 10.1038/srep39071.
- Петенко Н.Н., Михайлова И.Н., Чкадуа Г.З. и др. Вакциноterapia меланомы кожи дендритными клетками после хирургического лечения. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2015;1:43–9. [Petenko N.N., Mikhailova I.N., Chkadua G.Z. et al. Dendritic cell vaccine therapy of cutaneous melanoma after the radical surgery. *Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Bones and Soft Tissue Sarcomas and Skin Tumors* 2015;1:43–9. (In Russ.)].
- Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н., Буркова А.А. и др. Адаптивное методика культивирования дендритных клеток человека из моноцитов периферической крови для клинического применения. Российский биотерапевтический журнал 2002;3:56. [Chkadua G.Z., Zabolina T.N., Burkova A.A. et al. The adaptation of method of generation monocyte derived human dendritic cells for clinical practice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2002;3:56. (In Russ.)].
- Долгополов И.С., Чкадуа Г.З., Менткевич Г.Л. Роль и место иммунотерапии в детской онкологии: некоторые клинические примеры. Иммунология гемопоза 2015;13(1):63. [Dolgoplov I.S., Chkadua G.Z., Mentkevich G.L. Does immunotherapy play role

in the treatment of pediatric cancer: some clinical observation. *Immunologiya gemopoeza* = *Haemotopoiesis Immunology* 2015;13(1):63. (In Russ.).

11. Самойленко И.В., Заботина Т.Н., Михайлова И.Н. и др. Дендритноклеточная вакцина в комбинации с химиотерапией в лечении диссемини-

рованной меланомы кожи: окончательные результаты одноцентрового рандомизированного контролируемого исследования II фазы. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2016;27(2):119. [Samoilenko I.V., Zabolotina T.N., Mikhailova I.N. et al. Dendritno-

kletchnaya vaccine in combination with chemotherapy in the treatment of disseminated melanoma: final results of phase II. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN* = *Vestnik N.N. Blokhin RCRC* 2016;27(2):119. (In Russ.).

Вклад авторов

Г.З. Чкадуа: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
А.А. Борунова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
И.Б. Шоуа: анализ полученных данных;
И.С. Долгополов: получение данных для анализа, написание текста рукописи;
Р.И. Пименов, И.Н. Михайлова, Т.Н. Заботина: получение данных для анализа;
М.А. Барышникова: обзор публикаций по теме статьи.

Authors' contributions

G.Z. Chkadua: developing the research design; obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;
A.A. Borunova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
I.B. Shoua: analysis of the obtained data;
I.S. Dolgoplov: obtaining data for analysis, article writing;
R.I. Pimenov, I.N. Mikhailova, T.N. Zabolotina: obtaining data for analysis;
M.A. Baryshnikova: reviewing of publications of the article's theme.

ORCID авторов/ORCID of authors

Г.З. Чкадуа/G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-1416-0545>
А.А. Борунова/A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
И.Б. Шоуа/I.B. Shoua: <https://orcid.org/0000-0002-9488-4710>
И.С. Долгополов/I.S. Dolgoplov: <https://orcid.org/0000-0001-9777-1220>
Р.И. Пименов/R.I. Pimenov: <https://orcid.org/0000-0002-5913-3604>
И.Н. Михайлова/I.N. Mikhailova: <https://orcid.org/0000-0002-7659-6045>
Т.Н. Заботина/T.N. Zabolotina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 16.09.2019. Принята в печать: 18.09.2019.

Article submitted: 16.09.2019. Accepted for publication: 18.09.2019.

ОЦЕНКА ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ СИНТЕТИЧЕСКИХ НЕОАНТИГЕННЫХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ МОДЕЛИ ПРОТИВОМЕЛАНОМНОЙ ВАКЦИНЫ

М.А. Барышникова, А.А. Рудакова, З.С. Соколова, О.С. Бурова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_ba@mail.ru

Введение. Персонализированная вакциноterapia, направленная на усиление распознавания иммунной системой мутантных неоантигенов опухоли, является перспективным подходом к лечению некоторых видов злокачественных новообразований.

Цель исследования — оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов и адъюванта Poly(I:C) на модели мышиной меланомы B16F10.

Материалы и методы. Исследовали 43 мутантных неоантигенных синтетических пептида, ранее отобранных в качестве иммуногенных на основе результатов секвенирования меланомы B16F10 с помощью биоинформатического анализа. Исследование проводили на мышах C57Bl/6J с подкожно перевитой меланомой B16F10 после 2-кратной вакцинации группами пептидов с адъювантом Poly(I:C) и без него. Оценку иммуногенности пептидов проводили методом ELISpot по определению количества клеток, продуцирующих интерферон γ (ИФН- γ). Противоопухолевую активность оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни мышей.

Результаты. Количество ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки мышей, ранее иммунизированных группами пептидов в сочетании с адъювантом, в ответ на *in vitro*-стимуляцию пептидами, входившими в состав модельной вакцины, увеличивалось. В группах мышей, иммунизированных пептидами без адъюванта, количество ИФН- γ -продуцирующих клеток *in vitro* не менялось по сравнению с группой контроля как при добавлении пептидов, входивших в состав вакцины, так и при добавлении пептидов из других групп. Двукратная вакцинация пептидами с адъювантом вызывала в ряде случаев выраженный противоопухолевый эффект: 3 из исследованных 8 групп пептидов с адъювантом вызывали значимое торможение роста опухоли и увеличение продолжительности жизни мышей.

Выводы. Таким образом, показано, что вакцинация мышей пептидами в сочетании с адъювантом Poly(I:C) вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа во всех исследованных группах, однако увеличение количества ИФН- γ -продуцирующих клеток не является показателем противоопухолевой эффективности.

Ключевые слова: неоантиген, меланома, синтетические пептиды, противоопухолевая вакцина

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81

EVALUATION OF THE ANTITUMOR EFFICACY OF SYNTHETIC NEOANTIGEN PEPTIDES FOR THE MELANOMA VACCINE MODEL

M.A. Baryshnikova, A.A. Rudakova, Z.A. Sokolova, O.S. Burova, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov

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

Introduction. Personalized vaccine therapy that stimulates immune system to recognize mutant tumor neoantigens is one of the promising approaches of cancer treatment.

Objective. Evaluation of immunogenicity and antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides and Poly(I:C) adjuvant against murine melanoma B16F10.

Materials and methods. 43 synthetic mutant neoantigen peptides selected earlier according to the bioinformatics analysis of the results of melanoma B16F10 sequencing were investigated. The study was performed in mice C57Bl/6J with subcutaneously transplanted melanoma B16F10 after double vaccination by peptide groups with or without adjuvant poly(I:C). Immunogenicity of peptides was evaluated by ELISPOT that detected the number of interferon-gamma producing cells. Antitumor activity was evaluated on the base of tumor growth inhibition and the increase of the survival rate.

Results. The number of interferon-gamma producing cells increased after *in vitro* stimulation by the peptides of the model vaccine in the group of mice which had been vaccinated by these peptides with the adjuvant. The number of interferon-gamma producing cells *in vitro* did not change after addition of vaccine peptides or any other peptides in the groups of mice that had been vaccinated by the peptides without the adjuvant as compared to the control group. Double vaccination by the peptides with the adjuvant induced a potent antitumor effect in some

cases, three of the eight groups of the peptides with the adjuvant induced significant inhibition of tumor growth and the increase of survival rate in mice.

Conclusion. Thereby, it was shown that vaccination of mice by peptides in combination with adjuvant poly(I:C) stimulated the cell immunity response, however, the increase of the number of interferon-gamma producing cells is not an indicator of the antitumor efficacy of neoantigen peptides.

Key words: neoantigens, melanoma, synthetic peptides, antitumor vaccine

Введение

Одним из новых эффективных экспериментальных подходов к иммунотерапии опухолей является персонализированная вакциноterapia, направленная на усиление распознавания иммунной системой мутантных неоантигенов опухоли [1]. Персонализированные противоопухолевые вакцины создаются из химически синтезированных опухолевых неоантигенных пептидов, отобранных в результате биоинформатического прогнозирования иммуногенности, и адъюванта [2, 3].

В нашей предыдущей работе с помощью разработанного биоинформатического подхода для анализа данных секвенирования нового поколения были предсказаны пептиды, способные вызывать иммунный ответ на модели мышинной меланомы B16F10 [4].

Цель настоящего исследования — оценка иммуногенности и противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов и адъюванта Poly(I:C) на модели мышинной меланомы B16F10.

Материалы и методы

По результатам биоинформатического анализа были синтезированы 43 пептида длиной от 22 до 30 аминокислот (табл. 1) [4]. Пептиды были охарактеризованы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрически, степень чистоты каждого пептида после очистки с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии составила не менее 85 %.

Для оценки противоопухолевого эффекта пептиды разделили на группы, каждая из которых включала 5 или 6 пептидов (табл. 2). Пептиды растворяли в физиологическом растворе (ПанЭко) или диметилсульфоксиде (ДМСО) (ПанЭко) до концентрации 10 мг/мл, мышам вводили по 100 мкг каждого пептида из группы, — таким образом, суммарно 1 доза включала в себя 500 или 600 мкг пептидов в физиологическом растворе или 10 % растворе ДМСО.

Исследовали эффективность пептидов, введенных с адъювантом (Poly(I: C) (Sigma) — 50 мкг на мышь в 200 мкл физраствора) и без адъюванта, а также адъюванта без пептидов. В контрольной группе мыши не получали никакого воздействия.

Иммунизировали мышей линии C57Bl/6J массой 20–22 г, полученных из отделения лабораторных

животных Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. В каждой группе было 8 мышей. Исследуемые модели вакцин вводили подкожно (в складку кожи на левом боку мыши по направлению к передней лапке). В группах «пептиды с адъювантом» poly(I:C) вводили подкожно за 5 мин до введения пептидов в то же самое место (складку кожи на левом боку). Иммунизация проводилась в 0-й и 7-й дни.

На 12-й день после 1-й инъекции 3 мышей из каждой группы забивали, извлекали сыворотку и спленомиты для иммунологических тестов. Оставшимся 5 мышам из каждой группы на 12-й день в правый бок перевивали по 75 тыс. клеток меланомы мыши линии B16F10 в 500 мкл среды 199.

Иммуногенность пептидов с адъювантом, пептидов без адъюванта и адъюванта оценивали по определению количества клеток, продуцирующих интерферон γ (ИФН- γ), методом ELISpot согласно инструкции к набору для определения мышинного INF- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech). Клетки селезенки мышей инкубировали 48 ч с группами пептидов, которыми до этого иммунизировали. В качестве положительного контроля использовали адъювант Poly(I:C), он неспецифически увеличивал число клеток, продуцирующих ИФН- γ . Для подтверждения специфичности клеточного иммунного ответа в одну лунку с клетками селезенки мышей, иммунизированных одной группой пептидов, добавляли пептиды этой группы, а в другую лунку — пептиды другой группы, которую не использовали для иммунизации этой мыши.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили торможение роста опухоли (ТРО) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ) подопытных мышей по сравнению с животными контрольной группы. Путем измерений длины, ширины и высоты опухолевого узла вычисляли объем (V) опухоли у каждого животного, а затем — средний объем опухоли в группе. Объем опухолей измеряли 2–3 раза в неделю. Торможение роста опухоли вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО (\%)} = ((V_k - V_0) : V_k) \times 100,$$

где V_k — средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3), V_0 — средний объем опухолей в подопытной группе (мм^3).

Таблица 1. Перечень исследуемых синтетических пептидов

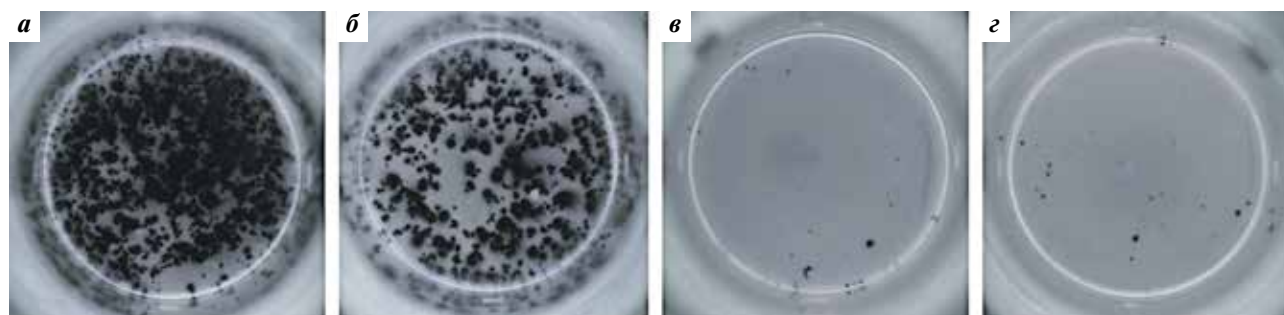
Table 1. List of investigated synthetic peptides

№	Название Name	Последовательность Sequence
1	g. 6393021C>G	SSGHVGFIFKSGKMTSIVKDSSAARNG
2	g. 109894747T>G	PITAHMYEAVAIKDH TLVNSLIRVLQ
3	g. 60246193G>T	FMFSLPNITYSVIEKKRNFLRWKTWLE
4	g. 56226589G>T	GGLAGPDGTSVFGQMFAKMSSFSPDS
5	g. 54847269G>T	PEAKYDAFLVTNMVQMYP AFKRVWTYF
6	g. 145123749C>T	WAPNENKFAVGSGFRVISICYFEQEND
7	g. 64957410G>C	GTVFISQD TVESLLAAANLLQIKLVLK
8	g. 108075690C>A	LSENISHGLLLRKAPVLHYLYYLAQIG
9	g. 155991934C>A	LVHYLRSLSEYLR AWHSEDVSLGTWLA
10	g. 69027878G>A	SGGGSKVMRGRMGSSVINEISVEEVNK
11	g. 77174891A>C	DALQEYSHNSFALQCLLNSFP GDLEFK
12	g. 66708664A>C	MRMLQNSDTLLSHMAAKCLASLLYFQL
13	g. 110327865C>T	TLHNMMKKFFLQLIAEFKRLGSSVVYA
14	g. 106886296T>A	TVYTMYPFPCMSQEFRHLLCEILPLLK
15	g. 5098048A>C	VHMAARIATLA AWGKELMEGSDLNYY
16	g. 69615465A>T	AWHTNLSRKILRMSPLLAKFHQFLVSE
17	g. 65813948T>A	GSPFPAAVILRDALHMARG LKYLHQEK
18	g. 108814677G>C	MQTD TQDHQNL CYSALVLAMVFSMGEA
19	g. 116820833G>C	AGYRGSFLAGFRPLPCTPGPGWVSHVD
20	g. 45553003G>T	ALLYFTGSANFNRS MRALAKTKGMSLS
21	g. 58476516A>C	RVDQKTLHNLLRKVVPSFS AEIERLNQ
22	g. 35197173T>G	VQGLLKDATGSFVLPFRHVMYAPYPTT
23	g. 105559136C>T	ASLSEAVQAAYMLRYQKCLDARSQTST
24	g. 126439132G>T	FNITADPYERVDLSSMYPGIVKKLLRR
25	g. 101573665C>G	GRISGIGSAFGSRSLYNLGGTRRVSIG
26	g. 140328678C>G	TFLCPADVTDPTTFQKILELLPSRRAD
27	g. 121734550T>C	YTETPEKIRLHLYHLNETVTITASLVS
28	g. 190937554G>A	RNV DSTCEDREDKFNFSVMSYNILSQD
29	g. 153509426A>T	LLAMRLVNEATFPLLLNCFGQPKTKW
30	g. 142664440A>G	PSQVTEMFNQGRAFAAVRLPFCGHKNI
31	g. 81419559T>A	KITTIPFTTEVFAPVTETVTVSAIP
32	g. 24108965G>C	NEEGIEELVVALTCVGGWQAPLNQNWV
33	PSKPSFQE	PSKPSFQEFVDWENVSP ELNSTDQPFL
34	REGVELCPG	REGVELCPGNKYEMRRHGTT HSLVIHD
35	g. 28894578A>C	SGLVTFQAFIDVMSRETTD TDTADQVI
36	g. 29565843C>G	VDRNPQFLDPVLAYLMKGLCEKPLASA
37	g. 65813948T>A	GSPFPAAVILRDALHMARG LKYLHQEK
38	g. 41232378A>G	PAMVCGTAFFINFIAIYHHASRAIPFG
39	g. 4007844T>G	WIPSGTTILNCFHDVLSGKLSGGSPGV
40	g. 123421534G>C	FRRKAFLHWYTGEAMDEMEFTEAESNM
41	g. 107599034A>C	LRRLVLHVVSAAQAERLARAEEAAPA
42	g. 93352588T>C	RNIEGIDKLTQLKKPFLVNNKINKIEN
43	GFSQPLRRL	GFSQPLRRLVLHVVSAAQAERLARAEE

Таблица 2. Группы пептидов, сформированные для введения животным

Table 2. Peptide groups formed for administration to animals

Группы пептидов Peptide groups							
1	2	3	4	5	6	7	8
g. 116820833	g. 110327865	g. 123421534	g. 107599034	g. 65813948	g. 10559136	g. 101573665	g. 155991934
g. 140328678	g. 126439132	g. 130452479	g. 108075690	g. 69615465	g. 106886296	g. 190937554	g. 41232378
g. 142664440	g. 4007844	g. 28894578	g. 109894747	g. 69027878	g. 108814677	g. 60246193	g. 54847269
g. 145123749	g. 6393021	g. 4553003	g. 29565843	g. 93352588	g. 121734550	g. 7163330	g. 58476516
g. 35197173	g. 64957410	g. 5098048	g. 56226589	REGVELCPG	g. 153509426	g. 77174891	g. 66708664
				GFSQPLRRL		PSKPSFQE	g. 81419559
Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	Физраствор Saline solution	ДМСО DMSO	ДМСО DMSO	ДМСО DMSO



Количество продуцирующих интерферон γ клеток селезенки мышей, ранее иммунизированных пептидами с адъювантом, после стимуляции пептидами *in vitro*: а, б — стимуляция пептидами, входившими в состав вакцины, вызывает увеличение числа клеток, продуцирующих интерферон γ ; в, г — стимуляция пептидами, не входившими в состав вакцины, не вызывает увеличения числа клеток, продуцирующих интерферон γ

The number of interferon- γ -producing spleen cells of mice, which were immunized by the peptides with the adjuvant, after *in vitro* stimulation by the peptides: а, б — increase in the number of interferon γ producing cells after *in vitro* stimulation by the peptides, which were part of the vaccine; в, г — no increase in the number of interferon γ producing cells after *in vitro* stimulation by the peptides, which were not part of the vaccine

Увеличение продолжительности жизни вычисляли после гибели всех животных в ходе опыта по формуле:

$$\text{УПЖ (\%)} = ((\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_k) : \text{СПЖ}_k) \times 100,$$

где СПЖ_к — средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ₀ — средняя продолжительность жизни животных в подопытной группе (дни).

Минимальные критерии противоопухолевой активности: ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 50 %.

Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью программы Statistica 2.0 с использованием критерия Манна—Уитни. Параметры увеличения продолжительности жизни анализировали с помощью логрангового критерия. Различия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Количество ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки мышей, ранее иммунизированных группами пептидов в сочетании с адъювантом, в ответ на *in vitro*-стимуляцию пептидами, входившими в состав модельной вакцины, увеличивалось. Тогда как при добавлении в лунки с клетками этих мышей пептидов из других групп, не входивших в состав модельной вакцины, количество ИФН- γ -продуцирующих клеток оставалось таким же, как в группе контроля (см. рисунок).

В группах мышей, иммунизированных пептидами без адъюванта, количество ИФН- γ -продуцирующих клеток *in vitro* не менялось по сравнению с группой контроля как при добавлении пептидов, входивших в состав вакцины, так и при добавлении пептидов из других групп.

Таким образом, показано, что вакцинация мышей пептидами в сочетании с адъювантом Poly(I:C)

Таблица 3. Противоопухолевый эффект моделей пептидной вакцины

Table 3. Antitumor efficacy of peptide vaccine models

Группы пептидов Peptide groups	Торможение роста опухоли, % Tumor growth inhibition, %				Увеличение продолжительности жизни, % Increase of survival rate, %
	Сутки Day				
	18	23	27	32	
Poly (I:C)	67	7	0	0	27
1	0	0	0	0	7
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	16	0	0	0	3
5	82	34	0	0	18
6	100	91	71	26	19
7	88	68	35	25	58
8	37	20	0	0	14
1 + Poly (I: C)	64	0	0	0	10
2 + Poly (I: C)	0	0	0	0	3
3 + Poly (I: C)	0	0	00	0	0
4 + Poly (I: C)	100*	100*	98*	71*	60*
5 + Poly (I: C)	95	76*	69*	34	40
6 + Poly (I: C)	95*	40*	44	0	35
7 + Poly (I: C)	100*	100*	97*	92*	67* 2 из 5 мышей живы >90 дней
8 + Poly (I: C)	97	69	62	52	67*

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.* $p < 0,05$ in relation to control.

вызывает специфическую стимуляцию клеточного иммунного ответа.

Результаты оценки противоопухолевого эффекта исследуемых моделей вакцины после 2-кратной вакцинации представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что пептиды групп 1–3 не обладали противоопухолевым эффектом, возможно, это связано с недостаточной растворимостью их в физрастворе и, как следствие, сниженной биодоступностью.

Эффект пептидов значительно усиливался при использовании адъюванта Poly(I:C), самого по себе обладающего противоопухолевой активностью, но менее выраженной, чем при комбинации с пептидами.

Модель вакцины 7 + Poly(I:C) обладает выраженным противоопухолевым эффектом. «Пептиды 7» без адъюванта, в отличие от других групп пептидов без

адъювантов, у которых эффект незначительный или отсутствует, увеличивали продолжительность жизни мышей примерно на 58 %.

Заключение

Вакцинация мышей синтетическими неоантигенными пептидами в сочетании с адъювантом Poly (I:C) вызывает стимуляцию клеточного иммунного ответа, выражающуюся в увеличении количества ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки. Однако не во всех случаях наблюдаемая стимуляция клеточного иммунитета приводила к развитию противоопухолевого ответа. Пептиды, проявившие выраженную противоопухолевую эффективность, будут использованы как модель для более углубленного изучения персонализированной пептидной неоантигенной вакцины против меланомы B16F10.

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: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):6–14. (In Russ.)].
2. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the mutanome for tumor vaccination. Cancer Res 2012;72(5):1081–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722.
3. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. Nature 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991.
4. Косоруков В.С., Барышникова М.А., Кособокова Е.Н. и др. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(3):23–30. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30. [Kosorukov V.S., Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N. et al. Identification of immunogenic mutant neoantigens in the genome of murine melanoma Rossiysky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(3):23–30. (In Russ.)].

Вклад авторов

М.А. Барышникова: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;

А.А. Рудакова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

З.А. Соколова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

О.С. Бурова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

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

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

Author's contributions:

M.A. Baryshnikova: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;

A.A. Rudakova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

Z.A. Sokolova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

O.S. Burova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

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

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

ORCID авторов/ORCID of authors

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

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

З.А. Соколова/Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

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

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

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

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: 03.09.2019. Принята в печать: 15.10.2019.

Article submitted: 03.09.2019. Accepted for publication: 15.10.2019.

УВЕЛИЧЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА NKT-КЛЕТОК – МАРКЕР РАННЕГО ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ПРИ АДЬЮВАНТНОЙ ВАКЦИНОТЕРАПИИ ПАЦИЕНТОВ С МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ МЕЛАНОМОЙ КОЖИ

А.А. Борунова, Г.З. Чкадуа, Т.Н. Заботина, З.Г. Кадагидзе, О.В. Короткова, А.И. Черткова, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, Н.Н. Петенко, Л.В. Демидов, И.Н. Михайлова

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

Контакты: Анна Анатольевна Борунова Vorunova-a@yandex.ru

Введение. Натуральные киллерные Т-лимфоциты (NKT) занимают промежуточное положение между врожденным и приобретенным иммунным ответом. Способность этих клеток как активировать противоопухолевый иммунный ответ, так и угнетать иммунологическую активность делает их мишенью исследования у онкологических больных. Радикальность хирургического лечения больных метастатической меланомой III–IV стадии относительно условна. В связи с этим возможности адъювантной эффективной терапии меланомы активно исследуются во всем мире.

Цель исследования — изучение информативной значимости увеличения количества NKT-клеток периферической крови больных метастатической меланомой кожи после радикального хирургического удаления опухоли, получавших в адъювантном режиме противоопухолевую аутологичную дендритно-клеточную вакцинотерапию.

Материалы и методы. В исследование включены 39 больных метастатической меланомой кожи III и IV стадий после радикального хирургического вмешательства. Из моноцитов периферической крови каждого пациента создавалась аутологичная вакцина зрелых дендритных клеток, нагруженных опухолевым лизатом. Терапия продолжалась до объективного прогрессирования. В исследование вошли пациенты, получившие от 5 до 120 введений. Время наблюдения за больными составило от 5 до 168 мес.

Результаты. Показано, что у 14 (36 %) больных исходное количество NKT-клеток превышало норму (0–10 %), и в процессе вакцинотерапии у них было отмечено прогрессирование заболевания в период до 2 лет. У больных с безрецидивным течением заболевания при вакцинотерапии ($n = 13$) количество NKT-лимфоцитов не превышало нормы как до, так и в процессе терапии. Выявлено достоверно меньшее время до прогрессирования у пациентов с высоким исходным содержанием NKT-лимфоцитов по сравнению с пациентами с нормальными показателями NKT-клеток (6,5 мес, 95 % доверительный интервал — 2,4–10,7 %, vs 96,2 мес, 95 % доверительный интервал — 63,8–128,6 %).

Заключение. Увеличенное количество NKT-клеток у пациентов с метастатической меланомой кожи III и IV стадии после радикального хирургического лечения является маркером раннего прогрессирования.

Ключевые слова: NKT-клетки, адъювантная иммунотерапия, вакцинотерапия, меланома

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-82-89

INCREASE IN NKT CELLS – A MARKER OF EARLY PROGRESSING AT ADJUVANT VACCINOTHERAPY OF PATIENTS WITH A METASTATIC MELANOMA OF SKIN

A.A. Borunova, G.Z. Chkadua, T.N. Zabolina, Z.G. Kadagidze, O.V. Korotkova, A.I. Chertkova, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova, E.K. Shoua, N.N. Petenko, L.V. Demidov, I.N. Mikhailova

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

Introduction. Natural killer T lymphocytes (NKT) take place between the innate and acquired immune response. The ability of these cells to activate the antitumor immune response and inhibit immunological activity makes them the target of research in cancer patients. The radicality of surgical treatment of patients with metastatic melanoma (stage III–IV) is relatively conventional. In this regard, the possibility of adjuvant effective therapy of melanoma is actively investigated worldwide.

The aim of the study is investigation of the importance of increasing the number of NKT cells in the peripheral blood of patients with metastatic melanoma after radical surgical removal of the tumor. Patients were treated with adjuvant regimen antitumor autologous dendritic cell therapy in form of vaccination.

Materials and methods. The study included 39 patients with stage III and IV metastatic melanoma with regional and/or distant metastases after radical surgery. From the peripheral blood monocytes of each patient, an autologous vaccine was created from mature dendritic cells loaded with tumor lysate. The therapy continued until objective progression. The study included patients who received from 5 to 120 injections. The follow-up period ranged from 5 to 168 months.

Results. It was shown that 14 (36 %) of patients had the number of NKT cells exceeding the norm (0–10 %) and in the course of vaccine therapy they had the progression of the disease in the period up to 2 years. In patients with relapse-free course of the disease in vaccine therapy ($n = 13$), the number of NKT lymphocytes did not exceed the norm both before and during therapy. Significantly shorter time to progression was revealed in patients with high initial content of NKT lymphocytes compared with patients with normal indices of NKT cells (6.5 months) — 95 % confidence limit 2,4–10,7 % vs 96,2 months (95 % confidence limit 63,8–128,6 %).

Conclusion. An increased number of NKT cells in patients with stage III–IV metastatic melanoma after radical surgical treatment is a marker of early progression.

Key words: NKT cells, adjuvant immunotherapy, vaccinotherapy, melanoma

Введение

Натуральные Т-клетки-киллеры (NKT) представляют собой популяцию Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+CD16^+CD56^+$, обладающих свойствами как натуральных киллерных (NK), так и Т-клеток. Эта популяция лимфоцитов имеет особый путь клеточной дифференцировки в структуре Т-лимфоцитов и может обладать фенотипом $CD4^+CD8^-$, $CD4^-CD8^+$ или $CD4^-CD8^-$. NKT-клетки занимают нишу между врожденным и приобретенным иммунным ответом, обеспечивая связь механизмов естественной резистентности и специфической иммунной реактивности. Выделяют 2 типа NKT-клеток: инвариантные (NKT-клетки I типа, или iNKT-клетки), экспрессирующие только 1 вид Т-клеточного рецептора (TCR) α -цепи (Va24JaQ TCR α), и вариабельные (NKT-клетки II типа) — гетерогенная популяция NKT-клеток, экспрессирующая различные TCR α -цепи.

NKT-клетки способны синтезировать большой диапазон цитокинов, позволяющий им модулировать иммунный ответ при различных заболеваниях, включая рак, аутоиммунные заболевания, инфекции, аллергии, отторжение трансплантата и реакции трансплантата против хозяина [1, 2]. Такая разнонаправленность действия NKT-клеток обусловлена функциональной гетерогенностью их субпопуляций, которая не зависит от фенотипа (инвариантные или вариабельные) клеток. Функциональную активность NKT-клеток и их роль в регулировании иммунного ответа определяет тип синтезируемых цитокинов. Единого понимания, каким образом NKT-клетки выбирают тип секретируемых цитокинов, на сегодня нет [3]. Способность этих клеток активировать противоопухолевый иммунный ответ, а также угнетать иммунологическую активность привлекает интерес ученых к NKT-лимфоцитам и как к модели клеточной терапии, и как к критерию прогноза заболевания [4]. Так, известно, что количество NKT-лимфоцитов в периферической крови увеличивается при острых тяжелых воспалительных процессах, и часто такое увеличение сопровождается снижением количества В-клеток и $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперных лимфоцитов, а отсутствие

восстановления нормального количества показателей является свидетельством перехода воспаления в хроническую форму [5].

Меланома кожи отличается агрессивным течением, ранним метастазированием и тенденцией к постоянному росту. Основным методом терапии меланомы на сегодняшний день остается хирургическое лечение. Радикальность хирургического лечения больных метастатической меланомой III–IV стадии относительно условна из-за наличия субклинических метастазов, а скрытая диссеминация опухоли может происходить на любой стадии. В связи с этим возможности адъювантной эффективной терапии меланомы активно исследуются во всем мире [6].

Вакциноterapia аутологичными дендритными клетками (ДК), нагруженными опухолевым лизатом, — модель полностью персонализированной иммунотерапии. Эффективность вакцинотерапии меланомы при наличии клинически определяемых опухолевых очагов сопоставима с эффективностью химиотерапии, но при этом не имеет токсичности [7]. В клинических рекомендациях до 2017 г. больным меланомой III и IV стадии после хирургического лечения в качестве адъювантной терапии предлагалась иммунотерапия интерферонами, и только в редакции 2018 г. появилась рекомендация о применении в адъювантном режиме блокаторов PD1 (по решению врачебной комиссии), а при наличии BRAF-мутации — таргетных препаратов ингибиторов BRAF [8, 9]. В данной статье представлены результаты исследования адъювантной вакцинотерапии пациентов с метастатической меланомой III и IV стадии после хирургического лечения, проводившегося в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина (НМИЦ им. Н.Н. Блохина) с 2002 по 2018 г. В качестве значимого иммунологического критерия рассмотрена популяция NKT-клеток, способных проявлять как проопухолевую, так и противоопухолевую активность.

Цель исследования — изучение информативной значимости увеличения количества NKT-клеток

периферической крови больных метастатической меланомой кожи после радикального хирургического удаления опухоли, получавших в адъювантном режиме противоопухолевую аутологичную дендритно-клеточную вакцилотерапию.

Материалы и методы

В исследование были включены 39 больных метастатической меланомой кожи III и IV стадии с регионарными и/или отдаленными метастазами после радикального хирургического вмешательства, получавших лечение в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина с 2002 по 2018 г. Это были мужчины ($n = 19$) и женщины ($n = 20$) в возрасте от 24 до 75 лет (средний возраст — 52 года).

Из моноцитов периферической крови каждого пациента создавали аутологичную вакцину на основе зрелых ДК, нагруженных опухолевым лизатом. Фенотип зрелых ДК для каждой вакцины оценивали методом проточной цитометрии ($CD80^+$, $CD86^+$, $HLA-DR^+$, $CD83^+$ и $CCR7^+ > 70\%$, живых клеток $> 80\%$). Разовая доза ДК составляла $2-5 \times 10^6$ в 1 мл фосфатно-солевого буфера.

Вакцилотерапию проводили амбулаторно, она включала в себя вводную фазу (4 вакцинации

с интервалом 2 нед) и поддерживающую (введение каждые 4 нед в течение 2 лет, затем интервал увеличивали до 3–6 мес). Терапия продолжалась до объективного прогрессирования. В исследование были включены пациенты, получившие от 5 до 120 введений. Время наблюдения за больными составило от 5 до 168 мес. Прогрессирование на фоне проводимой терапии отмечено у 26 (67 %) из 39 больных.

Для оценки фенотипа NKT-лимфоцитов клетки периферической крови больных окрашивали моноклональными антителами к $CD45$, $CD3$, $CD16$, $CD56$ и изотипическими контролями, меченными флуорохромами FITC, PE, PE-Cy5. Анализ $CD45^+CD3^+CD16^+CD56^+$ -NKT-клеток проводили методом проточной цитометрии (BD FACSCalibur™).

Статистический анализ данных проводили с использованием пакета статистических программ SPSS 17.0, значения считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Выживаемость анализировали в соответствии с методом Каплана–Майера и сравнивали с помощью логранг-теста.

Результаты

По продолжительности вакцилотерапии больных разделили на 3 группы (рис. 1).

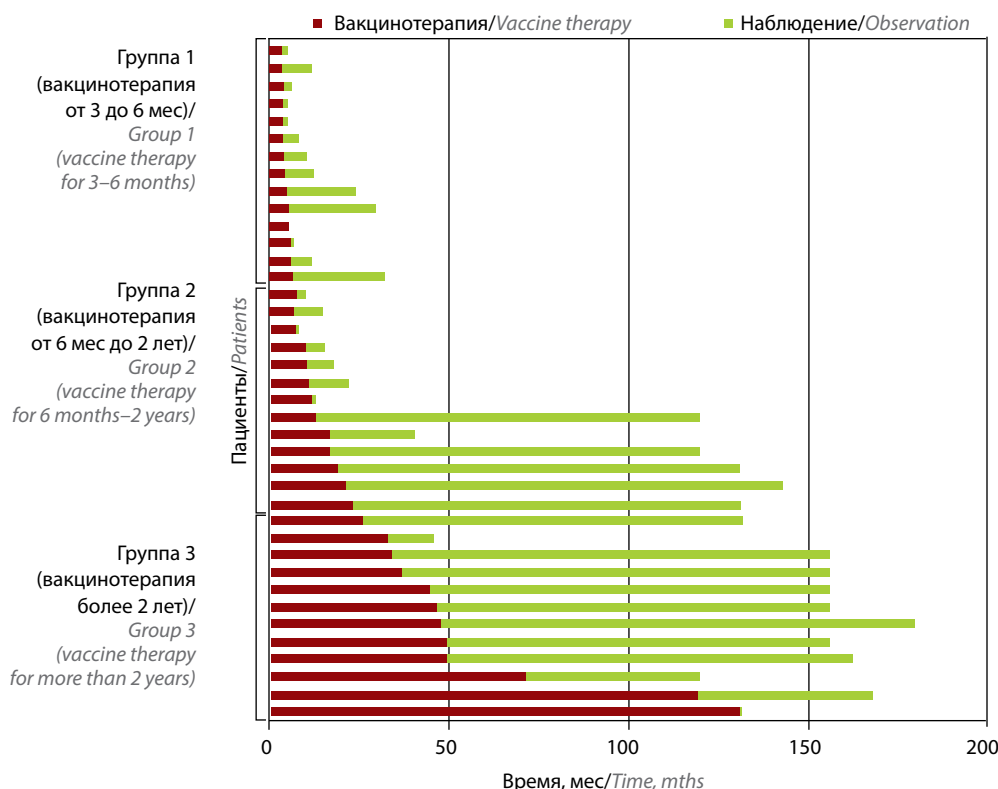


Рис. 1. Распределение больных метастатической меланомой кожи по продолжительности адъювантной вакцилотерапии. Больные разделены на 3 группы по времени продолжительности вакцилотерапии

Fig. 1. Distribution of patients with metastatic melanoma according to the duration of adjuvant vaccine therapy. Patients are divided into 3 groups according to vaccine therapy duration

1-я группа. У всех 14 пациентов этой группы прогрессирование наступило в раннем периоде — до 6 мес от начала вакцинотерапии. Медианы продолжительности терапии и времени до прогрессирования не различались и составили 4 мес — 95 % доверительный интервал (ДИ) 2,83–5,17 и 3,17–4,82 соответственно.

2-я группа. В период от 6 мес до 2 лет получали лечение 13 человек. Медиана времени терапии у них составила 15,9 мес — 95 % ДИ 9,20–22,57. У 3 (23 %) пациентов из этой группы на фоне проводимой терапии было отмечено безрецидивное течение заболевания, продолжительность терапии составила от 13 до 21 мес, а время наблюдения — 103–122 мес (медиана времени до прогрессирования не достигнута). У 10 из 13 (77 %) больных, получавших терапию 6–24 мес, медиана времени до прогрессирования составила 13,3 мес — 95 % ДИ 6,49–20,1 мес.

3-я группа. У 12 пациентов продолжительность терапии составила от 2 до 7 лет, и только у 2 (16 %) из них было выявлено прогрессирование заболевания после 33 и 52 мес. При этом у 1-го пациента прогрессирование было выявлено в процессе терапии (33 мес), у 2-го вакцинотерапия была эффективной (продолжительностью 4 года), а прогрессирование наступило через 14 мес после окончания лечения. У 10 (83 %) больных, получавших вакцинотерапию более 2 лет, медиана времени до прогрессирования не достигнута. У 7 пациентов продолжительность лечения составила 38,6 мес (95 % ДИ 29,1–48,2 мес), у 3 — от 72 до 132 мес. Медиана времени наблюдения после терапии у этих больных составила 108,0 мес — 95 % ДИ 102,3–113,7 мес.

Таким образом, 10-летняя общая выживаемость (ОВ) в группе 39 больных метастатической меланомой после радикального удаления опухоли и последующей вакцинотерапии составила 38 % ($n = 15$), безрецидивная выживаемость — 33 % ($n = 13$); 5-летняя ОВ — 51 % ($n = 20$), безрецидивная выживаемость — 33 % ($n = 13$); 2-летняя ОВ — 66 % ($n = 26$), безрецидивная выживаемость — 38 % ($n = 15$). У большинства больных (67 %) было отмечено прогрессирование заболевания в период от 4 до 52 мес и преимущественно выявлялось раннее прогрессирование — медиана времени до прогрессирования — 5,0 мес — 95 % ДИ 4,0–5,9 мес.

Следующим этапом был проведен анализ прогностического значения количества НКТ-лимфоцитов в периферической крови пациентов до начала иммунотерапии (рис. 2).

1-я группа. Только у 4 (29 %) из 14 больных этой группы до начала терапии количество НКТ-клеток было в пределах нормальных значений (рис. 3) и в процессе вакцинотерапии, несмотря на прогрессирование заболевания, оставалось в норме (2,9 %; 95 % ДИ 0,3–5,4 %). Большинство пациентов ($n = 10$; 71 %) имели повышенное исходное значение НКТ-лимфоцитов (17,1 %; 95 % ДИ 12,5–21,8): у половины из них ($n = 5$) не было отмечено динамики этого показателя в процессе иммунотерапии, у 3 больных выявлен продолженный рост количества НКТ-клеток и только у 2 — уменьшение их количества до нормы. У всех больных этой группы прогрессирование наступило в период от 3 до 6 мес от начала терапии, и они были исключены из протокола лечения и переведены на другой вид терапии. Медиана

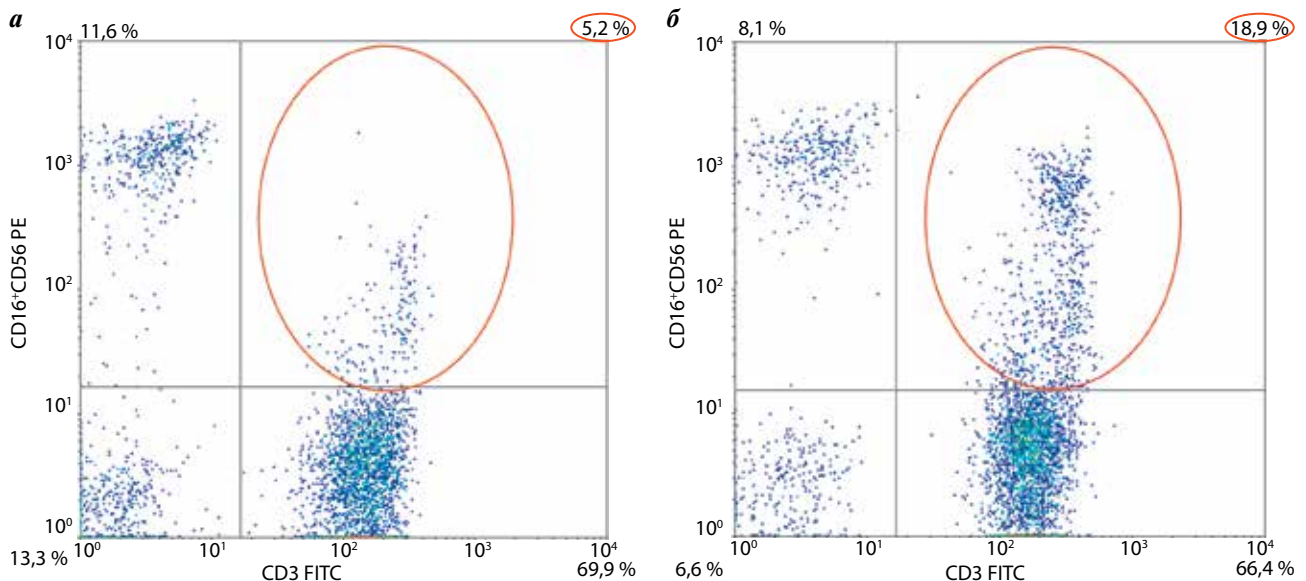


Рис. 2. DotPlot-цитогарма CD3 vs CD16/CD56 CD45⁺ клеток периферической крови 2 больных метастатической меланомой кожи с нормальным (а) и высоким (б) содержанием НКТ-лимфоцитов до начала вакцинотерапии

Fig. 2. DotPlot-cytogram of CD3 vs CD16/CD56 CD45⁺ peripheral blood cells of 2 metastatic melanoma patients with normal (a) and high (b) NKT lymphocyte count prior to vaccine therapy

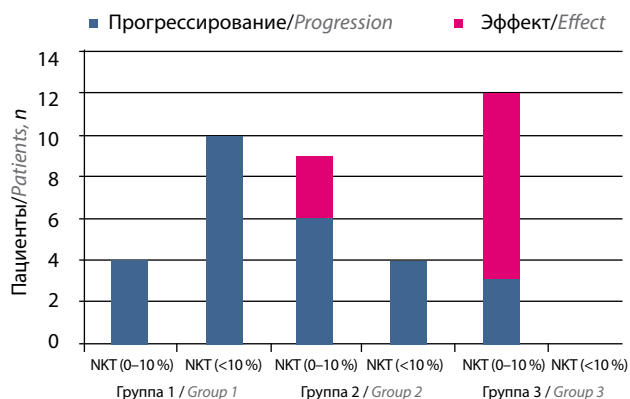


Рис. 3. Сравнение эффективности адъювантной вакцинотерапии у больных метастатической меланомой кожи в зависимости от содержания NKT-клеток до начала терапии в 3 группах, различающихся по продолжительности вакцинотерапии. Распределение больных в зависимости от содержания NKT-клеток до начала терапии в группах (1-я группа 3–6 мес, 2-я – 6 мес – 2 года и 3-я – более 2 лет).

Fig. 3. Comparison of the effectiveness of adjuvant vaccine therapy in metastatic melanoma patients depending on NKT cells count before therapy in 3 groups with different vaccine therapy duration. Patients' distribution depending on NKT cells count before therapy in different groups (1st group 3–6 months, 2nd – 6 months–2 years and 3rd – more than 2 years).

ОВ у этих больных составила 14,6 мес (95 % ДИ 8,9–20,3 мес), и не было выявлено ее существенного различия у больных в зависимости от исходного значения NKT-лимфоцитов. Трое пациентов из этой группы оставались живы в период наблюдения (2–3 года) после вакцинотерапии (1 с нормальным количеством NKT-клеток и 2 – с повышенным, при этом у одного из них количество NKT-лимфоцитов оставалось высоким в процессе вакцинотерапии, а у другого снижалось до нормы).

2-я группа. В данной группе нормальное количество NKT-клеток до начала вакцинотерапии (6,6 %; 95 % ДИ 4,1–9,1 % и медиана 7,4 %; Q25–Q75 3,6–9,1 %) наблюдалось у 9 (69 %) из 13 и только у 4 (31 %) пациентов отмечалось исходно высокое их количество (медиана 16,6 %; Q25–Q75 11,6–21,2 %). У всех больных, имеющих исходно повышенное содержание NKT-лимфоцитов до лечения, было выявлено прогрессирование в процессе иммунотерапии, при этом у 2 пациентов отмечалась нормализация показателя на фоне лечения, а у 2 их количество оставалось без динамики.

У 3 больных с нормальным количеством NKT-клеток (3 из 9) вакцинотерапия была эффективна, и ее продолжительность составила 13, 17 и 21 мес, в настоящее время пациенты живы и не имеют клинических признаков заболевания (время наблюдения после иммунотерапии составило 8,5–12 лет). Количество NKT-лимфоцитов у этих пациентов до начала терапии, в процессе лечения и в период динамического наблюдения оставалось в пределах нормальных

показателей. У остальных больных с исходно нормальным количеством NKT-клеток (6 из 9) в процессе вакцинотерапии было отмечено прогрессирование заболевания, и только у 2 пациентов наблюдался резкий рост количества NKT-лимфоцитов на момент прогрессирования.

3-я группа. У всех больных в этой группе ($n = 12$) до начала иммунотерапии количество NKT-лимфоцитов было в пределах нормы. Для 9 (75 %) пациентов адъювантная вакцинотерапия была эффективна, ее длительность составила от 34 до 72 мес. Эти пациенты находятся в динамическом наблюдении, продолжительность которого на сегодняшний день составляет 103–122 мес (8,5–10 лет).

Таким образом, показано, что у 14 (36 %) больных количество NKT-клеток превышало показатели нормы (0–10 %) и составило в среднем 16,9 % (95 % ДИ 13,5–20,4 %). В процессе вакцинотерапии у всех больных с высоким исходным значением NKT-клеток ($n = 14$) отмечалось прогрессирование заболевания в период до 2 лет. Преимущественно ($n = 10$; 71 %) это были пациенты, получавшие терапию до 6 мес, медиана времени до прогрессирования в группе больных с исходно высоким содержанием NKT-лимфоцитов составила 4,0 мес – 95 % ДИ 2,7–5,2 мес.

У больных с безрецидивным течением заболевания на фоне вакцинотерапии ($n = 13$) до начала лечения количество NKT-лимфоцитов не превышало показатели нормы и в процессе терапии оставалось также в пределах нормальных значений.

Среднее значение времени до прогрессирования у пациентов с высоким уровнем NKT-клеток до начала терапии было в 14,5 раза меньше, чем у пациентов с нормальным их количеством, и составило 6,5 мес (95 % ДИ 2,4–10,7 %) vs 96,2 мес (95 % ДИ 63,8–128,6 %) соответственно (рис. 4). Общая продолжительность жизни у пациентов с исходно увеличенным количеством NKT-лимфоцитов была в 5,6 раза меньше, чем у пациентов с нормальным содержанием NKT-клеток – 22,2 мес (95 % ДИ 11,8–32,6 %) vs 124,9 мес (95 % ДИ 95,4–154,3 %) соответственно. Риск прогрессирования у пациентов с повышенным количеством NKT-лимфоцитов был в 4 раза больше, чем у пациентов с нормальным показателем (относительный риск 4,97; 95 % ДИ 2,04–12,13; $p < 0,001$). Была выявлена обратная умеренная достоверная связь между количеством NKT-клеток до начала вакцинотерапии и временем до прогрессирования ($r = -0,395$; $p = 0,017$).

Анализ динамики изменения количества NKT-клеток у пациентов в процессе вакцинотерапии показал, что у больных с безрецидивным течением заболевания количество NKT-лимфоцитов оставалось в пределах нормы на протяжении всей вакцинотерапии. В группе больных с прогрессированием и исходно высоким содержанием NKT-клеток у 7 из

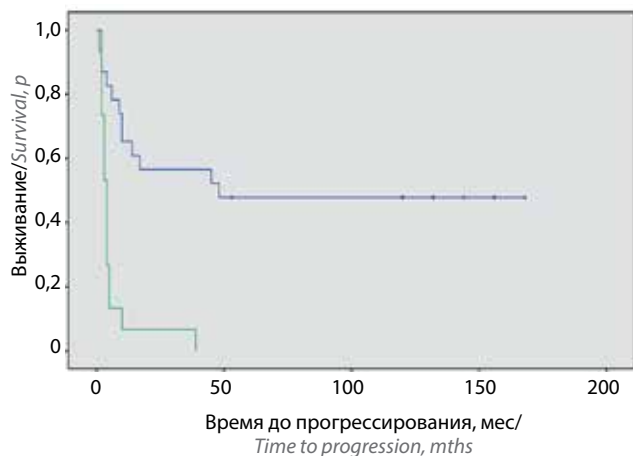


Рис. 4. График безрецидивной выживаемости (по Каплану–Майеру) больных метастатической меланомой после хирургического удаления опухоли от момента начала адъювантной дендритно-клеточной вакцинотерапии до прогрессирования: синяя линия – больные с нормальным количеством НКТ-клеток, зеленая – с повышенным количеством НКТ-лимфоцитов, + – цензурированные наблюдения (пациенты с безрецидивным течением заболевания на момент анализа), p – вероятность выживаемости

Fig. 4. Relapse-free survival (Kaplan-Meier curve) of patients with metastatic melanoma after tumor surgery from the start of adjuvant dendritic cell vaccine therapy to progression: blue line indicates patients with normal NKT cells count, green line – patients with an increased NKT lymphocytes count, + – censored observations (patients with relapse-free disease at the time of analysis)

14 (50 %) пациентов на фоне терапии не определялось значимой динамики показателя; у 4 больных отмечалась нормализация количества НКТ-лимфоцитов и у 3 – существенное, в 1,5–2 раза, увеличение популяции НКТ-клеток. Следует отметить, что у пациентов с нормализацией количества НКТ-лимфоцитов ($n = 4$) прогрессирование произошло через 4, 5, 12 и 33 мес от начала терапии, а у больных с обратной динамикой – через 3, 4 и 5 мес.

Обращает на себя внимание, что из 12 пациентов с исходно нормальным количеством НКТ-клеток, несмотря на прогрессирование заболевания, только у 2 человек в процессе терапии было отмечено резкое, в 2–2,5 раза, увеличение этой субпопуляции лимфоцитов (до 19,8 и 20,2 %) на момент диагностики прогрессирования. У остальных пациентов ($n = 10$) колебания количества НКТ-лимфоцитов и в процессе терапии, и в момент выявления прогрессирования заболевания оставались в пределах нормальных показателей.

Обсуждение

Адъювантная, или профилактическая, иммунотерапия призвана предотвратить развитие рецидива заболевания. Она направлена на уничтожение или длительное подавление микрометастазов меланомы после хирургического удаления опухоли. Критерием эффективности адъювантной терапии является увеличение

безрецидивной выживаемости [10]. Дендритно-клеточная вакцинотерапия рака – одно из актуальных направлений. Только за 2,5 года (с 09.2014 по 02.2017 г.) было опубликовано 43 статьи с результатами различных клинических исследований вакцин на основе ДК [11]. Вакцина на основе ДК не является стандартным препаратом. Существуют аутологичные и аллогенные вакцины. Они различаются по типу антигенов для нагрузки вакцины (могут включать в себя лизат клеток аутологичной или аллогенной опухоли, лизат клеток опухолевых линий, с определенными антигенами, или конкретный набор опухолеассоциированных антигенов) [12]. Различны не только сами вакцины, но и режимы их применения, точки введения и комбинации с другими препаратами, в том числе и с терапией ингибиторами контрольных точек (анти-PD, PDL, CTLA-4). При меланоме кожи в настоящее время ведется набор данных по 4 международным протоколам (NCT02334735; NCT02993315; NCT02301611; NCT01983748 – www.clinicaltrials.gov). Продолжаются работы отечественных исследователей [13]. Планируются новые клинические исследования, о чем свидетельствует протокол 2018 г. ACDC Adjuvant Trial – 2 фазы рандомизированного исследования применения дендритно-клеточной вакцины, нагруженной аутологичным опухолевым лизатом, у пациентов после резекции меланомы III и IV стадии [14].

Представленные данные – часть результатов исследования, ведущегося с 2002 г. по настоящее время. Для 13 из 39 больных метастатической меланомой III–IV стадии применение вакцинотерапии на основе аутологичных ДК после хирургического лечения было эффективным, и максимальное время наблюдения на сегодняшний день составляет 12 лет. Одним из основных вопросов клинических исследований ДК-вакцины (как нашего, так и других протоколов) остается поиск иммунологических маркеров прогноза эффективности терапии.

Ключевым фактором эффективности иммунотерапии является состояние иммунной системы на момент начала специфического иммунотерапевтического воздействия. Способность реализовать запускаемый механизм противоопухолевого ответа предполагает наличие иммунной сбалансированности как минимум на системном уровне – в периферической крови.

НКТ-лимфоциты – гетерогенная популяция, в ней выделяют инвариантный и вариабельный типы. Оба подвида делятся по типу секретируемых цитокинов и могут проявлять как проопухолевую, так и противоопухолевую активность. Популяция НКТ-клеток является малочисленной и в норме составляет до 10 % всех лимфоцитов. Увеличение количества НКТ-лимфоцитов является одним из вариантов иммунологического дисбаланса и, как показало наше исследование, встречается у 1 из 3 пациентов с метастатической

меланомой кожи III–IV стадии после радикального хирургического лечения при отсутствии клинических признаков заболевания. В настоящем исследовании у всех больных с повышенным содержанием НКТ-клеток в процессе иммунотерапии было отмечено прогрессирование в период до 2 лет. Хотя увеличение популяции НКТ-клеток при других нозологических формах и другом противоопухолевом лечении, таком как химиотерапия, может являться благоприятным прогностическим критерием, что было показано при исследовании больных раком молочной железы [15]. Следует отметить, что эффективность химиотерапии сопровождалась уменьшением количества НКТ-лимфоцитов до нормальных показателей.

Неэффективность вакциноотерапии у больных меланомой с повышенным количеством НКТ-клеток может быть связана с тем, что иммунная система уже находится в состоянии напряжения по типу противовирусного ответа и не реагирует на другие виды стимуляции. Данное иммунологическое нарушение следует рассматривать как противопоказание для адъю-

вантной дендритно-клеточной противоопухолевой вакциноотерапии меланомы кожи.

Отметим, что прогрессирование отмечалось и у больных с нормальным содержанием НКТ-клеток. Резкое увеличение в 1,5–2 раза количества НКТ-лимфоцитов в процессе иммунотерапии сочеталось с быстрым прогрессированием вне зависимости от того, было ли ранее количество НКТ-клеток нормальным или повышенным, что позволяет использовать этот критерий для мониторинга как маркер прогрессирования.

Заключение

Увеличенное количество НКТ-клеток у пациентов с метастатической меланомой кожи III–IV стадии после радикального хирургического лечения является маркером раннего прогрессирования. Наличие повышенного количества НКТ-лимфоцитов следует рассматривать как противопоказание для вакциноотерапии в адъювантном режиме аутологичными ДК, нагруженными опухолевым лизатом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bendelac A., Savage P.B., Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:297–336. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711.
2. Godfrey D.I., Stankovic S., Baxter A.G. Raising the NKT cell family. *Nature Immunol* 2010;11(3):197–206. DOI: 10.1038/ni.1841.
3. Акинфеева О.В., Бубнова Л.Н., Бессмельцев С.С. НКТ-клетки: характерные свойства и функциональная значимость для регуляции иммунного ответа. *Онкогематология* 2010;5(4):39–47. [Akinfeeva O.V., Bubnova L.N., Bessmeltsev S.S. NKT cells: characteristic features and functional significance in the immune response regulation. *Onkogematologiya = Oncohematology* 2010;5(4):39–47. (In Russ.)].
4. Nair S., Dhodapkar M.V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2017;8:(1178). DOI: 10.3389/fimmu.2017.011178.
5. Godfrey D.I., Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 2004;114(10):1379–88. DOI: 10.1038/nri11309.
6. Kwak M., Farrow N.E., Salama A.K.S. et al. Updates in adjuvant systemic therapy for melanoma. *J Surg Oncol* 2019;119(2):222–321. DOI: 10.1002/jso.25298.
7. Boudewijns S., Bloemendal M., Gerritsen W.R. et al. Dendritic cell vaccination in melanoma patients: From promising results to future perspectives. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12(10):2523–8. DOI: 10.1080/21645515.2016.1197453.
8. Строяковский Д.Л., Абрамов М.Е., Демидов Л.В. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению меланомы кожи. Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO 2017;7(3 Suppl. 2):190–202. DOI: 10.18027/2224-5057-2017-7-3s2-190-202. [Stroyakovskiy D.L., Abramov M.E., Demidov L.V. et al. Practical recommendations for drug treatment of skin melanoma. *Malignant tumors: Practical recommendations of RUSSCO* 2017;7(3 Suppl. 2):190–202. (In Russ.)].
9. 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(3 Suppl. 2):212–26. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-212-226. [Stroyakovskiy D.L., Abramov M.E., Demidov L.V. et al. Practical recommendations for drug treatment of skin melanoma. *Malignant tumors: Practical recommendations of RUSSCO* 2018;8(3 Suppl. 2):212–26. DOI: 10.18027/2224-5057-2018-8-3s2-212-26. (In Russ.)].
10. Bello D.M., Ariyan C.E. Adjuvant Therapy in the Treatment of Melanoma. *Ann Surg Oncol* 2018;25(7):1807–13. DOI: 10.1245/s10434-018-6376-y.
11. Garg A.D., Vara Perez M., Schaaf M. et al. Trial watch: dendritic cell-based anticancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2017;6(7):1328341. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1328341.
12. Dillman R.O., Nistor G.I., Cornforth A.N. Dendritic cell vaccines for melanoma: past, present and future. *Melanoma Manag* 2016;3(4):273–89. DOI: 10.2217/mmt-2016-0014.
13. Балдуева И.А., Новик А.В., Гельфонд М.Л. и др. Дендритно-клеточная иммунотерапия в сочетании с фотодинамической терапией и циклофосфамидом у больных диссеминированной меланомой кожи, резистентных к стандартным методам лечения. *Онкология, гематология и радиология. Спецвыпуск «Меланома»*. Эффективная фармакотерапия 2017;36:32–41. [Baldueva I.A., Novik A.V., Gelfond M.L. et al. Dendritic-Cell Immunotherapy in Combination with Photodynamic Therapy and Cyclophosphamide in Patients with Metastatic Melanoma, Resistant to Standard Methods of Treatment. *Effective Pharmacotherapy. Oncology, Hematology & Radiology. Special Issue "Melanoma"*. 2017;36:32–41. (In Russ.)].
14. Ridolfi L., de Rosa F., Fiammenghi L.A. et al. Complementary vaccination

protocol with dendritic cells pulsed with autologous tumour lysate in patients with resected stage III or IV melanoma: protocol for a phase II randomised trial (ACDC Adjuvant Trial).
BMJ Open 2018;8(8):021701.
DOI: 10.1136/bmjopen-2018-021701.

15. Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К., и др. Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом. Медицинская иммунология 2018;20(5):667–80.
DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5.

[Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K. et al. The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer: Relationship with efficiency of chemotherapy Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2018;20(5):667–80. (In Russ.)].

Вклад авторов

А.А. Борунова: разработка плана исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;

Г.З. Чкадуа: обзор публикаций по теме статьи;

Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, обсуждение и научное редактирование рукописи;

З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи;

О.В. Короткова, А.И. Черткова: обзор публикаций по теме статьи;

Д.В. Табаков: получение данных для анализа, перевод;

Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа: получение данных для анализа;

Н.Н. Петенко: предоставление материала для исследования;

Л.В. Демидов: обзор публикаций по теме статьи;

И.Н. Михайлова: предоставление материала для исследования, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Author's contributions:

A.A. Borunova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, data analysis and interpretation, article writing;

G.Z. Chkadua: reviewing of publications of the article's theme;

T.N. Zabolina: developing the research design, manuscript discussing and assembling;

Z.G. Kadagidze: reviewing of publications of the article's theme, manuscript discussing and assembling;

O.V. Korotkova, A.I. Chertkova: reviewing of publications of the article's theme;

D.V. Tabakov: data collection and processing, translation of the article;

E.N. Zakharova, E.K. Shoua: data collection and processing;

N.N. Petenko: provision of study materials;

L.V. Demidov: reviewing of publications of the article's theme;

I.N. Mikhailova: provision of study materials, developing the research design, manuscript discussing and assembling.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.А. Борунова/A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

Г.З. Чкадуа/G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-1416-0545>

Т.Н. Заботина/T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

З.Г. Кадагидзе/Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

О.В. Короткова/O.V. Korotkova: <https://orcid.org/0000-0002-6021-732X>

А.И. Черткова/A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

Д.В. Табаков/D.V. Tabakov: <https://orcid.org/0000-0002-1509-2206>

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

Э.К. Шоуа/E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

Н.Н. Петенко/N.N. Petenko: <https://orcid.org/0000-0002-5692-0223>

Л.В. Демидов/L.V. Demidov: <https://orcid.org/0000-0002-8562-6082>

И.Н. Михайлова/I.N. Mikhailova: <https://orcid.org/00000002-7659-6045>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Минздрава России в рамках темы НИР № АААА-А19-119022090028-6.

Financing. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of research № АААА-А19-119022090028-6.

Статья поступила: 04.07.2019. Принята в печать: 15.10.2019.

Article submitted: 04.07.2019. Accepted for publication: 15.10.2019.

