

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



# Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal  
of Biotherapy**

**1**

ТОМ 19  
2020



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

1  
ТОМ 19  
'20

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

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

E-mail: [biotherapy\\_rbj@mail.ru](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rjournal@ronc.ru](mailto:rjournal@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](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://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. 2020. Том 19. № 1. 1–104.  
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2020  
Подписной индекс в каталоге  
агентства «Роспечать» – 81679  
Отпечатано в типографии  
ООО «Медиаколор»  
Тираж 1000 экз.  
[http://www.ronc.ru/specialists/  
useful/journals/138/](http://www.ronc.ru/specialists/useful/journals/138/)  
<http://bioterapevt.elpub.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

1  
VOL. 19  
'20

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](mailto:biotherapy_rbj@mail.ru)  
[rbjournal@ronc.ru](mailto: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](mailto:abv@abvpress.ru)  
[www.abvpress.ru](http://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: ПИ № 77-11695 dated 21.01.2002; ПИ № ФС 77-53039 dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784 (Print)  
ISSN 1726-9792 (Online)  
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2020. Volume 19. No 1. 1–104.

© PH “ABV-Press”, 2020  
Rospechat’ catalogue index: 81679  
Printed at the Mediacolor LLC 1,000 copies  
<https://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>  
<http://bioterapevt.elpub.ru>

## ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

*Г.М. Волгарева*

**Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы.  
Часть 1. Общие представления о папилломавирусах. Формы рака, ассоциированные  
с вирусами папилломы человека . . . . . 6**

*К.В. Алексеев, Е.В. Блынская, С.В. Тишков, В.К. Алексеев, А.А. Иванов*

**Модификации аддитивных технологий для получения лекарственных форм . . . . . 13**

*В.А. Золотцев, А.С. Латышева, В.С. Покровский, И.И. Хан,  
Р.Л.М. Алманза, А.Ю. Мишарин*

**Стероидные конъюгаты как потенциальные противоопухолевые агенты. . . . . 22**

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова,  
И.В. Казеев, Ю.Н. Соловьев, В.Г. Кучеряну*

**$\beta_2$ -интегрины LFA-1, MAC-1 – мишень для усиления иммунитета против опухоли . . . . . 53**

*Н.Б. Морозова, Е.А. Плотникова, А.Д. Плютинская, В.О. Страмова, М.С. Воронцова,  
А.А. Панкратов, Е.А. Макарова, Е.А. Лукьянец, А.Д. Каприн*

**Доклиническое изучение фармакокинетики препарата бактериосенс  
для фотодинамической терапии злокачественных новообразований . . . . . 59**

*Ю.А. Малиновская, Е.И. Коваленко, Т.С. Ковшова, Н.С. Осипова, О.О. Максименко,  
В.Ю. Балабаньян, В.А. Разживина, М.В. Гречихина, А.А. Бойко, С.Э. Гельперина*

**Цитотоксичность и гемосовместимость PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином. . . . . 71**

*А.И. Черткова, Т.Н. Заботина, В.Т. Циклаури, Е.Н. Захарова, Д.В. Табаков, А.А. Борунова,  
Э.К. Шоуа, И.А. Задеренко, И.К. Воротников, А.М. Мудунов, З.Г. Кадагидзе*

**Возрастные особенности системного противоопухолевого иммунного ответа  
у больных первично-операбельным раком молочной железы  
и раком слизистой оболочки полости рта . . . . . 81**

*Е.А. Шестакова*

**Экспрессия генов *НОХ* в лейкозных линиях предшественников В-клеток человека,  
экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1*. . . . . 89**

*Г.М. Сысоева, Е.И. Рябчикова, О.В. Симакова, Е.А. Волосникова,  
Л.Р. Лебедев, Е.Д. Даниленко*

**Исследование противоопухолевого действия препарата фактора некроза опухоли альфа  
в составе искусственной вирусоподобной частицы . . . . . 96**

## REVIEWS

*G.M. Volgareva*

**Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges.**

**Part I. General notions of papillomaviruses. Human papillomaviruses-associated cancers. . . . . 6**

*K.V. Alekseev, E.V. Blynskaya, S.V. Tishkov, V.K. Alekseev, A.A. Ivanov*

**Modification of additive technologies for obtaining medical forms . . . . . 13**

*V.A. Zolottsev, A.S. Latysheva, V.S. Pokrovsky, I.I. Khan, R.L.M. Almanza, A.Y. Misharin*

**Steroid conjugates as potential anti-cancer agents . . . . . 22**

## ORIGINAL REPORTS

*O.A. Bocharova, R.V. Karpova, E.V. Bocharov, A.A. Vershinskaya, M.A. Baryshnikova,  
I.V. Kazeev, Y.N. Soloviev, V.G. Kucheryanu*

**LFA-1, MAC-1 leukocyte integrins – target for tumor immunity magnification. . . . . 53**

*N.B. Morozova, E.A. Plotnikova, A.D. Plyutinskaya, V.O. Stramova, M.S. Vorontsova,  
A.A. Pankratov, E.A. Makarova, E.A. Lukyanets, A.D. Kaprin*

**Preclinical study of the pharmacokinetics of bacteriosens for the photodynamic therapy  
of malignant neoplasms . . . . . 59**

*Yu.A. Malinovskaya, E.I. Kovalenko, T.S. Kovshova, N.S. Osipova, O.O. Maksimenko,  
V.Yu. Balabanyan, V. A Razzhivina, M.V. Grechikhina, A.A. Boiko, S.E. Gelperina*

**Cytotoxicity and hemocompatibility of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles. . . . . 71**

*A.I. Chertkova, T.N. Zabolina, V.T. Tsiklauri, E.N. Zakharova, D.V. Tabakov, A.A. Borunova,  
E.K. Shoua, I.A. Zaderenko, I.K. Vorotnikov, A.M. Mudunov, Z.G. Kadagidze*

**Age-related features of systemic antitumor immune response in patients  
with primary operable breast cancer and cancer of the oral mucosa . . . . . 81**

*E.A. Shestakova*

**HOX gene expression in human B cell progenitor leukemia cell lines  
expressing E2A-PBX1 oncogene . . . . . 89**

*G.M. Sysoeva, E.I. Ryabchikova, O.V. Simakova, E.A. Volosnikova,  
L.R. Lebedev, E.D. Danilenko*

**Evaluation of antitumor activity of tumor necrosis factor alpha within the artificial  
virus-like particle. . . . . 96**

# ПАПИЛЛОМАВИРУСНЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ. ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ ЧАСТЬ 1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПАПИЛЛОМАВИРУСАХ. ФОРМЫ РАКА, АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВИРУСАМИ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА

**Г.М. Волгарева**

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

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

Важнейшим результатом исследований в области папилломавирусного канцерогенеза явилось создание 3 вакцин, предназначенных для профилактики рака шейки матки (РШМ), вызываемого онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ). Две из этих вакцин, которые могут предупредить до 70 % новых случаев РШМ, рекомендованы к применению в России. До настоящего времени профилактические ВПЧ-вакцинации в России не включены в национальный календарь прививок. Помимо РШМ, ВПЧ являются этиологическими агентами при ряде других опухолей аногенитальной сферы, а также новообразований головы и шеи. Установлено, что наибольший разрыв в показателях онкологической статистики между разными регионами мира, обусловленный социоэкономическими факторами, выявляется по отношению именно к тем злокачественным новообразованиям, для которых существуют эффективные способы предупреждения. Обзор посвящен основным достижениям в области изучения онкогенных ВПЧ, а также ряду нерешенных проблем.

**Ключевые слова:** канцерогенез, вирусы папиллом человека, вакцины

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-6-12



## PAPILLOMAVIRAL CARCINOGENESIS. MAJOR ACHIEVEMENTS AND CERTAIN CHALLENGES PART I. GENERAL NOTIONS OF PAPILLOMAVIRUSES. HUMAN PAPILLOMAVIRUSES-ASSOCIATED CANCERS

**G.M. Volgareva**

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

Development of three vaccines intended to prevent cervical cancer (CC) caused by oncogenic human papillomaviruses (HPV) appears to be principal result of research into papillomaviral carcinogenesis. Two of these vaccines efficient in prophylaxis of about 70 % of new CC cases have been recommended for application in Russia. Up till now preventive HPV-vaccinations are not included into the Russian National Vaccination Shedule. In addition to CC HPV are known as etiological agents of some other anogenital as well as certain head and neck tumors. The overall cancer statistics data are found to vary owing to socioeconomic inequalities extremely dramatically for the most preventable cancers. The review is dedicated to major achievements and certain challenges in the field of oncogenic HPV studies.

**Key words:** carcinogenesis, human papillomaviruses, vaccines

### Введение

Область исследований, посвященных папилломавирусному канцерогенезу, стала чрезвычайно обширной и сложно структурированной [1–3]. Достигнутые в этой области успехи увенчались созданием вакцин для профилактики рака шейки матки (РШМ) и присуждением в 2008 г. Нобелевской премии пионеру этих исследований Х. цур Хаузену за открытие

вируса папилломы человека (ВПЧ), вызывающего РШМ [4–6].

Злокачественные новообразования (ЗНО) – одна из главных проблем здравоохранения во всем мире. Замечено, что наибольший разрыв в показателях онкологической статистики между разными регионами мира, обусловленный социоэкономическими факторами, выявляется по отношению именно

к тем ЗНО, для которых существуют эффективные способы предупреждения. Так, на сегодня смертность от РШМ, одного из наиболее частых ЗНО у женщин, в государствах с низким уровнем жизни вдвое выше, чем в развитых странах [7]. Согласно суммарной мировой оценке количества вновь возникших случаев рака это 12,7 млн в год, из которых около 4,8 % приходится на долю ВПЧ-ассоциированных [8].

С появлением инструментов для предупреждения РШМ запрос на информацию в данной области, адресованную врачам и биологам, возрастает ввиду актуальности просветительской работы о ВПЧ-вакцинации на всех доступных уровнях (в медицинских учреждениях, школах, семьях, средствах массовой информации и т. д.). В обзоре рассмотрены темы, представляющиеся нам важными для успешного проведения такой работы:

1. Кратко об истории изучения ВПЧ, принципы их таксономии.
2. Биологический цикл ВПЧ.
3. Геном ВПЧ, вирусные онкогены.
4. Канцерогенные ВПЧ; опухоли человека, ассоциированные с ВПЧ; частота обнаружения ВПЧ в разных ЗНО.
5. ВПЧ-ассоциированные формы рака в России.
6. Вертикальный путь передачи ВПЧ.
7. Профилактические ВПЧ-вакцины.
8. «Феминизация» проблемы ВПЧ, ее последствия; профилактическая вакцинация мальчиков.
9. Коллективный иммунитет против ВПЧ.
10. Вакцинация «вдогонку» (catch-up vaccination).
11. Вакцинация ВИЧ-инфицированных.
12. Три рубежа борьбы с РШМ.
13. Клеточный белок p16<sup>INK4a</sup> как суррогатный маркер РШМ.
14. О разработке терапевтических ВПЧ-вакцин.
15. Общее заключение.

В настоящей части представлены темы 1–4, во 2-й будут рассмотрены темы 5–11, в 3-й – темы 12–15.

#### Из истории изучения ВПЧ. Принципы их таксономии

Исследования, посвященные опухолеродным ВПЧ, имеют длительную историю. Впервые мысль о том, что РШМ – это инфекционное заболевание, передаваемое половым путем, сформулировал итальянский врач М. Ригони-Стерн в 1842 г. [9, 10]. Но принципиальные открытия в данной области были сделаны лишь в 70-х годах XX в. с появлением молекулярных методов исследования, пионерами явились немецкие ученые во главе с Х. цур Хаузенем [11, 12]. Количество известных науке типов папилломавирусов быстро увеличивается, они открыты у большинства видов позвоночных животных, в настоящее время описан геном более 200 типов этих вирусов [13–15].

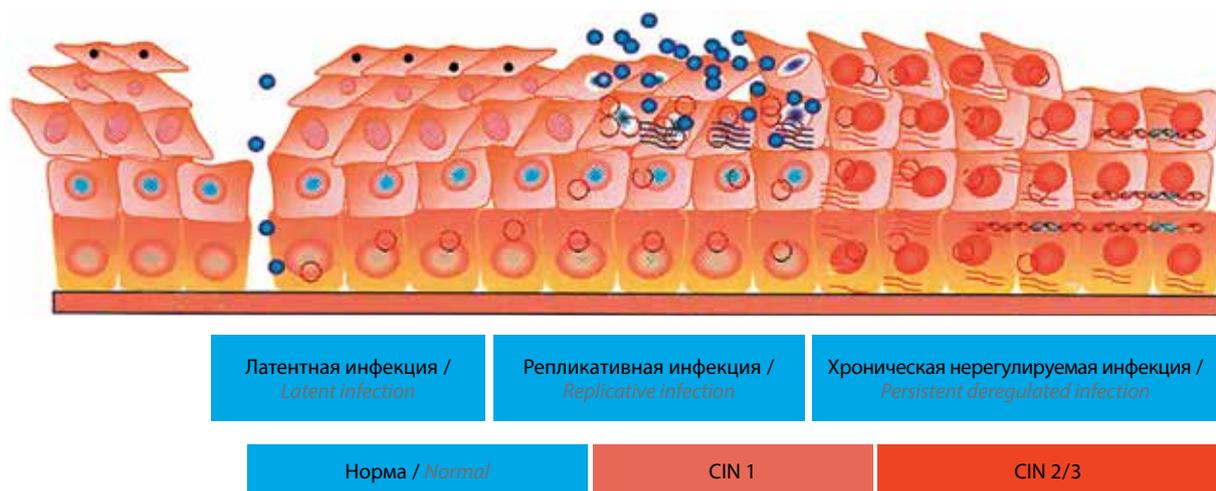
Вирусы папиллом – группа эпителиотропных разнообразных видоспецифичных вирусов, выделенная в семейство *Papillomaviridae*. Вирусные частицы имеют небольшие размеры: 50–60 нм в диаметре. Зрелая вирусная частица содержит ДНК, заключенную в белковый капсид икосаэдрической формы из 72 капсомеров. Семейство подразделяется на 29 родов, обозначенных буквами греческого алфавита. В основу таксономии папилломавирусов положен генетический принцип, а именно: степень несовпадения нуклеотидной последовательности в наиболее консервативной области их генома – гене *L1*. Ввиду того, что ряд представителей *Papillomaviridae* вызывают заболевания у человека, наибольшее внимание уделяется именно ВПЧ, которые и составляют большинство среди известных вирусов папиллом, – свыше 120 [14]. ВПЧ подразделяют на 5 родов. ВПЧ из рода  $\alpha$  инфицируют преимущественно слизистые оболочки ротовой полости и аногенитальной сферы, а также эпителий наружных половых органов. Все известные на сегодня канцерогенные ВПЧ (иначе – ВПЧ типов высокого онкогенного риска) относятся к роду  $\alpha$ . В настоящем обзоре мы сосредоточимся на ВПЧ именно этого рода.

#### Биологический цикл вируса папилломы человека

Наиболее подробно изучены способы заражения аногенитальными вирусами. Основной путь заражения ими – горизонтальная передача от человека к человеку при половом контакте, т. е. при контакте с инфицированным цервикальным, вагинальным, перианальным эпителием, эпителием вульвы и полового члена.

Рассмотрим события, происходящие после заражения эпителиальных клеток вирусами папиллом, на примере плоскоклеточного эпителия шейки матки.

Вирусы папилломы человека заражают эпителиальные клетки базального слоя (рис. 1). Это оказывается возможным при наличии небольшой трещины, ранки. В цитоплазме ДНК вируса освобождается от белков и переходит в ядро клетки, где начинаются транскрипция и репликация вирусного генома. Жизненный цикл вируса на всех этапах тесно связан со стадиями дифференцировки эпителиальных клеток. После заражения вирус может персистировать в так называемой латентной стадии, когда темп репликации вирусного генома соответствует темпу репликации ДНК хозяйской клетки. На этом этапе геном вируса присутствует в ядре клетки в виде эписомы. Каждая клетка-потомок изначально зараженной клетки также содержит 1 или немногочисленные копии генома ВПЧ. По мере того как вирусный генетический материал в ходе деления этих клеток попадает в дочерние супрабазальные клетки, эти



**Рис. 1.** Внедрение онкогенного вируса папилломы человека в эпителий шейки матки. Слева направо: латентная стадия, инфекционная стадия, стадия трансформации. CIN 1 – слабая дисплазия; CIN 2 – умеренная дисплазия; CIN 3 – тяжелая дисплазия. Вирус заражает клетку базального слоя эпителия шейки матки; в ядре вирусная ДНК начинает реплицироваться в темпе репликации клетки. Постепенно вирусный генетический материал попадает и в супрабазальные клетки. На стадии репликативной инфекции вирусная ДНК попадает в поверхностные, наиболее дифференцированные клетки эпителия; здесь синтезируются белки капсида вируса L1 и L2; в просвет цервикального канала выделяются зрелые вирусные частицы. Эпителиальные клетки, в которых образуются вирусные частицы, при этом гибнут. На следующей стадии репликация и транскрипция генома вируса папилломы человека выходят из-под контроля клетки-хозяина; вирусная ДНК интегрирует в хромосому клетки, происходит активация вирусных онкогенов E6 и E7, начинается неконтролируемое размножение клетки, что приводит к образованию дисплазии. Все описанные процессы протекают бессимптомно

**Fig. 1.** Oncogenic human papillomavirus entering cervical epithelium. Left to right: latent stage, infectious stage, transformation stage. CIN 1 – mild dysplasia; CIN 2 – moderate dysplasia; CIN 3 – severe dysplasia. The virus infects basal cells of the cervical epithelium; inside the nucleus, viral DNA starts replicating at the rate of cell replication. Gradually, viral genetic material also enters the suprabasal cells. At the replicative phase, viral DNA enters the surface epithelial cells, the most differentiated ones, where L1 and L2 capsid proteins are synthesized. Mature viral particles are secreted into the lumen of the cervical canal. Epithelial cells in which the viral particles are formed, die. In the next step, replication and transcription of the human papillomavirus genome gets out of the host cell control; viral DNA integrates into a cell chromosome, activating E6 and E7 viral oncogenes. This launches uncontrolled cell division, leading to dysplasia. All described processes are asymptomatic

процессы охватывают и супрабазальный слой эпителия [1].

На стадии репликативной инфекции в клетках поверхностного слоя, достигших стадии терминальной дифференцировки, образуются зрелые частицы вируса. В зараженных клетках начинается продукция белков капсида вируса L1 и L2. Вирусные частицы выделяются на поверхность эпителия, при контакте которого с эпителием другого человека может произойти заражение последнего. Вирус не вызывает гибели клеток хозяина: клетки, достигшие стадии терминальной дифференцировки, в любом случае обречены погибнуть, так как по мере созревания они слущиваются с поверхности. ВПЧ-инфекция протекает бессимптомно. Принося минимум вреда хозяину, вирус эволюционирует совместно с ним.

Мишенью для внедрения и размножения канцерогенных ВПЧ являются, как правило, стволовые клетки, находящиеся в переходной зоне эпителия шейки матки (между плоским и цилиндрическим эпителием), – в них в условиях длительной инфекции вирус вызывает неконтролируемую пролиферацию дочерних клеток. Это так называемая зона трансформации – установлено, что все патологические изменения эпителия, имеющие риск перехода в рак,

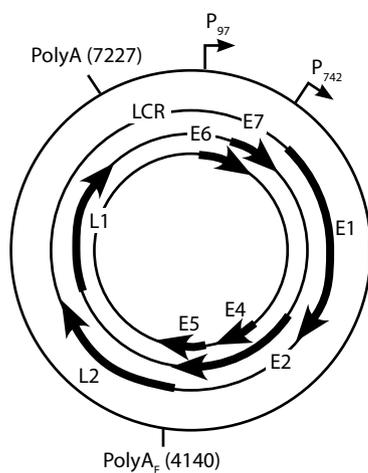
возникают именно в ней [16]. На следующей стадии репликация и транскрипция вирусного генома выходят из-под контроля клетки-хозяина, находящейся в составе базального или парабазального слоев эпителия. Вирусный геном может интегрировать в одну из хромосом клетки в виде линейного фрагмента, ковалентно связанного с ДНК хромосомы, при этом, как правило, разрывается последовательность ДНК, соответствующая рамке E2 (см. далее). Поскольку ген E2 ВПЧ выполняет функцию супрессора транскрипции онкогенов E6 и E7, происходит активация экспрессии вирусных онкогенов в таких клетках. Могут возникнуть очаги трансформации. Образуются дисплазии (последовательно: слабые, умеренные, тяжелые) (Cervical Intraepithelial Neoplasia, CIN I, CIN II, CIN III соответственно).

Вирусами папиллом человека типов высокого риска заражаются в молодом возрасте очень многие женщины. Пик зараженности в популяции приходится на возрастную группу около 25 лет. Примерно 15 % женщин – носителей вируса ежегодно заражаются тем или иным вирусом высокого онкогенного риска. Подавляющее большинство из них в последующие 1–2 года освобождаются от вируса с помощью иммунных сил организма. У остальных ~90 % женщин

дисплазии в эпителии шейки матки, если они и возникли, регрессируют. Однако у очень немногих женщин через годы возникает РШМ. Латентный период между заражением онкогенным ВПЧ и появлением рака может составлять от 5 до 30 лет и более [1].

### Геном вируса папилломы человека, вирусные онкогены

Геном ВПЧ представлен кольцевой двуспиральной молекулой ДНК размером около 8 т. п. н. (рис. 2), он содержит 3 области: 1 – длинную регуляторную область с последовательностями, ответственными за контроль репликации и транскрипции вируса, 2 – раннюю (early, E) область, включающую открытые рамки считывания E1, E2, E4, E5, E6 и E7, необходимые вирусу для осуществления «ранних», не связанных с продукцией зрелых вирусных частиц, функций, таких как репликация и транскрипция вирусного генома, а также придание инфицированной клетке черт злокачественности у ВПЧ тех типов, которые обладают канцерогенным потенциалом, и 3 – позднюю (late, L) область, кодирующую структурные белки L1 и L2 вирусного капсида, которые определяют



**Рис. 2.** Геном ВПЧ 31 [1]. Кольцевая двуспиральная молекула ДНК размером около 8 т. п. н. содержит 3 области: 1 – длинную регуляторную область (long control region – LCR) с последовательностями, ответственными за контроль репликации и транскрипции вируса, 2 – раннюю (early, E) область, включающую открытые рамки считывания E1, E2, E4, E5, E6 и E7, ответственные за репликацию и транскрипцию вирусного генома, а также придание инфицированной клетке черт злокачественности у тех ВПЧ, которые обладают канцерогенным потенциалом, и 3 – позднюю (late, L) область, кодирующую белки капсида L1 и L2, определяющие структуру зрелой вирусной частицы. Ранние гены транскрибируются с раннего промотора (97-й нуклеотид), поздние – с позднего промотора (742-й нуклеотид)

**Fig. 2.** HPV 31 genome [1]. A circular double-stranded DNA molecule of about 8 kbp contains 3 areas: 1 – long regulatory region with sequences controlling viral replication and transcription, 2 – early, E region, including the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames, responsible for viral genome replication and transcription, as well as malignizing infected cell in those HPVs that have carcinogenic potential, and 3 – late (L) region, encoding L1 and L2 capsid proteins, which determine the structure of the mature viral particle. Early genes are transcribed from the early promoter (nucleotide 97), while the later ones – from the late promoter (nucleotide 742)

структуру зрелой вирусной частицы. Ранние гены E транскрибируются с раннего промотора (97-й нуклеотид), поздние гены L – с позднего промотора (742-й нуклеотид) [1].

Для трансформации инфицированной клетки необходимы длительная ВПЧ-инфекция и постоянная экспрессия вирусных онкобелков E6 и E7. Активности белковых продуктов генов E6 и E7 у ВПЧ разных типов различаются. Эти различия, сложившиеся в ходе эволюции вследствие мутаций, и обусловили разделение ВПЧ на типы низкого и высокого онкогенного риска. Для онкогенных ВПЧ установлена положительная корреляция между показателем вирусной нагрузки (количеством вирусных геномов на зараженную клетку) и степенью опасности прогрессии дисплазии в рак.

Небольшие короткоживущие вирусные онкобелки E6 и E7 ВПЧ типов высокого риска способны связываться со многими белками клетки-хозяина и нарушать их нормальное функционирование [4]. Главными являются следующие эффекты. Онкобелок E7 взаимодействует с супрессором опухолевого роста, известным как белок ретинобластомы, pRB. Белок ретинобластомы регулирует активность транскрипционных факторов семейства E2F. E7, связываясь с pRB, вызывает разрушение последнего. В результате этого клетки беспрепятственно преодолевают рестриктивную точку G1/S клеточного цикла [17]. Онкобелок E6 взаимодействует с супрессором опухолевого роста p53, что ведет к быстрому разрушению p53 [18]. Без этого клетка, в которой произошли нарушения в чек-пойнте G1/S, была бы элиминирована с помощью механизма апоптоза. Помимо этого, онкобелок E6 активирует транскрипцию каталитической субъединицы теломеразы, hTERT [19], благодаря чему клетка получает возможность достраивать теломерные районы хромосом и избегает репликативного старения. Клетка становится «бессмертной». Оба онкобелка, E6 и E7, резко повышают нестабильность генома клетки-хозяина [4, 20]. Это достигается несколькими способами. Во-первых, в p53-дефектной клетке нарушаются процессы репарации генома. При этом возрастает частота генных мутаций. Кроме того, благодаря способности онкобелка E7 нарушать удвоение центриолей в клеточной популяции возникают многополюсные митозы. Их результатом являются анеуплоидные клетки.

### Канцерогенные вирусы папилломы человека. Опухоли человека, ассоциированные с вирусами папилломы человека. Частота обнаружения вирусов папилломы человека в разных злокачественных новообразованиях

Содержание понятия «вирус как этиологический фактор развития опухоли» подразумевает комплекс

наблюдений: вирусная ДНК регулярно обнаруживается в опухолевых клетках; клонированные вирусные гены *in vitro* способны индуцировать злокачественную трансформацию клеток, включая клетки человека; вирусные гены регулярно экспрессируются в опухолевых клетках; в природе существуют сходные вирусы, способные индуцировать опухоли у экспериментальных животных; эпидемиологические данные подтверждают связь между опухолевым процессом и наличием вирусного генетического материала в опухолевых клетках. Эти наблюдения накапливаются постепенно [1, 2, 21]. Признание ВПЧ как этиологического фактора РШМ было зафиксировано в пресс-релизе Всемирной организации здравоохранения в 1996 г.

На настоящий момент канцерогенными для человека признаны ВПЧ следующих 12 типов: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, и 59 (канцерогены группы 1). ВПЧ типа 68, по-видимому, являются канцерогенами для человека (группа 2А). В отношении еще нескольких типов ВПЧ, таких как 26, 53, 66, 67, 70, 73, 82, 30, 34, 69, 85 и 97, предполагается, что они могут быть канцерогенными для человека (в том числе для некоторых из них – на основании их филогенетического сходства с типами ВПЧ, канцерогенность которых доказана), – все эти ВПЧ относят к группе 2В. ВПЧ типов 6 и 11 не канцерогенны для человека (are not classifiable as to their carcinogenicity to humans) (группа 3) [2].

Помимо РШМ эти вирусы способны индуцировать рак вульвы, вагины, полового члена, ануса, ротовой полости, ротоглотки, миндалин и гортани. Имеются ограниченные свидетельства в пользу канцерогенности ВПЧ в слизистой оболочке глаза [1, 2].

Онкогенные ВПЧ обнаруживаются в ряде других, в том числе и широко распространенных, ЗНО, таких как рак пищевода, легких, толстого кишечника, яичников, молочной железы, предстательной железы, мочевого пузыря, а также в карциномах носовых и синоназальных полостей. В 2007 г. экспертами Всемирной организации здравоохранения была зафиксирована точка зрения о недостаточности данных (inadequate evidence) для вывода в пользу канцерогенности ВПЧ в этих органах [1]. Следует отметить, что в последние годы получены новые доказательства ассоциации с онкогенными ВПЧ всех перечисленных выше ЗНО: рака легких, молочной железы, предстательной железы, пищевода, яичников, толстого кишечника, мочевого пузыря, полостей носа [22–31]. Ассоциация этих ЗНО с ВПЧ остается предметом дискуссий. В связи с появлением эффективных средств профилактики ВПЧ-ассоциированных ЗНО очевидна актуальность работ в данной области.

Установлена этиологическая роль ВПЧ типов 6 и 11, считающихся вирусами низкого онкогенного риска, в возникновении доброкачественных новообразова-

ний – рецидивирующего респираторного папилломатоза (РПП) и аногенитальных бородавок [1].

Рецидивирующий респираторный папилломатоз – редкое ВПЧ-ассоциированное заболевание верхних дыхательных путей [32]. Несмотря на то что РПП считается доброкачественным новообразованием, он представляет собою значительную проблему для здравоохранения. РПП может затронуть слизистую оболочку любого отдела дыхательного тракта, чаще всего поражается гортань. Заболевание может дебютировать в любом возрасте, причем у детей весьма часты распространенные формы, у этой группы больных РПП является одной из частых причин осиплости, у взрослых больных существует риск малигнизации папиллом [33, 34]. Распространение папиллом на легкие происходит в 3,3 % случаев, малигнизация – приблизительно в 0,5 случая [35]. Частота рецидивирования РПП в мире составляет 4,3 на 100 тыс. детей и 1,8 на 100 тыс. взрослых – у этих больных выполняется более 15 тыс. операций в год [34]. Известны летальные исходы заболевания, вызванные нарушением проходимости дыхательных путей [35]. Природа РПП изучена недостаточно, одним из факторов риска в данном случае являются нарушения функционирования определенных звеньев иммунной системы [36, 37].

Получены первые свидетельства в пользу эффективности четырехвалентной ВПЧ-вакцины Гардасил при лечении РПП: повышение уровня антител к белку L1 ВПЧ типов 6 и 11 у больных после трехкратной вакцинации, а также достоверное снижение частоты рецидивирования заболевания в группе привакцинированных больных РПП по сравнению с аналогичным показателем для группы невакцинированных [38, 39].

Аногенитальные бородавки представляют собой распространенное заболевание, приводящее к снижению трудоспособности, психологическому дискомфорту у больных и немалым проблемам у врачей. В мире ежегодно регистрируется от 160 до 289 случаев этого заболевания на 100 тыс. населения [40]. С целью предупреждения этого заболевания в состав четырехвалентной и девятивалентной ВПЧ-вакцин включены ВПЧ типов 6 и 11.

В мире среди всех вновь выявляемых ежегодно случаев рака на долю вызванных канцерогенными ВПЧ приходится 570 тыс. случаев у женщин и 60 тыс. у мужчин. Процент ВПЧ-ассоциированных среди всех ЗНО в разных регионах мира варьирует в широких пределах. Так, для женщин Австралии, Новой Зеландии и США он не превышает 3 %, а для женщин, проживающих в Индии, Юго-Восточной Азии и Африке южнее Сахары, он достигает 26 %. РШМ составляет наибольшую часть всех индуцированных онкогенными ВПЧ вновь выявленных в мире случаев

ЗНО — 530 тыс., 50 % этих случаев диагностируется у женщин в возрасте до 50 лет; более чем 2/3 всех случаев возникают в слаборазвитых странах. ВПЧ типов 16 и 18 ответственны за 71 % заболеваний РШМ в мире, а ВПЧ типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 (они включены в девятивалентную вакцину) — за 90 % [41].

Традиционно ВПЧ-положительными считают все случаи РШМ. Следует, однако, заметить, что крайне редкие ВПЧ-отрицательные случаи РШМ при целенаправленном поиске были обнаружены и описаны. Частота их, по косвенным оценкам, составляет менее 0,5 % всех РШМ, но тот факт, что они существуют, заслуживает упоминания, так как эти формы РШМ крайне трудно диагностируются (их не выявляет так называемый ПАП-тест — микроскопическое исследование мазка, при котором цитолог фиксирует наличие предраковых или раковых клеток во влагалище и шейке матки; тест получил название по имени греческого ученого, который его разработал, — Папаниколау). Такие опухоли обнаруживаются на поздних стадиях, в силу чего оказываются неоперабельными [42].

На долю ВПЧ-индуцированных приходится 8500 случаев рака вульвы, 12 тыс. случаев рака влагалища, 35 тыс. анального и 13 тыс. — рака полового члена среди всех вновь выявляемых в мире ежегодно. ВПЧ типов высокого риска обнаруживаются в 90 %

анальных карцином. При данной форме рака ВПЧ типа 16 обнаруживается в опухолевых клетках несколько чаще, чем при РШМ. Как следствие этого, ВПЧ типов 16 и 18 ответственны за 87 % этих ЗНО, а ВПЧ типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 — за 96 %. Для таких редких форм ЗНО, как рак вульвы, полового члена и влагалища, частота ВПЧ-положительных случаев оценивается в 25, 50 и 78 % соответственно, а вклад ВПЧ тех типов, от которых защищают профилактические вакцины, в их возникновение близок к аналогичным показателям для РШМ [41].

С ВПЧ бывают ассоциированы карциномы головы и шеи 3 локализаций: рак ротоглотки (основания языка, а также миндалин), реже — рак ротовой полости и гортани. В мире ~38 тыс. вновь выявляемых ежегодно случаев рака головы и шеи оказываются ВПЧ-положительными, причем географические регионы, в которых преимущественно обнаруживаются такие случаи, — это экономически развитые страны Северной Америки, Европы и Австралии: здесь частота ВПЧ-положительных случаев достигает 40 %. ВПЧ типов 16 и 18 ответственны за 85 % этих ЗНО, а ВПЧ типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 — за 90 % [41].

В целом профилактические вакцины, по предварительным оценкам, могут предупредить от 70 до 90 % случаев рака, ассоциированных с ВПЧ [41].

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Human Papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2007;90:1–636.
- Biological agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2011; 100(Pt. B):1–441.
- McBride A.A., Münger K. Expert views on HPV infection. *Viruses* 2018;10(2):94. DOI: 10.3390/v10020094.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):690–8. DOI: 10.1093/jnci/92.9.690.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses — to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc.)* 2008;73(5):498–503. DOI: 10.1134/S0006297908050027.
- Zur Hausen H. HPV vaccines: what remains to be done? Interview by Lauren Constable. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(11):1505–7. DOI: 10.1586/erv.11.128.
- Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69(1):7–34. DOI: 10.3322/caac.21551.
- Forman D., de Martel C., Lacey C.J. et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* 2012;30 Suppl. 5:12–23. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.07.055.
- Rigoni-Stern D. Fatti Statistici relativi alle malattie cancerose che Servirono di Base Alle Poche Cose Dette dal Dott. G Servire *Progr Path Tera* 1842;2:507–17.
- Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancer — a brief historical account. *Virology* 2009;384(2):260–5. DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.046.
- Zur Hausen H., Meinhof W., Scheiber W., Bornkamm G.W. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridization with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974;13(5):650–6. DOI: 10.1002/ijc.2910130509.
- Gissmann L., zur Hausen H. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73(4):1310–3. DOI: 10.1073/pnas.73.4.1310.
- De Villiers E.-M., Fauquet C., Broker T.R. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324(1):17–27. DOI: 10.1016/j.virol.2004.03.033.
- Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010;401(1):70–9. DOI: 10.1016/j.virol.2010.02.002.
- Van Doorslaer K., Bernard H.U., Chen Z. et al. Papillomaviruses: evolution, Linnaean taxonomy and current nomenclature. *Trends Microbiol* 2011;19(2):49–50. DOI: 10.1016/j.tim.2010.11.004.
- Короленкова Л.И., Ермилова В.Д. Зона трансформации шейки матки как объект канцерогенного действия вирусов папилломы человека при возникновении цервикальных интраэпителиальных неоплазий и инвазивного рака. *Архив патологии* 2011;73(6):33–7. [Korolenkova L.I., Ermilova V.D. The role of transformation zone as an object of HPV oncogenic impact in CIN and invasive cervical cancer development: clinical considerations. *Arkhiv patologii = Arch Pathol* 2011;73(6):33–7. (In Russ.)].
- Dyson N., Howley P.M., Münger K. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*

- 1989;243(4893):934–7.  
DOI: 10.1126/science.2537532.
18. Werness B.A., Levine A.J., Howley P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 1990;248(4951):76–9. DOI: 10.1126/science.2157286.
  19. Klingelutz A.J., Foster S.A., McDougall J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380(6569):79–82. DOI: 10.1038/380079a0.
  20. Duensing S., Lee L.Y., Duensing A. et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97(18):10002–7. DOI: 10.1073/pnas.170093297.
  21. Human Papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1995;64:1–378.
  22. Xiong W.-M., Xu Q.-P., Li X. et al. The association between human papillomavirus infection and lung cancer: a system review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(56):96419–32. DOI: 10.18632/oncotarget.21682.
  23. Lawson J.S., Glenn W.K., Salyakina D. et al. Human papilloma virus identification in breast cancer patients with previous cervical neoplasia. *Front Oncol* 2015;5:298. DOI: 10.3389/fonc.2015.00298.
  24. Yang L., Xie S., Feng X. et al. Worldwide prevalence of human papillomavirus and relative risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:14667. DOI: 10.1038/srep14667.
  25. Волгарева Г.М., Ермилова В.Д. Обнаружение онкогена E7 вируса папиллом человека 18 типа у больных раком предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(1):37–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-37-41. [Volgareva G.M., Ermilova V.D. Detection of human papillomavirus type 18 oncogene E7 in patients with prostate cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian J Biother* 2019;18(1):37–41. (In Russ.)].
  26. Zhang S.-K., Guo L.-W., Chen Q. et al. The association between human papillomavirus 16 and esophageal cancer in Chinese population: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2015;15:99. DOI: 10.1186/s12885-015-1096-1.
  27. Al-Shabanah O.A., Hafez M.M., Hassan Z.K. et al. Human papillomavirus genotyping and integration in ovarian cancer Saudi patients. *Virology* 2013;10:343. DOI: 10.1186/1743-422X-10-343.
  28. Li Y.X., Zhang L., Simayi D. et al. Human papillomavirus infection correlates with inflammatory Stat3 signaling activity and IL-17 level in patients with colorectal cancer. *PLoS One* 2015;10(2):0118391. DOI: 10.1371/journal.pone.0118391.
  29. Li N., Yang L., Zhang Y. et al. Human papillomavirus infection and bladder cancer risk: a meta-analysis. *J Infect Dis* 2011;204(2):217–23. DOI: 10.1093/infdis/jir248.
  30. Golovina D.A., Ermilova V.D., Zavalishina L.E. et al. Loss of cell differentiation in HPV-associated bladder cancer. *Bull Exp Biol Med* 2016;161(1):96–8. DOI: 10.1007/s10517-016-3354-x.
  31. Knör M., Tziridis K., Agaimy A. et al. Human papillomavirus (HPV) prevalence in nasal and oropharyngeal polyps and association with clinical data. *PLoS One* 2015;10(10):0141722. DOI: 10.1371/journal.pone.0141722.
  32. Eftekhaar N.S., Karbalaie Niya M.H., Izadi F. et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in patients with recurrent respiratory papillomatosis (RRP) in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev* 2017;18(7):1973–6. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.7.1973.
  33. Katsenos S., Becker H.D. Recurrent respiratory papillomatosis: a rare chronic disease, difficult to treat, with potential to lung cancer transformation: apropos of two cases and a brief literature review. *Case Rep Oncol* 2011;4(1):162–71. DOI: 10.1159/000327094.
  34. Карпищенко С., Катинас Е., Кучерова Л. Рецидивирующий респираторный папилломатоз. *Врач* 2012;1:11–4. [Karpishchenko S., Katinas E., Kucheroval L. Recurrent respiratory papillomatosis. *Vrach = The doctor* 2012;1:11–4. (In Russ.)].
  35. Mitsumoto G.L., Bernardi F.D.C., Paes J.F. et al. Juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis with pulmonary involvement and carcinomatous transformation. *Autops Case Rep* 2018;8(3):2018035. DOI: 10.4322/acr.2018.035.
  36. Wu X., Wang G., Chen X. et al. Impaired T Cell-dependent humoral immune response associated with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis progression. *Sci Rep* 2016;6:36378. DOI: 10.1038/srep36378.
  37. Holm A., Nagaeva O., Nagaev I. et al. Lymphocyte profile and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with recurrent respiratory papillomatosis suggest dysregulated cytokine mRNA response and impaired cytotoxic capacity. *Immun Inflamm Dis* 2017;5(4):541–50. DOI: 10.1002/iid3.188.
  38. Tjon Pian Gi R.E., San Giorgi M.R.M., Pawlita M. et al. Immunological response to quadrivalent HPV vaccine in treatment of recurrent respiratory papillomatosis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2016;273(10):3231–6. DOI: 10.1007/s00405-016-4085-3.
  39. Mauz P.S., Schafer F.A., Iftner T., Gonser P. HPV vaccination as preventive approach for recurrent respiratory papillomatosis – a 22-year retrospective clinical analysis. *BMC Infect Dis* 2018;18:343. DOI: 10.1186/s12879-018-3260-0.
  40. Patel H., Wagner M., Singhal P., Kothari S. Systematic review of the incidence and prevalence of genital warts. *BMC Infect Dis* 2013;13:39. DOI: 10.1186/1471-2334-13-39.
  41. De Martel C., Plummer M., Vignat J., Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer* 2017;141(4):664–70. DOI: 10.1002/ijc.30716.
  42. Morrison C., Catania F., Wakely P. Jr., Nuovo G.J. Highly differentiated keratinizing squamous cell cancer of the cervix: a rare, locally aggressive tumor not associated with human papillomavirus or squamous intraepithelial lesions. *Am J Surg Pathol* 2001;25(10):1310–5. DOI: 10.1097/00000478-200110000-00013.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**Статья поступила:** 03.04.2019. **Принята к публикации:** 19.12.2019.

**Article submitted:** 03.04.2019. **Accepted for publication:** 19.12.2019.

# МОДИФИКАЦИИ АДДИТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

К.В. Алексеев<sup>1,2</sup>, Е.В. Блынская<sup>1</sup>, С.В. Тишков<sup>1</sup>, В.К. Алексеев<sup>1</sup>, А.А. Иванов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

<sup>2</sup>ЧУ ОО ВО «Медицинский университет «Реавиз»; Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатырская, 2, стр. 2

**Контакты:** Сергей Валерьевич Тишков [sergey-tishkov@ya.ru](mailto:sergey-tishkov@ya.ru)

В данном обзоре представлены технологические подходы к четырехмерной печати, являющиеся модификацией аддитивных технологий. Показаны отличительные особенности данной технологии от трехмерной печати. Дано описание применения четырехмерной печати в фармацевтической технологии и преимуществ перед традиционными методами создания лекарственных форм. Продемонстрированы классификация адаптивных материалов, принципы их применения и особенности печатного оборудования. Представлены примеры адаптивных материалов, включающих смарт-полимеры и чувствительные к стимулам гидрогели. Приведены преимущества данного вида производства, его перспективы развития и технологические особенности получения микрокапсул, гидрогелей и мукоадгезивных пленок из смарт-полимеров благодаря использованию аддитивной печати.

**Ключевые слова:** аддитивные технологии, трехмерная печать, четырехмерная печать, смарт-полимеры

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-13-21



## MODIFICATION OF ADDITIVE TECHNOLOGIES FOR OBTAINING MEDICAL FORMS

K. V. Alekseev<sup>1,2</sup>, E. V. Blynskaya<sup>1</sup>, S. V. Tishkov<sup>1</sup>, V. K. Alekseev<sup>1</sup>, A. A. Ivanov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Research Zakusov Institute of Pharmacology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

<sup>2</sup>“Reaviz” Medical University; p. 2, 2 Krasnobogatyrskaya St., Moscow 107564, Russia

This review presents technological approaches to 4-D printing, which are modifications of additive technologies. Showing the distinctive features of this technology from the three-dimensional printing. The use of four-dimensional printing in pharmaceutical technology and advantages over traditional methods of creating dosage forms are described. Demonstrated classification of adaptive materials, the principles of their application and features of printing equipment. Examples of adaptive materials are presented, including smart polymers and stimuli sensitive hydrogels. The advantages of this type of production, its development prospects and technological features of the production of microcapsules, hydrogels and mucoadhesive films of smart polymers by additive printing technology are given.

**Key words:** additive technologies, three-dimensional printing, four-dimensional printing, smart polymers

### Введение

Совершенствованию систем доставки противоопухолевых лекарственных средств (ЛС) посвящено множество публикаций и исследований, в частности создание липосомальных лиофилизатов, термочувствительных липосом, наноструктурированных и других систем направленной доставки [1–4]. Важное значение имеют аддитивные технологии производства управляемых микрокапсул, которые в настоящее время исследуются для применения в технологии противоопухолевых систем доставки. Подробно они будут рассмотрены далее.

Несмотря на относительно недавно начатые изучение и использование трехмерной (3D) печати в фармацевтической технологии, разрабатываются технологические приемы, совершенствующие данные

подходы к производству лекарственных форм (ЛФ) [5, 6]. Одним из таких направлений является дополнение существующих технологий адаптивными полимерами, или, по-другому, смарт-полимерами (СП) (интеллектуальными), которые изменяют свою морфологию заранее заданным образом в ответ на воздействие определенных факторов. Такую концепцию называют «четырёхмерная (4D) печать», где в качестве 4-го измерения используют время, поскольку в течение отмеренного интервала времени происходит преобразование конфигурации ЛФ. Изменения в структуре ЛФ являются результатом использования смарт-полимеров, которые реагируют на такие раздражители, как свет, температура, вода или pH. Несмотря на отсутствие зарегистрированных лекарственных препаратов (ЛП), использующих

технологии 4D-печати, существуют исследования по использованию интеллектуальных полимерных материалов для инкапсулирования фармацевтических субстанций (ФС) или клеток, а также по созданию биоадгезивных ЛФ. Объединив 3D-печать, способную создавать персонализированные ЛП, и адаптивные материалы, изменяющие собственную морфологию в течение времени, 4D-печать дает возможность производить новые персоналифицированные системы доставки.

**Цель исследования** – кратко описать технологические приемы, возможности применения 4D-печати ЛФ и выявить отличительные особенности по сравнению с 3D-печатью.

#### Основные пути четырехмерной модификации 3D-печати

3D-печать – метод аддитивной печати, при котором каждый объект ЛФ создается индивидуально путем послойного нанесения, отвержения или связывания ФС и вспомогательных веществ (ВВ) с четко регулируемым расположением частиц.

Производство 3D-печатных объектов начинается с файла автоматизированного проектирования, который описывает геометрию и размер печатаемых объектов. Объект с использованием программного обеспечения разделяется на ряд цифровых слоев поперечного сечения, которые затем изготавливаются 3D-принтером. В этом процессе могут использоваться многие различные типы материалов, такие как термопластичные ВВ, порошки, металлы и отверждаемые ультрафиолетом полимеры.

4D-печать определяется как печать 3D-объектов с возможностью изменения формы или функции под воздействием внешних раздражителей во времени [7]. Схема различных принципов печати показана на рис. 1.

Существенная разница между 4D- и 3D-печатью заключается в добавлении интеллектуального дизайна или адаптивных материалов, что приводит к зависящей от времени деформации объекта. Для достижения представленной цели печатаемый материал должен самостоятельно трансформироваться по фор-

ме или функционально при воздействии внешнего раздражителя, такого как осмотическое давление, изменение температуры, электромагнитное или ультрафиолетовое излучение и т. д. [8]. Однако включение дополнительных функций адаптации материалов в ЛФ создает дополнительные сложности в процессе разработки, поскольку 4D-печатные структуры должны заранее программироваться на основе механизма преобразования управляемых СП, которые включают требуемые деформации ВВ. Поскольку большинство материалов для 3D-печати предназначено только для производства жестких, статичных объектов, выбор ВВ для 4D-печати является особо сложной задачей.

#### Адаптивные материалы, или смарт-полимеры, для 4D-печати

Технологии 3D- и 4D-печати классифицируются в основном с учетом типов используемых материалов. Выбор ВВ оказывает непосредственное влияние на механические или термические свойства, а также на стимулы преобразования готовых объектов. Хотя основное различие между 3D- и 4D-печатью заключается в материалах, процессы изготовления печатных объектов одинаковы.

В настоящее время для 4D-печати доступно ограниченное количество чувствительных к стимулам ВВ, поскольку не все адаптивные материалы могут быть напечатаны на 3D-принтерах. Существует 2 основных типа интеллектуальных полимерных материалов, которые используют в 4D-печати: гидрогели, которые набухают при воздействии воды или других растворенных веществ, и СП с памятью формы. СП отвечают на ряд раздражителей, включая температуру, pH или ультрафиолетовое излучение. В табл. 1 перечислены некоторые примеры адаптивных материалов в зависимости от их чувствительности к стимулам. Некоторые из них уже использовались для 4D-печати, другие ВВ исследуются для практического применения.

Гидрогели используют для создания структур, в которых диффузия воды в полимерную сеть создает специфическое локализованное набухание, таким образом изменяя морфологию продукта. Исследователи из Массачусетского технологического института создали линейный продукт, напечатав жесткий водостойкий материал, соединенный гидрогелем в «петлях», который после погружения в воду искажал созданную 3D-структуру. Поглощение воды шарнирной частью какого-либо объекта вызывает набухание, что приводит к предсказуемому изгибу жесткого материала. Представленный эффект использовали для создания как полностью закрытого куба, так и контура куба, зависящего от размера и манипуляций с конструкционными водонепроницаемыми секциями [9].

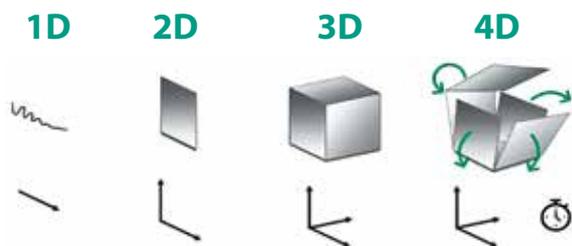


Рис. 1. Схема 1D-, 2D-, 3D- и 4D-принципов печати  
Fig. 1. Scheme 1D-, 2D-, 3D- and 4D-principles of printing

Таблица 1. Примеры интеллектуальных, или адаптивных, материалов, применяющихся в фармации и медицине

Table 1. Examples of intelligent or adaptive materials used in pharmacy and medicine

Стимул Stimulus	Наименование и/или тип материала Material name and/or type	Состав композиции Composition formulation	Процесс печати Printing process
Температура Temperature	pNIPAM-ААс	Наночастицы pNIPAM-ААс, PPF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> pNIPAM-AAc, PPF, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> nanoparticles	—
	Метакрилованный поликапролактон Methacrylated PCL	PCL-диметилакрилат, ТРО в качестве фотоинициатора, витамин Е для предотвращения преждевременного сшивания, тонер желтый Yellow 3GP PCL dimethylacrylate, TPO as a photoinitiator, Vitamin E to prevent premature crosslinking, Yellow 3GP toner	Стереолитография (принтер для цифровой лазерной печати Freeformpico 2 SLA) Stereolithography (laser printer Freeformpico 2 SLA)
	Хирургические скобы PLA PLA surgical staples	PLA	Не упомянуто Not mentioned
	Гидрогель ПВС/ПЭГ PVA/PEG hydrogel	Двусторонний гидрогель ПВС/ПЭГ Bilateral PVA-PEG hydrogel	—
	Жидкая смола на основе эпоксидированного соевого масла и акрилата Soybean-oil based epoxy acrylate resin	Эпоксидированный соевым маслом акрилат содержит 3 основных остатка жирных кислот (стеариновая, олеиновая и линолевая кислоты) с боковыми алкановыми группами, которые могут замерзнуть и улучшить фиксацию формы при -18 °С Soybean-oil based epoxy acrylate contains 3 basic fatty acid residues (stearic, oleic and linoleic acids) with alkane-side groups that can freeze and improve fixation form at -18 °C	Стереолитография (модифицированная платформа 3D-принтера Solidoodle®) Stereolithography (modified Solidoodle® 3D printer platform)
Магнитное поле Magnetic field	PEGDA/ PHEMA-микроробот PEGDA/PHEMA microrobot	PEGDA, оксид железа (II, III) (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ); 2-PHEMA-слой PEGDA, ferric oxide (II, III) (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ); 2-PHEMA-layer	—
	Макропористый феррогель Macroporous ferrogel	Пептиды, содержащие аминокислотную последовательность: аргинин-глицин-аспарагиновая кислота, альгинат натрия, наночастицы Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Peptides containing the amino acid sequence: arginine-glycine-aspartic acid, sodium alginate, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> nanoparticles	—
Свет Light	Оптогенетические биоботы на мышечных кольцах Optogenetic muscle ring-powered biobots	Светочувствительная смола PEGDA PEGDA photosensitive resin	Стереолитография (стереолитографические 250/50; 3D-системы) Stereolithography (stereolithographic 250/50; 3D systems)
	Гидрогель PHEMA PHEMA hydrogel	Сшитая PHEMA, функционализированная азобензольными группами Cross-linked PHEMA, functionalized with azobenzene groups	—
Влажность Humidity	PCADAG	ПЭГ-конъюгированное производное азобензола (PCAD) и агароза (AG) PEG-conjugated azobenzene derivative (PCAD) and agarose (AG)	—
	CSF <sub>0</sub>	Стеариловый эфир целлюлозы с низкой степенью замещения (DS = 0,3) Low-substituted cellulose stearyl ether (DS = 0,3)	—

Стимул Stimulus	Наименование и/или тип материала Material name and/or type	Состав композиции Composition formulation	Процесс печати Printing process
Осмотическое давление Osmotic pressure	Гидрогель ПЭГ PEG hydrogel	Фотосшиваемый ПЭГ с фотоинициатором 1-[4-(2-гидроксиэтокси)фенил]-2-гидрокси-2-метил-1-пропан-1-1-оном (Irgacure® 2959) Photocrosslinked PEG with 1-[4-(2-hydroxyethoxy)phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propan-1-one photoinitiator (Irgacure® 2959)	—
	Винилкапролактam/ПЭГ-гидрогель Vinyl caprolactam/PEG hydrogel	Винилкапролактam, полиэтилен, эпокси-диакрилатный олигомер (Irgacure® 819) Vinyl caprolactam, polyethylene, epoxy diacrylate oligomer (Irgacure® 819)	Универсальный 3D-принтер Stratasys Connex 500 Universal 3D printer Stratasys Connex 500

**Примечание.** рNIPAM-АAc — поли-N-изопропилакриламид с акриловой кислотой; PPF — полипропиленфумарат; PCL — поли-ε-капролактон; ПВС — поливиниловый спирт; ПЭГ — полиэтиленгликоль; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> — оксид железа; TPO — (2,4,6-триметилбензоил)-дифенилфосфин оксид; PLA — поли-L-молочная кислота; PHEMA — гидроксиэтилметакрилат; PEGDA — полиэтиленгликоль акрилата.

*Note.* PNIPAM-AAc — poly-N-isopropylacrylamide-coacrylic acid; PPF — polypropylene fumarate; PCL — poly-ε-caprolactone; PVA — polyvinyl alcohol; PEG — polyethylene glycol; Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> — iron oxide; TPO — diphenyl(2,4,6-Trimethylbenzoyl) phosphine oxide; PLA — poly-L-lactic acid; PHEMA — hydroxyethyl methacrylate; PEGDA — polyethylene glycol acrylate.

Смарт-полимеры, способные принимать временные морфологии в ответ на определенные внешние раздражители, такие как температура или pH, после возвращения в исходную внешнюю среду восстанавливают свою постоянную форму. В таких механизмах используемый интеллектуальный материал реагирует на определенный прогнозируемый стимул, достигающий критической точки перегиба, такой как температура стеклования (T<sub>g</sub>) полимера. При неизменной постоянной форме температура полимера должна быть ниже T<sub>g</sub>, обеспечивая материал в хрупком твердом состоянии. Однако при температурах выше T<sub>g</sub> материал переходит в вязкое, более гибкое состояние. Представленные преобразования учитывают определенные, предсказанные изменения в морфологии структуры, прежде чем вернуться в состояние покоя при падении температуры ниже T<sub>g</sub>.

На рис. 2 показан пример фотосшитого СП с функционализированной акриловой кислотой (pNIPAM-АAc) в сочетании с фумаратом полипропилена, где компонент pNIPAM-АAc превращается в гидрофобное состояние, демонстрируя преобразование формы после повышения температуры выше 36 °C [7].

Гидрогели, содержащие магнитные частицы, или феррогели, представляют собой материалы, чувствительные к магнитному полю. Примером является основанный на альгинате каркас, который управляет движением воды из внутренних пор под действием магнитного поля, вызывая тем самым высвобождение клеток или ФС [10]. В настоящее время также разрабатываются гибридные системы, содержащие несколько слоев СП, реагирующих на разные сти-

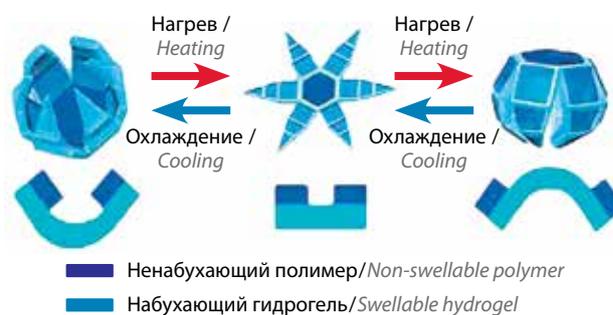


Рис. 2. Принципиальная схема, иллюстрирующая обратимое самораскладывание мягких микрогripperов (микрокапсул) в зависимости от температуры

Fig. 2. Schematic diagram illustrating the reversible self-folding of soft microgrippers (microcapsules) depending on temperature

мулы, — такой подход, например, реализован при создании 3D-печатной ЛФ, реагирующей на магнитное поле, а также на изменение pH. Изготовлена данная конструкция из двуслойной структуры гидрогеля полиэтиленгликоля акрилата (PEGDA) и 2-гидроксиэтилметакрилата (PHEMA) и содержит частицы оксида железа (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), которые могут перемещаться под действием внешнего магнитного поля к месту назначения и высвобождать инкапсулированное ЛС при изменении pH (подробнее — далее).

Светочувствительные материалы могут преобразовывать свою форму на основе фотоизомеризации и фотодеградации в полимерной цепи. Подобные механизмы применяют в микрокапсулах с кольцевой структурой, где стереолитографическую 3D-печать использовали для изготовления литевых форм для колец и полос из светочувствительной смолы

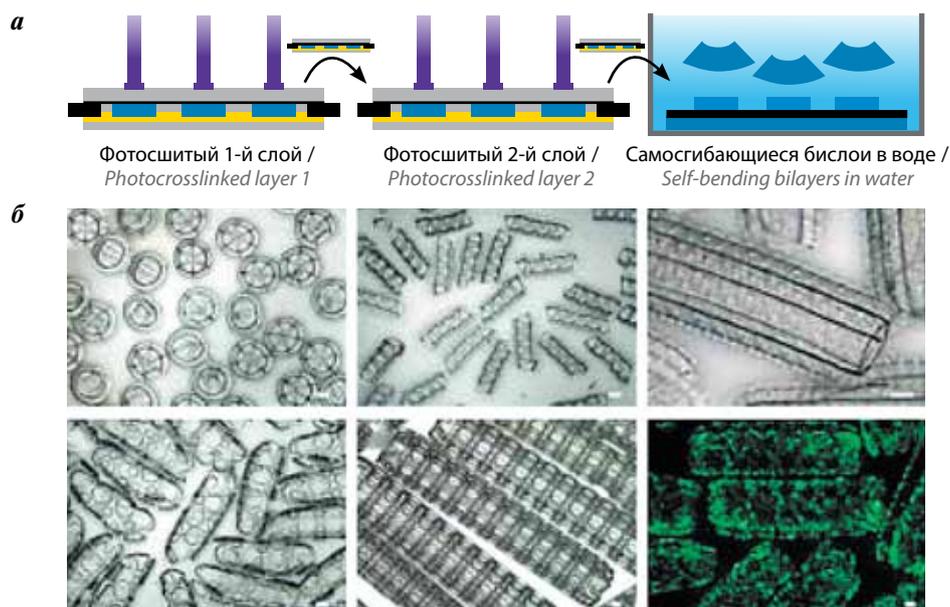
PEGDA. Другим примером светочувствительности является использование сшитой РНМА, функционализированной азобензольными группами, где облучение светом изменяет степень набухания [11]. У материалов, чувствительных к влаге, образуется изгиб, вызываемый полиэтиленгликолем (ПЭГ), производными азобензола, конъюгированными с ПЭГ и пленками агарозы, или материалами на основе целлюлозы [12, 13]. Полученные микрокапсулы, отпечатанные в виде двуслойных конструкций с использованием 1-[4-(2-гидроксиэтокси)фенил]-2-гидрокси-2-метил-1-пропан-1-она в качестве фотоинициатора, раскрываются под действием различий в характеристиках набухания слоев гидрогеля и преобразовывают свою форму для формирования микроструктурированных объектов. Подобный принцип адаптирован путем добавления не набухающего, но гибкого материала в качестве 2-го слоя для формирования соединений между жесткими линейными структурами. На рис. 3 изображена принципиальная схема, иллюстрирующая деформацию, вызванную осмотическим давлением [14].

Одним из важнейших этапов в применении СП стало создание сердечно-сосудистых стентов, способных деформироваться в ответ на изменяющуюся температуру при имплантировании в тело пациента. (Из-за сложной геометрии, требуемой для стентов, традиционные методы изготовления являются весьма трудоемкими. Однако, применяя 4D-печать, можно создавать стенты любого размера за короткое время и с минимальными затратами.) После имплантации

стента происходит охлаждение, и он возвращается к своей большей, клинически эффективной форме, где остается навсегда.

#### Применение 4D-печатных лекарственных форм в фармацевтической технологии

В 4D-печати СП в фармацевтической технологии применяются такие основные механизмы, как мукоадгезия ЛФ и инкапсуляция ФС. Мукоадгезивные ЛФ способны прикрепляться к кишечному эндотелию, благодаря чему они могут инициировать высвобождение ФС. Исследователи из Государственного университета Огайо разработали трехслойную мукоадгезивную систему доставки ЛС, предназначенную для применения ЛФ с замедленным высвобождением [15]. В ЛФ использовали чувствительный к pH гидрогель в качестве внешнего слоя, который при достижении pH 6,5 в тонкой кишке изменяет свою форму и захватывает кишечную стенку. Продемонстрировано, что ЛФ прилипает к стенкам тонкой кишки свиньи (с использованием буфера pH 6,5), обеспечивая более длительное время пребывания, чем стандартное время для пластыря из поликапролактона (103 и 72 мин соответственно), и сводит к минимуму воздействие ФС на кишечную жидкость. Благодаря этому самораскрывающемуся механизму представленной ЛФ слизисто-адгезивный слой с ЛС дольше прикрепляется к стенке кишечника, что позволяет большему количеству ФС проходить через эпителий слизистой оболочки (рис. 4).



**Рис. 3.** Набухание слоев: а – схема вида сбоку 3 основных стадий фотосшивания полиэтиленгликоль-бислоя; б – примеры геометрии самосгибающегося гидрогеля

**Fig. 3.** Layers swelling: а – 3 main stages of photocrosslinking of polyethylene glycol bilayer, side view diagram; б – examples of self-bending hydrogel geometry

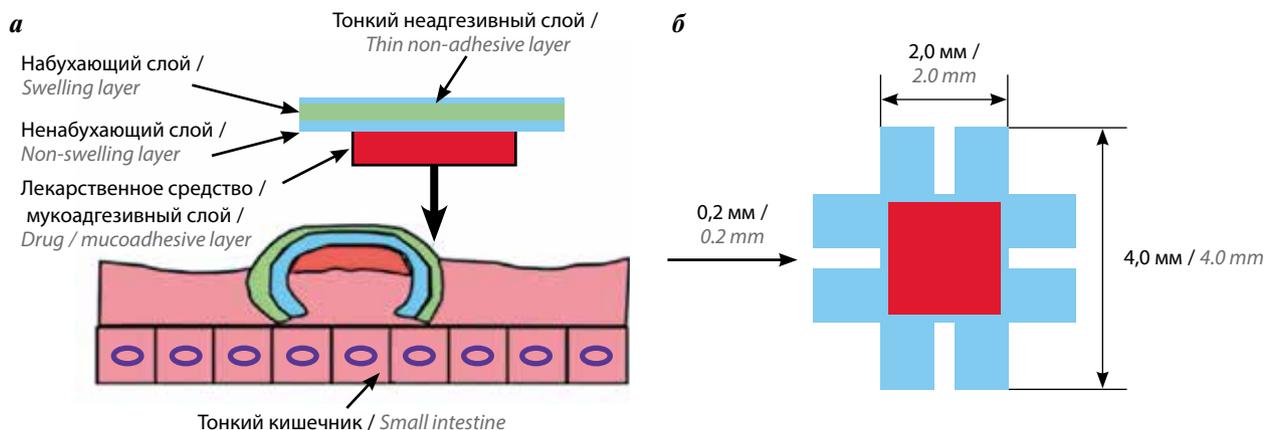


Рис. 4. Трехслойная слизисто-адгезивная система доставки лекарственных средств: а – принцип действия; б – размеры в раскрытом состоянии  
Fig. 4. Three-layer mucous-adhesive drug delivery system: a – principle of operation; б – dimensions in the open state

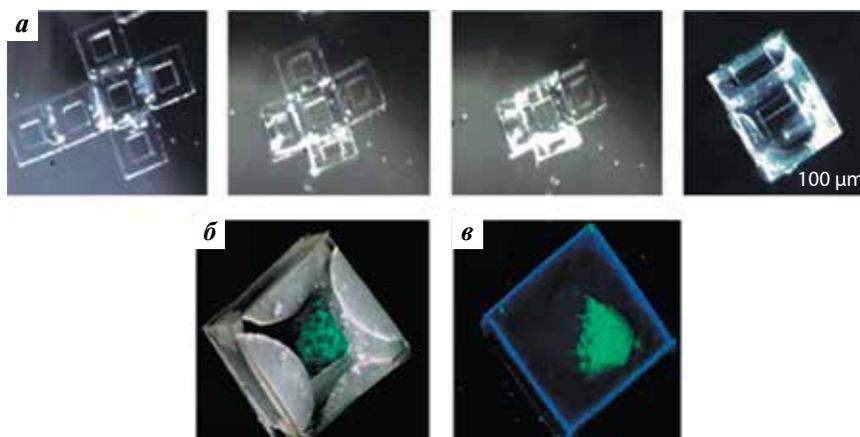


Рис. 5. Иллюстрация процесса самосгибания полимерного контейнера при 60 °С (а); подсвеченное (б) и флуоресцентное (в) изображение собранного непористого полимерного контейнера, содержащего окрашенные клетки фибробластов  
Fig. 5. Process of self-bending of the polymer container at 60 °C (a); an illuminated (б) and fluorescence (в) image of the assembled non-porous polymer container containing stained fibroblast cells

Еще один пример мукоадгезивной ЛФ, разработанной с использованием интеллектуальных материалов, — это термочувствительные ЛФ с многолучевым покрытием ЛС, также известные как терагрипперы [14, 16]. Принимая заданную конструкцию при воздействии температур выше 32 °С, эта ЛФ самопроизвольно прикрепляется к поверхности тканей, попадая в организм при комнатной температуре. Пористость структур позволяет дозировать ФС, которая затем высвобождается на протяжении срока до 7 дней, имея кинетику высвобождения 1-го порядка. Данные свойства продемонстрированы в исследованиях *in vitro*, в которых терагрипперы показали замедленное высвобождение доксорубина по сравнению с контролем. Опираясь на эту концепцию, некоторые исследователи включили наночастицы  $Fe_3O_4$  в пористый слой гидрогеля, как описано ранее [17].

Инкапсулированные 4D-печатные ЛФ представляют собой самораскрывающиеся конструкции,

которые изменяют свою форму, создавая контейнер, в который могут быть помещены ФС или даже клетки (рис. 5а) [7]. Фибробласты и  $\beta$ -клетки поджелудочной железы были инкапсулированы и демонстрировали жизнеспособность в течение более 1 нед после внедрения (рис. 5б, в) [18].

Клетки дрожжей также находились в данных ЛФ с использованием самораскрывающихся микрокапсул, которые могли высвободить указанное содержимое в зависимости от температуры окружающей среды [19]. Подобная технология подходит и для применения ЛФ для доставки энтеросолюбивого ЛС, в котором содержимое высвобождается при определенных раздражителях, будь то рН, заданное время или температура.

В других исследованиях создавали микрокапсулы, состоящие из бислоя гидрогеля, изготовленного с помощью метода 3D-печати стереолитографии [12]. рН-чувствительный гель действовал как один слой,

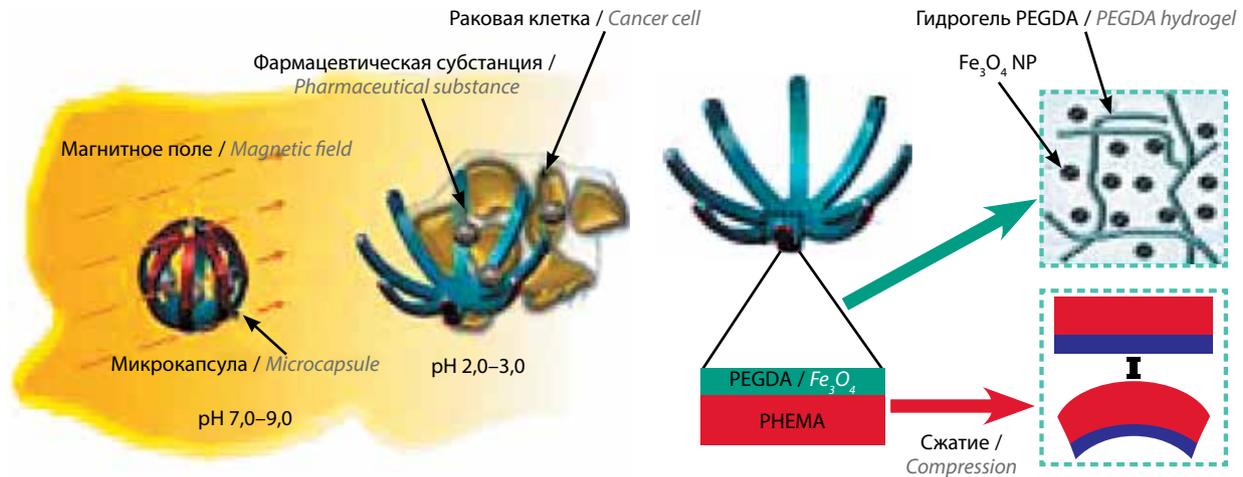


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая принцип действия микрокапсулы, которая может перемещаться под действием магнитных полей [12]  
 Fig. 6. A diagram illustrating the principle of operation of a microcapsule that can move under the influence of magnetic fields [12]

способный изменять морфологию структуры для улавливания и высвобождения ФС, в то время как другой слой содержал частицы  $Fe_3O_4$ , что позволяло управлять движением микрокапсул с помощью магнитного поля (рис. 6). В результате высокой скорости метаболизма микроокружения опухоли и низкого парциального давления кислорода рН опухолевой ткани составляет приблизительно 4,5–6,0 [20, 21]. Это используется микрокапсулой, которая предназначена для высвобождения своего содержимого после контакта с кислой опухолевой тканью. Микрогранулы, содержащие ФС доцетаксел, инкапсулировали с помощью данной ЛФ и транспортировали к клеткам, используя магнитную природу внешнего слоя.

Показано, что структура успешно высвобождает ЛС в предполагаемом месте, снижая жизнеспособность опухолевых клеток на 70 %. Сосредоточив высвобождение на опухолевой ткани, терапевтический эффект ЛС увеличивается, в то же время ограничивая количество ФС, которое проходит через системный кровоток. Следовательно, подобная ЛФ может не только повысить эффективность ЛС, но и снизить риск серьезных побочных эффектов, которые часто ограничивают использование многих противоопухолевых соединений.

#### Аспекты осуществления 4D-печати

Первоначально исследования по 4D-печати проводили на различных типах коммерческих 3D-принтеров. Однако при печати ЛФ с использованием адаптивных материалов исходное сырье может агломерироваться на обычных машинах, — в результате некоторые исследовательские группы разработали специальные 4D-принтеры. Например, J. Choi и соавт. создали принтер с экструзионным соплом, покрытым приспособленным для печати СП (в данном

случае термополиуретаном) [22]. Поскольку термополиуретан сжимается при нагревании, форсунка легко забивается. Чтобы преодолеть представленное затруднение, принтер содержит нагревательный слой для обеспечения достаточной циркуляции тепла во время процесса печати. При этом нагревательное устройство размещено рядом с соплом для минимизации потери тепла. Конструкция сопла значительно длиннее, чем в обычных машинах, и оно покрыто политетрафторэтиленом для уменьшения трения. Еще одним примером 4D-принтера является созданный Q. Ge и соавт. аппарат на основе стереолитографического принтера, отличительная особенность которого заключается в повышенной мощности лазера. Данная особенность необходима, поскольку для 4D-печати используют специальные фотоотверждаемые СП, требующие гораздо более высокой энергии воздействия, чем типичные полимеры на основе метакрилата [23].

Управляя структурой и ориентацией СП, можно вызывать определенные морфологические изменения в конечном продукте при воздействии соответствующих стимулов. Например, Q. Ge и соавт. создали структуру с волокнами СП, нанесенными в заданной ориентации [23]. После воздействия тепла печатная структура преобразуется в сложные формы с пространственно изменяющейся кривизной в зависимости от ориентации, в которой волокна были рассчитаны изначально. Следовательно, благодаря сочетанию адаптивных материалов и интеллектуального дизайна 4D-печать может создавать структуры со сложной морфологией. Так, 4D-печать может облегчить изготовление конструкций, слишком сложных для 3D-печати. Распечатав объект, имеющий простую для создания конструкцию, под воздействием специальных стимулов возможно преобразовать его в ЛФ

со сложной морфологией. Кроме того, путем первоначальной печати 2D-структур и превращения их под воздействием определенных стимулов в 3D-ЛФ можно избежать многих недостатков 3D-печати [24].

### Заключение

Для адаптивных материалов в аддитивной технологии производства ЛФ открываются широкие перспективы развития, заключающиеся в использовании уже существующих методов создания 3D-печати и СП. Данное сочетание ВВ и технологий печати способно создавать структуры, изменяющие свою конформацию в течение времени и в ответ на заранее запрограммированные стимулы. 4D-печать предлагает преимущество по созданию мукоадгезивных ЛФ, способных к целенаправленному прикреплению к тканям организма и более эффективному высвобождению ФС непосредственно в заданные участки. Возможности по инкапсуляции ЛС в СП открывают перспективы по созданию более эффективных и на-

правленных систем доставки, реагирующих на различные стимулы, в частности на изменение pH, наблюдаемое в опухолевых тканях.

Несмотря на то что 3D-печать все еще находится на начальном этапе развития в фармацевтической технологии, переход на 4D-печать является относительно простой задачей. Отличия 3D-печатных принтеров для 4D-печати небольшие, и есть возможность внести конструктивные изменения, которые рассматриваются для каждого частного случая. С помощью адаптивных материалов можно создавать и персонализированные 3D-ЛФ, используя более дешевую 2D-печать с последующей обработкой. При этом 4D-печатные ЛФ могут обеспечить целенаправленное высвобождение ФС, которое можно корректировать для каждого отдельного пациента. Однако, несмотря на перспективы развития 4D-печати, все же необходимо решение еще многих регуляторных, технологических и нормативных вопросов, а также более широкое внедрение 3D-печати ЛФ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Оборогова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов. *Российский химический журнал* 2012;56(3–4):33–40. [Oborotova N.A., Sanarova E.V. New pharmaceutical technologies to increase antitumor drugs selectivity. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal = Russian Chemical Journal* 2012;56(3–4):33–40. (In Russ.)].
- Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):21–7. [Dmitrieva M.V., Oborotova N.A., Sanarova E.V. et al. Nanostructured anticancer drug delivery systems. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2012;11(4):21–7. (In Russ.)].
- Тазина Е.В., Оборотова Н.А. Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии. *Российский биотерапевтический журнал* 2008;7(3):4–12. [Tazina E.V., Oborotova N.A. Thermosensitive liposomes and local hyperthermia for selective drug delivery to a tumor. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2008;7(3):4–12. (In Russ.)].
- Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3):101–8. [Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Sanarova E.V. et al. A pharmaceutical technology to increase drugs bioavailability. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2014;13(3):101–8. (In Russ.)].
- Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. Технологии трехмерной печати при создании твердых лекарственных форм. Разработка и регистрация лекарственных средств 2018;3(24):10–9. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. Three-dimensional printing technology for the production of dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration* 2018;3(24):10–9. (In Russ.)].
- Наркевич И.А., Флисюк Е.В., Терентьева О.А. и др. Аддитивные технологии для фармацевтики. *Химико-фармацевтический журнал* 2017;51(11):40–4. DOI: 10.30906/0023-1134-2017-51-11-40-44. [Narkevich I.A., Flisyuk E.V., Terent'eva O.A. et al. Additive manufacturing technologies for pharmaceuticals. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal* 2017;51(11):40–4. (In Russ.)].
- Breger J.C., Yoon C., Xiao R. et al. Self-folding thermo-magnetically responsive soft microgrippers. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7(5):3398–405. DOI: 10.1021/am508621s.
- Gladman A.S., Matsumoto E.A., Nuzzo R.G. et al. Biomimetic 4D printing. *Nat Mater* 2016;15(4):413–8. DOI: 10.1038/nmat4544.
- Campbell T.A., Tibbits S., Garrett B. The next wave: 4D printing. *Programming the material world*. Washington: Atlantic Council, 2014.
- Zhao X., Kim J., Cezar C.A. et al. Active scaffolds for on-demand drug and cell delivery. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(1):67–72. DOI: 10.1073/pnas.1007862108.
- Unger K., Salzmann P., Masciullo C. et al. Novel light-responsive biocompatible hydrogels produced by initiated chemical vapor deposition. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9(20):17408–16. DOI: 10.1021/acsami.7b01527.
- Manchun S., Dass C.R., Sriamornsak P. Targeted therapy for cancer using pH-responsive nanocarrier systems. *Life Sci* 2012;90(11–12):381–7. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.01.008.
- Zhang L., Liang H., Jacob J., Naumov P. Photogated humidity-driven motility. *Nat Commun* 2015;6:7429. DOI: 10.1038/ncomms8429.
- Zhang K., Geissler A., Standhardt M. et al. Moisture-responsive films of cellulose stearoyl esters showing reversible shape transitions. *Sci Rep* 2015;5:11011. DOI: 10.1038/srep11011.

15. Jamal M., Kadam S.S., Xiao R. et al. Bio-origami hydrogel scaffolds composed of photocrosslinked PEG bilayers. *Adv Healthc Mater* 2013;2(8):1142–50. DOI: 10.1002/adhm.201200458.
16. He H., Guan J., Lee J.L. An oral delivery device based on self-folding hydrogels. *J Control Release* 2006;110(2):339–46. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.10.017.
17. Malachowski K., Breger J., Kwag H.R. et al. Stimuli-responsive theragrippers for chemomechanical controlled release. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(31):8045–9. DOI: 10.1002/anie.201311047.
18. Yoon C., Xiao R., Park J. et al. Functional stimuli responsive hydrogel devices by self-folding. *Smart Mater Struct* 2014;23(9):094008. DOI: 10.1088/0964-1726/23/9/094008/meta.
19. Li H., Go G., Ko S.Y. et al. Magnetic actuated pH-responsive hydrogel-based soft micro-robot for targeted drug delivery. *Smart Mater Struct* 2016;25(2):027001. DOI: 10.1088/0964-1726/25/2/027001/meta.
20. Tong Z.Q., Luo W.H., Wang Y.Q. et al. Tumor tissue-derived formaldehyde and acidic microenvironment synergistically induce bone cancer pain. *PloS One* 2010;5(4):10234. DOI: 10.1371/journal.pone.0010234.
21. Azam A., Laflin K.E., Jamal M. et al. Self-folding micropatterned polymeric containers. *Biomed Microdevices* 2011;13(1):51–8. DOI: 10.1007/s10544-010-9470-x.
22. Choi J., Kwon O.C., Jo W. et al. 4D printing technology: a review. *3D Printing and Additive Manufacturing* 2015;2(4):159–67. DOI: 10.1089/3dp.2015.0039.
23. Ge Q., Sakhaei A.H., Lee H. et al. Multimaterial 4D printing with tailorable shape memory polymers. *Sci Rep* 2016;6:31110. DOI: 10.1038/srep31110.
24. Stoychev G., Pureskiy N., Ionov L. Self-folding all-polymer thermoresponsive microcapsules. *Soft Matter* 2011;7(7):3277–9. DOI: 10.1039/C1SM05109A.

#### Вклад авторов

К.В. Алексеев: разработка дизайна обзора, анализ полученных данных;  
 Е.В. Блынская: разработка дизайна обзора, обобщение материала обзора;  
 С.В. Тишков: получение материала обзора, написание текста рукописи;  
 В.К. Алексеев: обзор публикаций по теме;  
 А.А. Иванов: анализ материала обзора.

#### Authors contributions

K.V. Alekseev: development of the review design, data analysis;  
 E.V. Blynskaya: development of the review design, generalization of the review material;  
 S.V. Tishkov: obtaining review material, writing manuscript text;  
 V.K. Alekseev: review of publications on the topic;  
 A.A. Ivanov: analysis of the review material.

#### ORCID авторов/ORCID of authors

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

Статья поступила: 17.03.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 17.03.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.

## СТЕРОИДНЫЕ КОНЬЮГАТЫ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ

В.А. Золотцев<sup>1</sup>, А.С. Латышева<sup>1</sup>, В.С. Покровский<sup>1-3</sup>, И.И. Хан<sup>3</sup>, Р.Л. М. Алманза<sup>3</sup>, А.Ю. Мишарин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»;  
Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10;

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

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

**Контакты:** Вадим Сергеевич Покровский [vadimpokrovsky@yandex.ru](mailto:vadimpokrovsky@yandex.ru)

Обзор посвящен результатам исследований новых стероидных конъюгатов, имеющих перспективу использования в качестве противоопухолевых лекарственных препаратов. Обзор состоит из 3 частей, в которых представлены данные о биологической активности конъюгатов стероидов с известными лекарственными препаратами, стероидных димеров и конъюгатов стероидов с различными природными соединениями, их фрагментами и синтетическими аналогами. Приведены структуры 231 стероидного конъюгата и данные об их противоопухолевой активности.

**Ключевые слова:** стероидные конъюгаты, антипролиферативная активность, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-22-52



### STEROID CONJUGATES AS POTENTIAL ANTI-CANCER AGENTS

V.A. Zolotsev<sup>1</sup>, A.S. Latysheva<sup>1</sup>, V.S. Pokrovsky<sup>1-3</sup>, I.I. Khan<sup>3</sup>, R.L. M. Almanza<sup>3</sup>, A.Y. Misharin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya St., Moscow 119121, Russia;

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

<sup>3</sup>Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University); 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia

The review is dedicated to results of investigations of steroid conjugates published predominantly over the past decade. It consists of three parts in which the data concerning biological activity of steroid conjugates with known drugs, steroid dimers, and steroid conjugates with some natural compounds, their fragments and related derivatives and analogs, are discussed. The structures of 231 steroid conjugates and their anti-cancer properties are presented.

**Key words:** steroid conjugates, anti-proliferative activity, anti-cancer activity

#### Введение

Одно из бурно развивающихся направлений современной биомедицинской химии — создание новых лекарств на основе гибридов и конъюгатов биологически активных молекул, в первую очередь природных соединений. Считается, что такие препараты, обладающие высокой избирательностью и эффективностью, могут служить существенным дополнением и/или альтернативой традиционной комбинированной терапии. Присутствие нескольких фармакофоров в 1 молекуле конъюгата может усиливать его биологический эффект, направлять действие сразу на несколько биомишеней, снижать побочные эффекты.

В настоящее время устойчивая терминология в области гибридов и конъюгатов еще не сформировалась, и для описания сложных полифункциональных молекул одни авторы используют термины

«гибрид» и «конъюгат», не делая различия между ними, другие предлагают называть конъюгатом молекулу, в которой функциональные фрагменты 2 или более фармакофоров связаны линкером, а гибридом — молекулу, в составе которой можно вычленить функциональные группы, принадлежащие разным фармакофорам.

Различным аспектам создания и применения гибридов и конъюгатов посвящены многочисленные обзоры [1–10]. Кроме того, опубликованы обзоры, посвященные новым направлениям, сформировавшимся недавно: синтезу полифункциональных биосовместимых наноматериалов, синтезу библиотек конъюгатов на основе определенных фармакофоров и направленных на определенные биомишени, созданию QSAR-моделей гибридов и конъюгатов [2, 3, 11–22].

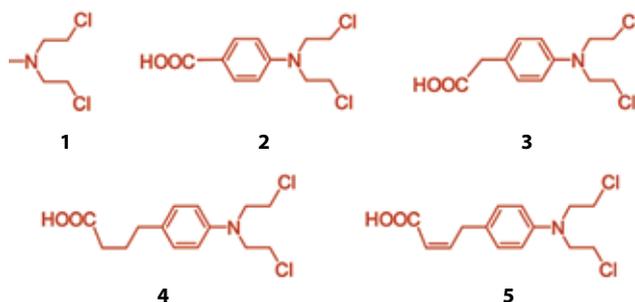
Данный обзор посвящен обобщению результатов современных исследований стероидных конъюгатов, имеющих перспективу использования в качестве противоопухолевых лекарственных препаратов (ЛП). Приведены данные о структуре и противоопухолевой активности конъюгатов стероидов с известными лекарствами, стероидных димеров, а также конъюгатов стероидов с фрагментами некоторых биологически активных молекул. Работы, посвященные исследованию стероидных полимерных и дендримерных конъюгатов, выходят за рамки этого обзора и не рассматриваются.

### Конъюгаты стероидов с лекарственными препаратами

Еще в середине XX в. была выдвинута гипотеза, что конъюгаты стероидов с известными лекарствами, в первую очередь с ДНК-алкилирующими агентами, могут с успехом использоваться для лечения гормонозависимых форм онкологических заболеваний, таких как рак молочной железы (РМЖ), предстательной железы, яичников, эндометрия и др. [23–26].

Первые синтезированные стероидные конъюгаты с производными бис-(2-хлорэтил)-амина (рис. 1) содержали остаток эстрона или андростана, замещенный в положении 3-, 2- или 17-третичной аминогруппой, где другими заместителями являлись 2-хлорэтильные остатки, однако эти конъюгаты не обладали заметной противоопухолевой активностью.

В обзоре R. Vansal и соавт., охватывающем литературу до 2012 г., приведены многочисленные примеры противоопухолевых препаратов – конъюгатов ДНК-алкилирующих агентов со стеринами, стероидами ряда андростана, эстрона, прегнана, а также их производными, содержащими различные замести-



**Рис. 1.** Структуры наиболее распространенных производных бис(2-хлорэтил)амина: 1 – остаток бис(2-хлорэтил)амина; 2 – *n*-[*N,N*-бис(2-хлорэтил)амино]бензойная кислота; 3 – [*N,N*-бис(2-хлорэтил)амино]фенилуксусная кислота; 4 – [*N,N*-бис(2-хлорэтил)амино]фенилмасляная кислота; 5 – *n*-[*N,N*-бис(2-хлорэтил)амино]фенилбут-2-еновая кислота

**Fig. 1.** Structures of the most known derivatives of bis(2-chloroethyl)-amine: 1 – bis(2-chloroethyl)-amine residue; 2 – *n*-[*N,N*-bis(2-chloroethyl) amino]-benzoic acid; 3 – [*N,N*-bis(2-chloroethyl)amino]phenylacetic acid; 4 – [*N,N*-bis(2-chloroethyl) amino]phenylbutyric acid; 5 – [*N,N*-bis(2-chloroethyl)amino]phenylbut-2-enoic acid

тели и/или структурные модификации колец А, В, С и D. Структуры некоторых из перечисленных конъюгатов изображены на рис. 2 [27].

Синтезированный в СССР конъюгат *n*-[*N,N*-бис(2-хлорэтил)амино]фенилуксусной кислоты **3** и холестерина – фенестерин **6** – эффективно подавлял рост саркомы 45, опухоли мозга, карциномы Уокера и альвеолярной карциномы печени RS-1 у мышей, но оказался неактивным в лечении карциномы Эрлиха и саркомы 180 [28–30]. Аналоги фенестерина, различающиеся стероидным фрагментом и положением *n*-[*N,N*-бис(2-хлорэтил)амино]фенилуксусной кислоты, подавляли рост различных опухолей у мышей.

Были синтезированы многочисленные конъюгаты ДНК-алкилирующих агентов (**1–5**) с различными стероидами и их производными. Согласно современным представлениям, стероидная часть конъюгата не только является биологическим вектором для направленной доставки алкилирующего фрагмента, но и обеспечивает образование специфических комплексов с ДНК и препятствует действию ферментов репарации. Конъюгаты проявляли противоопухолевый эффект, отличающийся от такового и для стероида, и для алкилирующего агента [31–36].

Так, исследования противоопухолевого препарата эстрамустина фосфата **7** показали, что этот конъюгат лишен ДНК-алкилирующей активности, а его противоопухолевый эффект обусловлен взаимодействием с тубулином, вызывающим деполимеризацию микротрубочек, а также влиянием на цитоскелет, клеточный цикл, гомеостаз железа, апоптоз и клеточный сигналинг [37–40].

Биологическая активность конъюгата зависит от структур стероидной части, алкилирующего агента, линкера, а также от места присоединения линкера к стероиду. Следует отметить, что противоопухолевой активностью обладают конъюгаты, содержащие легко гидролизуемую сложноэфирную связь, в то время как соответствующие третичные амины неактивны.

Конъюгат преднизолона и хлорамбуцила – преднимустин **8** – оказался намного эффективнее, чем хлорамбуцил против саркомы Йошида, но на саркому Эрлиха, устойчивую к хлорамбуцилу, преднимустин не действовал [41–45]. Бестрабуцил **9** накапливался в опухоли в 5–10 раз активнее, чем в неповрежденной ткани [46]. Конъюгаты гомо-А-азастероидов **10** и **11** были активны против карциномы Эрлиха, нескольких линий аденокарциномы толстой кишки и легких; оба конъюгата подавляли рост лимфолейкоза P338, но только конъюгат **10** латестоксат был активен против лимфолейкоза L1210 [47–49].

Конъюгаты, содержащие аллильную 7-кетогруппу **13–15**, проявляли большую генотоксическую и антилейкемическую активность по сравнению со

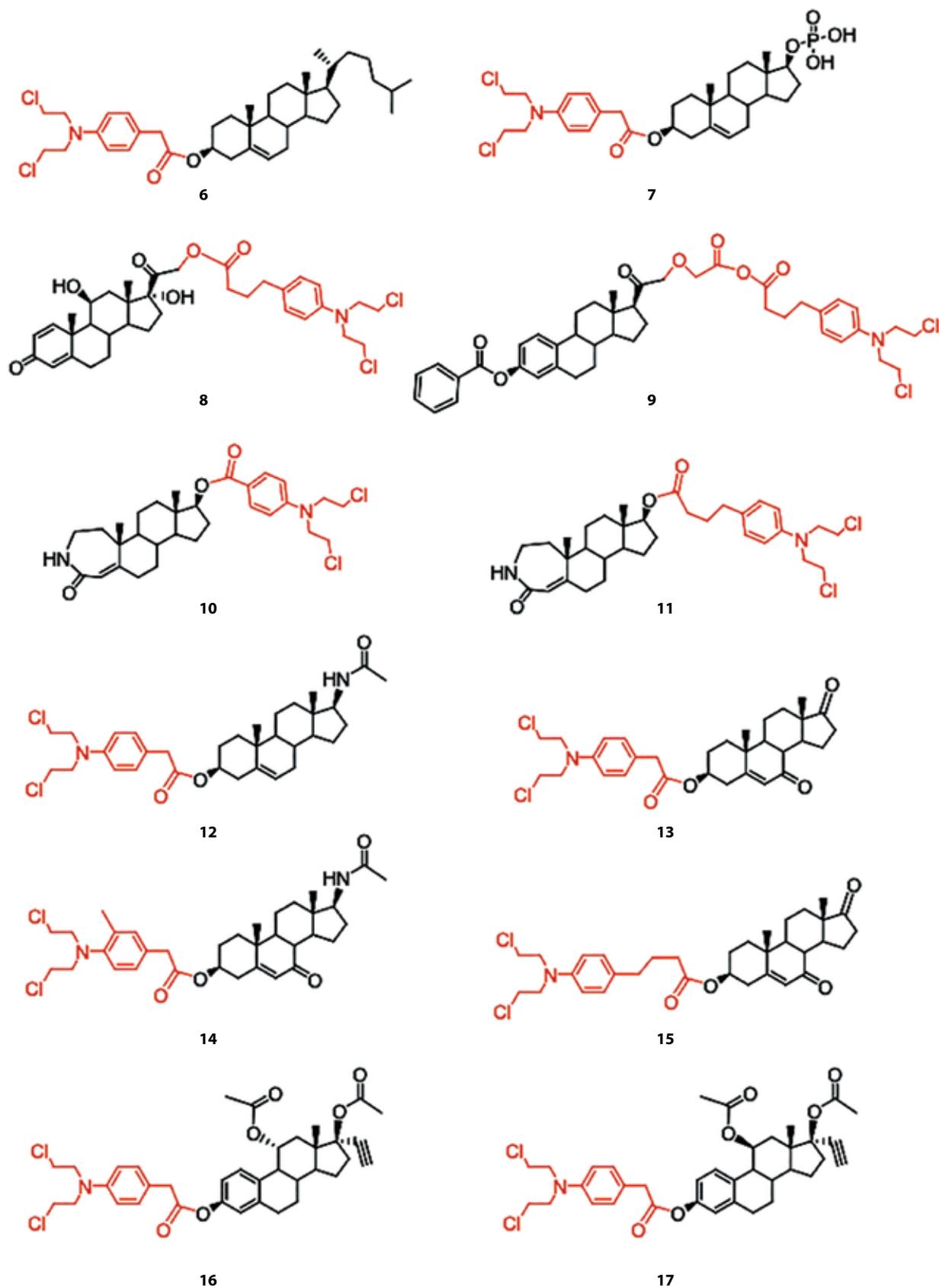


Рис. 2. Конъюгаты стероидов и стероидов с производными бис(2-хлорэтил)амин: 6–17

Fig. 2. Conjugates of sterols and steroids with derivatives of bis(2-chloroethyl)amine: 6–17

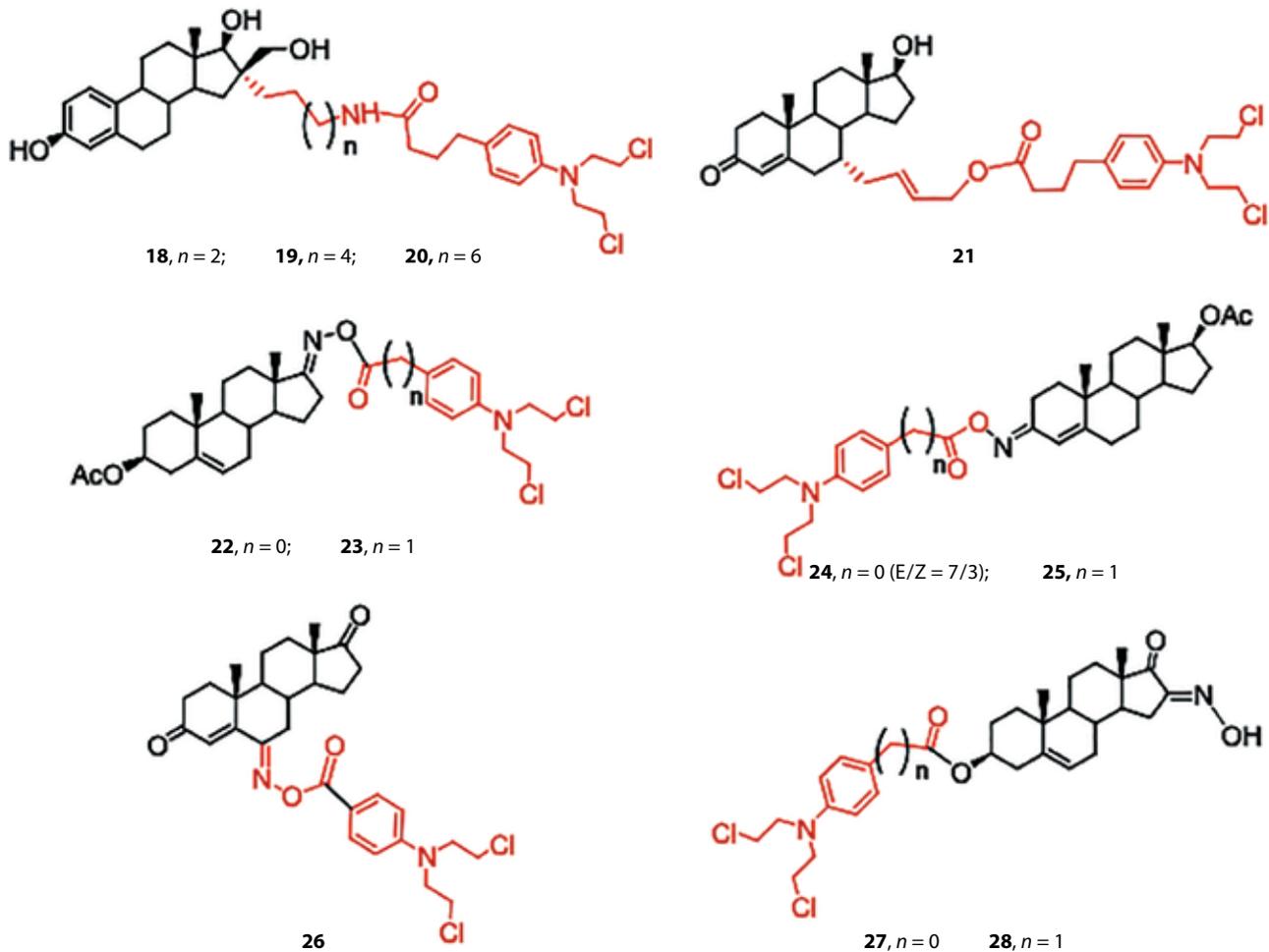


Рис. 3. Конъюгаты производных эстрадиола, тестостерона и андростендиона с производными бис(2-хлорэтил)амина: 18–28  
 Fig. 3. Conjugates of derivatives of estradiol, testosterone and androstenedione with derivatives of bis(2-chloroethyl)amine: 18–28

структурно-родственными конъюгатами, лишенными 7-кетогруппы **12** [50, 51]. Эстрансодержащие конъюгаты **16** и **17** были активны против РМЖ и аденокарциномы Ca-755, но  $11\alpha$ -ацетокси-изомер **16** проявлял антиэстрогенную активность, а соответствующий  $11\beta$ -изомер **17** – значительную эстрогенную активность [52–54].

В работах А. Gupta и соавт. были получены новые конъюгаты хлорамбуцила **18–21**, различающиеся структурой и местом присоединения линкера к стероидному фрагменту [55, 56].

16-замещенные конъюгаты **18–20** были менее токсичны на культуре клеток РМЖ MCF-7, чем хлорамбуцил, причем цитотоксичность зависит от длины линкера (чем короче длина линкера, тем выше цитотоксичность). Цитотоксичность  $7\alpha$ -замещенного конъюгата **21** на клетках карциномы предстательной железы LNCaP была сравнима с токсичностью хлорамбуцила.

Р.С. Acharya и R. Vansal синтезировали стероидные конъюгаты **22–28**, в которых ДНК-алкилирую-

щая группа связана с оксимом стероида O-ацильной связью [57]. Все конъюгаты **22–28** обладали выраженной ДНК-алкилирующей активностью (более сильной, чем хлорамбуцил) и высокой цитотоксичностью на культуре клеток карциномы яичников IGROV1. Конъюгаты, содержащие модификации в кольце D, обладали сильной противоопухолевой активностью и меньшей общей токсичностью во многих клеточных линиях.

D. Trafalis и соавт. синтезировали и исследовали 4 азастероидных конъюгата **29–32** (рис. 4) [58]. Конъюгаты обладали низкой общей токсичностью и показали сильную противолейкозную активность *in vitro* и *in vivo*.

В работах С. Sanchez-Cano и соавт. были получены и исследованы конъюгаты тестостерона с 3-пиридилзамещенными платиновыми комплексами **33** и **34** (рис. 5) [59, 60].

Конъюгаты **33** и **34** эффективно интернализировались клетками SKOV-3 (андрогеннезависимыми) и T47D (андрогензависимыми) и показали высокую

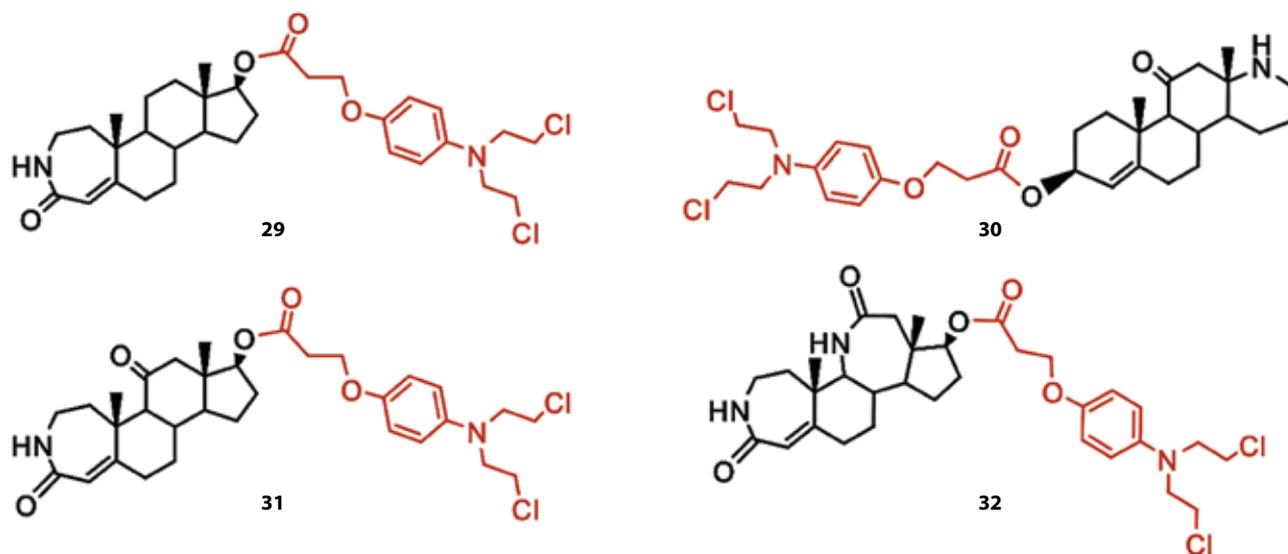


Рис. 4. Конъюгаты азастероидов с производными бис(2-хлорэтил)амин: 29–32

Fig. 4. Conjugates of azasteroids with derivatives of bis(2-chloroethyl)amine: 29–32

цитотоксичность, а соответствующие металлокомплексы, в которых стероид отсутствовал, имели незначительную токсичность; цис-конъюгат **33** был в 2–3 раза активнее транс-конъюгата **34** [59]. Конъюгаты **33** и **34** связывались с ДНК, значительно меняя ее структуру и вызывая разрывы одной цепи, в отличие от комплексов, не содержащих стероида, которые вызывали разрыв обеих цепей. Авторы считают, что использование стероидных конъюгатов платиновых металлокомплексов вместо неконъюгированных агентов позволяет улучшить доставку препарата, вызвать более специфичные разрывы ДНК и влиять на механизмы репарации ДНК [60].

В лаборатории G. Verubé был синтезирован ряд эстрадиол-платиновых (II) конъюгатов **35–43** [61–65] (см. рис. 5). Конъюгаты эстрадиола с дихлорплатиной **35**, **36** и **37** обладали цитотоксичностью в микромолярных концентрациях, наибольшей активностью обладали соединения, имеющие длину линкера 10–11 метиленовых звеньев (для соединений **35** и **36**), и 2 оксиэтиленовых звена для соединения **37**. Несмотря на то что конъюгаты **35–37** обладали большим сродством к эстрогенному рецептору, чем 17β-эстрадиол, существенных различий в их цитотоксичности на эстрогензависимых и эстрогеннезависимых клеточных линиях обнаружено не было.

Изучение конъюгатов эстрадиола **38–43**, содержащих в своем составе остатки карбоплатина и оксалилплатина, показало, что модификация оксалилплатином (II) незначительно влияет на антипролиферативную активность, а модификация циклобутан-1,1-дикарбоксилатплатином (II) ее сильно снижает. Конъюгаты **39**, **41**, **43** обладали сродством к эстрогенному рецептору α, а конъюгаты **38**, **40**, **42** – не обладали,

что указывает на важность структуры платиновой соли конъюгата для избирательности по отношению к эстрогенному рецептору α.

В лаборатории G. Verubé были синтезированы конъюгаты 17β-ацетокситестостерона с различными аминокислотными остатками и их платиновыми комплексами, связанные транс-оксибутенильным линкером в положении 7α [66]: **44–61** (рис. 6).

Конъюгаты, не содержащие платины (II), не влияли на пролиферацию клеток рака предстательной железы линий PC-3, DU145 и LNCaP или имели незначительную антипролиферативную активность. Комплексообразование аминокислотного остатка конъюгата с платиной (II) приводило к многократному увеличению цитотоксичности; структура аминокислотного остатка незначительно влияла на активность соединений; подавление роста андрогензависимых (LNCaP) и андрогеннезависимых (PC-3, DU145) клеток различалось незначительно. Наиболее активными соединениями оказались конъюгаты с комплексами L- и D-2-пиридилаланина и L-4-тиазолилаланина с платиной (II) (соединения **56**, **57** и **61**).

В работах других исследователей синтезированы конъюгаты тестостерона, содержащие комплексы Re (V) и радиоактивного <sup>99</sup>Tc, а также конъюгаты эстрадиола, содержащие комплексы Pd, Ni и Zn **62–68** (рис. 7) [67–69].

Конъюгат **64** накапливался в предстательной железе крыс. Он может быть использован в качестве метки для радиодиагностики и радиотерапии [68]. Конъюгаты **66–68** обладали определенным сродством к эстрогенному рецептору (≈2 % связывания эстрадиола) и проявляли свойства агонистов этого рецептора [69]. 16-замещенные ферроценовые конъюгаты

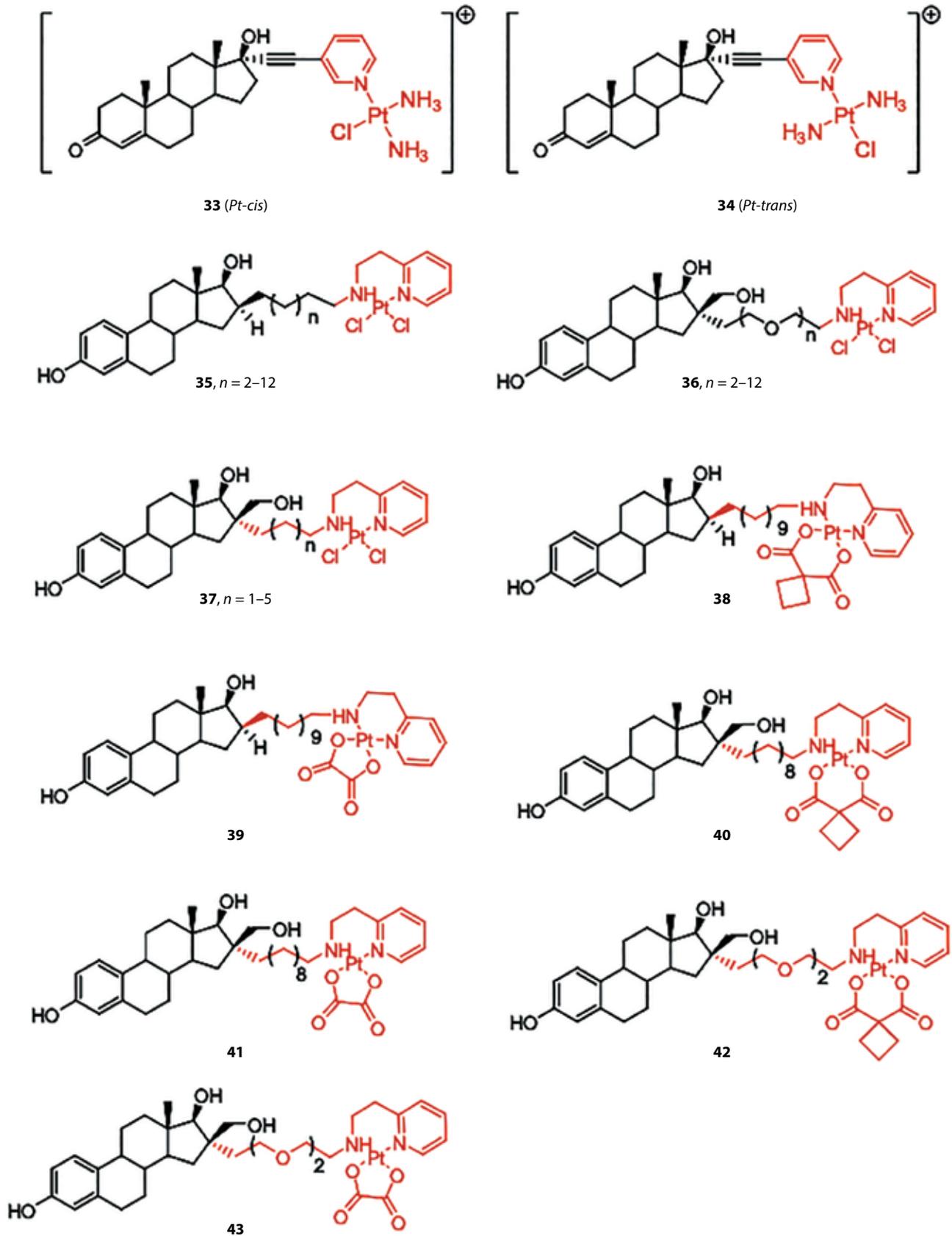


Рис. 5. Конъюгаты 16-замещенных производных тестостерона и эстрадиола с комплексами платины (II): 33–43

Fig. 5. Conjugates of 16-substituted derivatives of testosterone and estradiol with platinum (II) complexes: 33–43

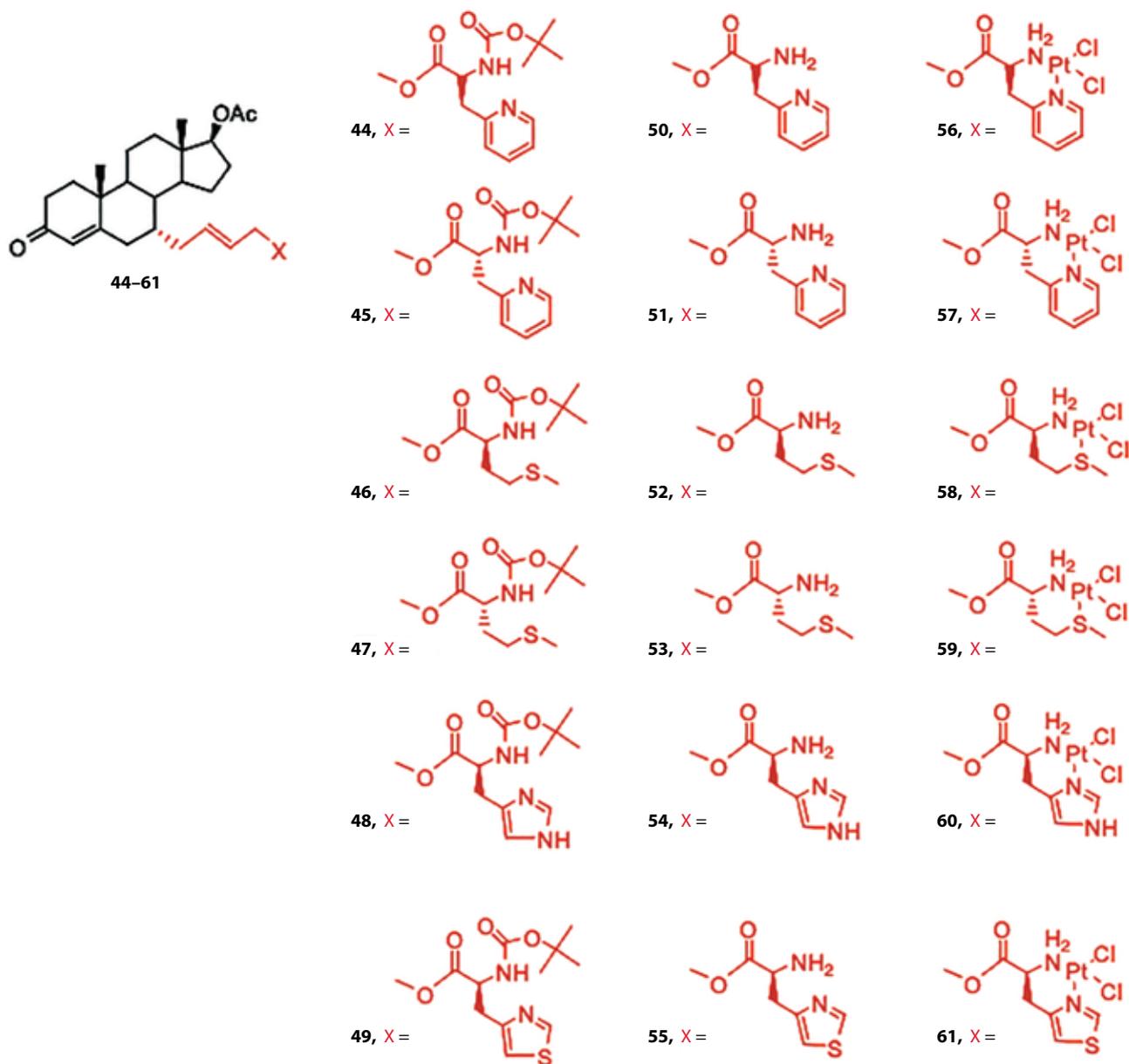


Рис. 6. Конъюгаты 7 $\alpha$ -замещенного 17 $\beta$ -ацетоксистеростерона с аминокислотами и их платиновыми комплексами: 44–61

Fig. 6. Conjugates of 7 $\alpha$ -substituted 17 $\beta$ -acetoxytestosterone with amino acids and their platinum complexes: 44–61

18-норандростана 69–72 (см. рис. 7) подавляли активацию TRPV1-рецептора в нейронах, связываясь с плазматической мембраной, изменяя структуру липидных рафтов и влияя на функционирование ионных каналов [70].

Доксорубин — один из наиболее эффективных противоопухолевых препаратов антрациклинового ряда. В основе противоопухолевого действия доксорубина лежат 2 процесса: образование свободных радикалов и интеркарирование в двойную спираль ДНК. Доксорубин не обладает тканеспецифичностью, поэтому существенным ограничением его использования являются побочные эффекты, в первую

очередь кумулятивная кардиотоксичность. Чтобы увеличить специфичность доксорубина и снизить вероятность побочных эффектов, в исследованиях G.M. Anstead и соавт. были получены конъюгаты доксорубина со стероидами эстранового ряда 73–76 (рис. 8) и изучено их взаимодействие с клетками РМЖ MCF-7 [71–74].

Конъюгаты 73–75 не показали высокой активности и специфичности. Конъюгат 76 имел сродство к клеткам MCF-7, но его антипролиферативная активность была незначительной. Тем не менее результаты исследований G.M. Anstead и соавт. позволили сформулировать структурные требования, которым

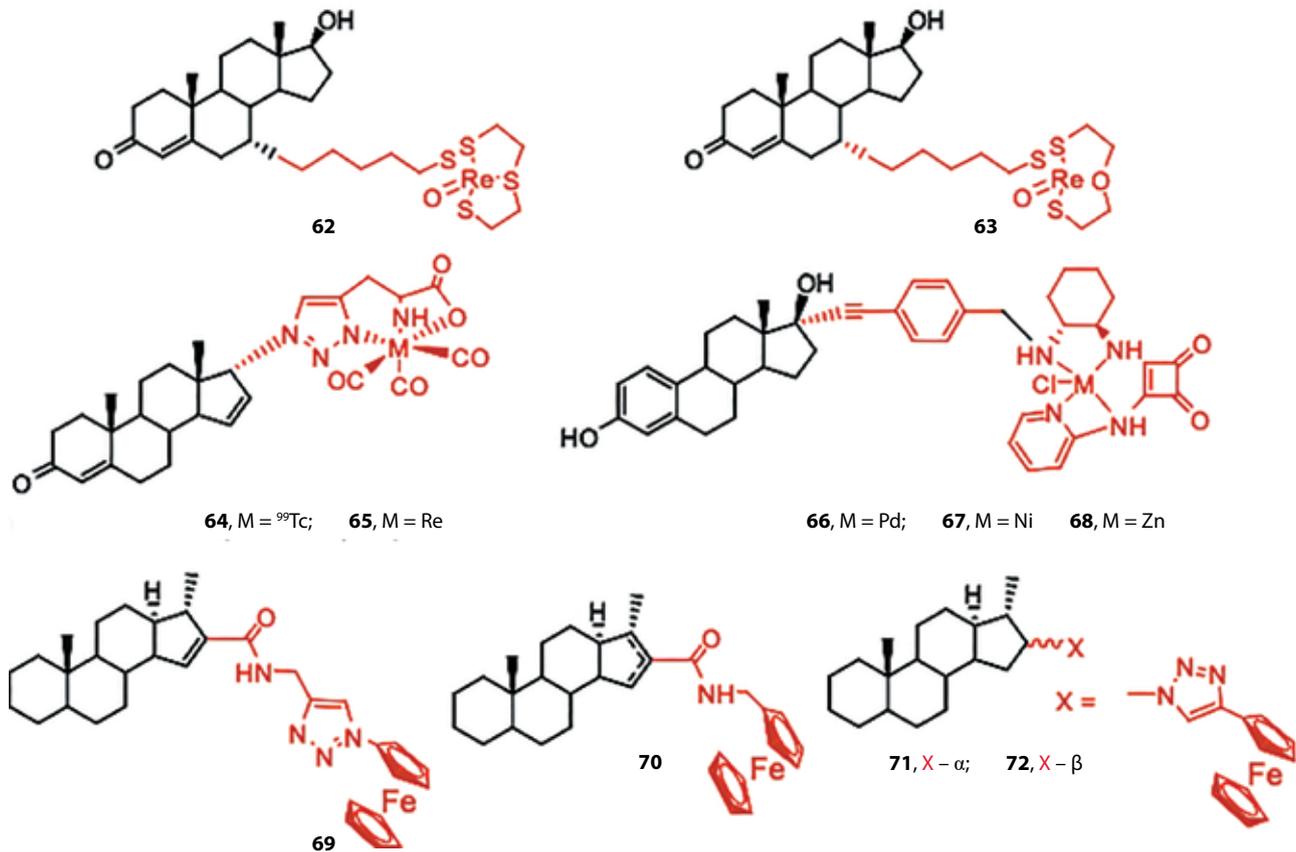


Рис. 7. Конъюгаты стероидов с металлокомплексами 62–72

Fig. 7. Conjugates of steroids with metal complexes 62–72

должен удовлетворять стероидный конъюгат доксорубина: наличие свободной гидроксильной группы в положении 3 и наличие в положении 17 группы, способной к образованию водородной связи [71–73].

В исследовании P. Saha и соавт. описан синтез новых конъюгатов доксорубина 77–80, удовлетворяющих этим требованиям, а также проведено исследование их сродства к эстрогеновому рецептору  $\alpha$  и антипролиферативной активности на культурах клеток HT-29 (рак толстой кишки), M21 (меланома), MCF-7 и MDA-MB-231 (РМЖ) [74]. Результаты продемонстрировали, что биологическая активность конъюгата зависит от длины линкера: конъюгаты 77–79 обладали сродством к эстрогеновому рецептору  $\alpha$  (в концентрации <100 нМ), конъюгат 80 не взаимодействовал с рецептором (в концентрациях до 215 нМ), только конъюгат 77 подавлял пролиферацию клеток MCF-7 и HT-29, но был малоактивным на клетках M21 и MDA-MB-231. Конъюгаты 78–80, обладающие длинным линкером, были малоактивными на всех тестируемых клетках. Авторы считают конъюгат 77 перспективным кандидатом для разработки препарата для лечения эстрогензависимых онкологических заболеваний.

В исследовании В. Саи и соавт. было получено 4 конъюгата диосгенина с метотрексатом 81–84 (рис. 9) [75]. Все конъюгаты подавляли рост клеток MDA-MB-231 и активность дигидрофолатредуктазы сильнее, чем неконъюгированный метотрексат; наибольшую активность проявлял конъюгат 81, содержащий дисульфидную связь в линкере.

V. Srekanth и соавт. дали описание синтеза конъюгатов тамоксифена (антиэстрогена, применяемого при лечении РМЖ) с литохолевой, дезоксихолевой и холевой кислотами, а также с амидами соответствующих желчных кислот 85–90 (рис. 10) [76]. Опыты *in vitro* и *in vivo* показали, что все конъюгаты обладают большей активностью, чем неконъюгированный тамоксифен; конъюгат 90 показал наивысшую антипролиферативную активность в эстрогензависимых и эстрогеннезависимых клетках; он вызывал блокаду клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub> и апоптоз в клетках MCF-7. Конъюгаты, содержащие амидные группы, были более активны, чем соответствующие карбоновые кислоты. Более высокую активность конъюгатов по сравнению с тамоксифеном авторы объясняли большим числом заряженных групп и более высокой гидрофобностью конъюгатов.

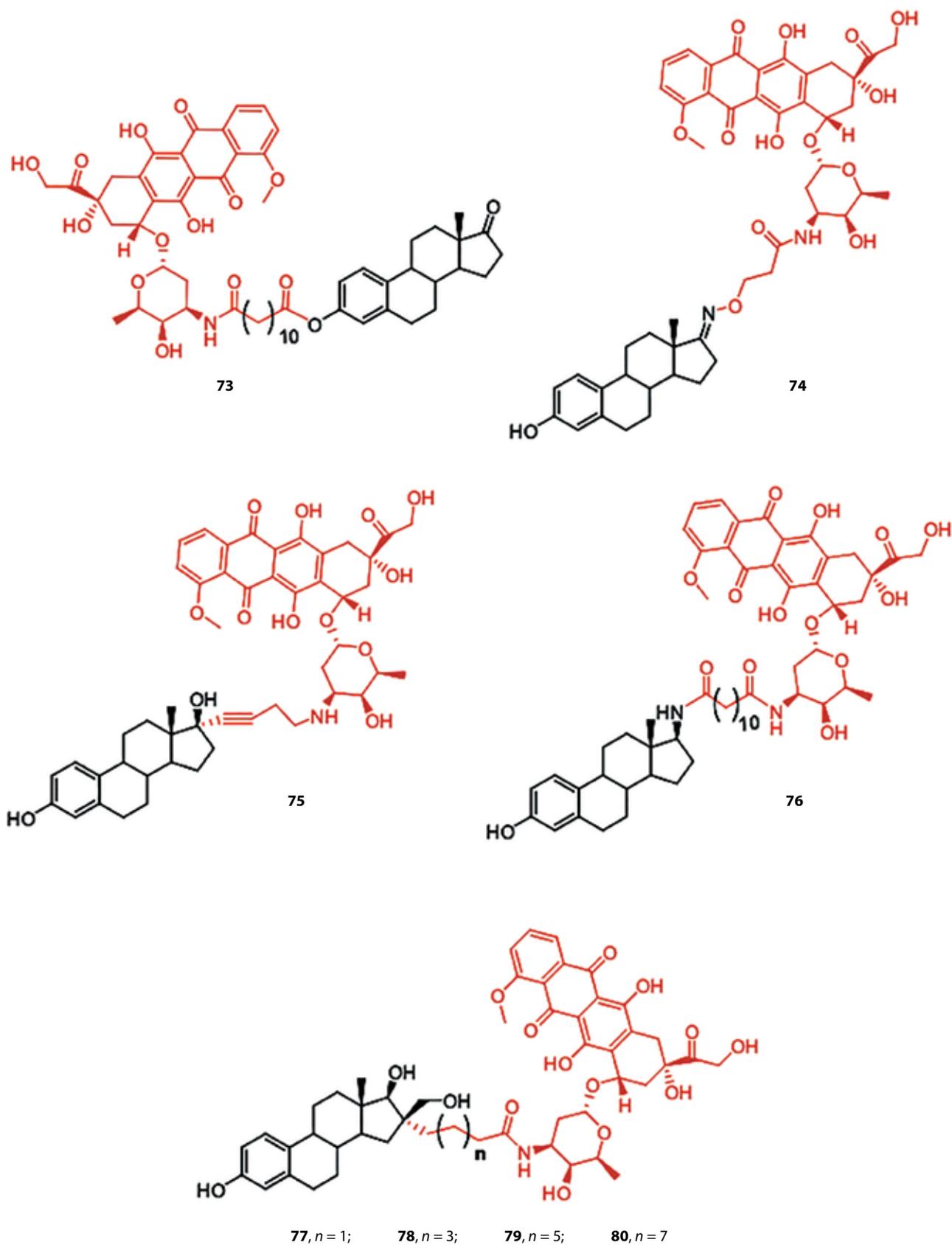


Рис. 8. Конъюгаты стероидов эстранового ряда с доксорубицином: 73–80

Fig. 8. Steroid conjugates of estrane serie with doxorubicine: 73–80

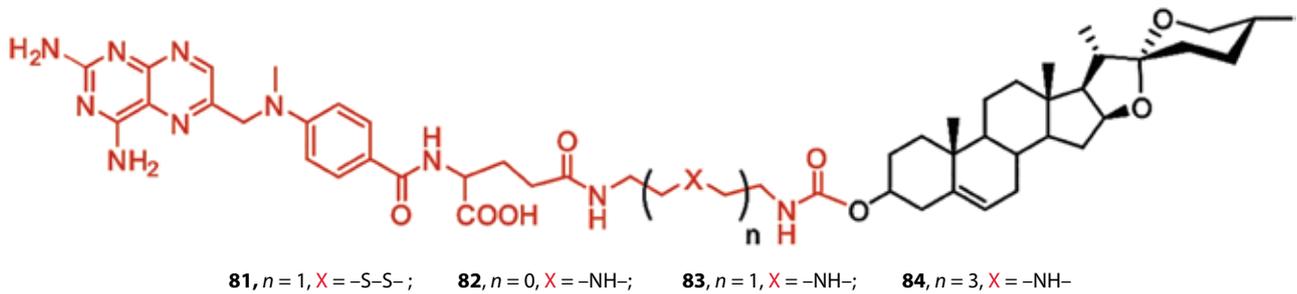


Рис. 9. Конъюгаты диосгенина с метотрексатом: 81–84

Fig. 9. Conjugates of diosgenin with methotrexate: 81–84

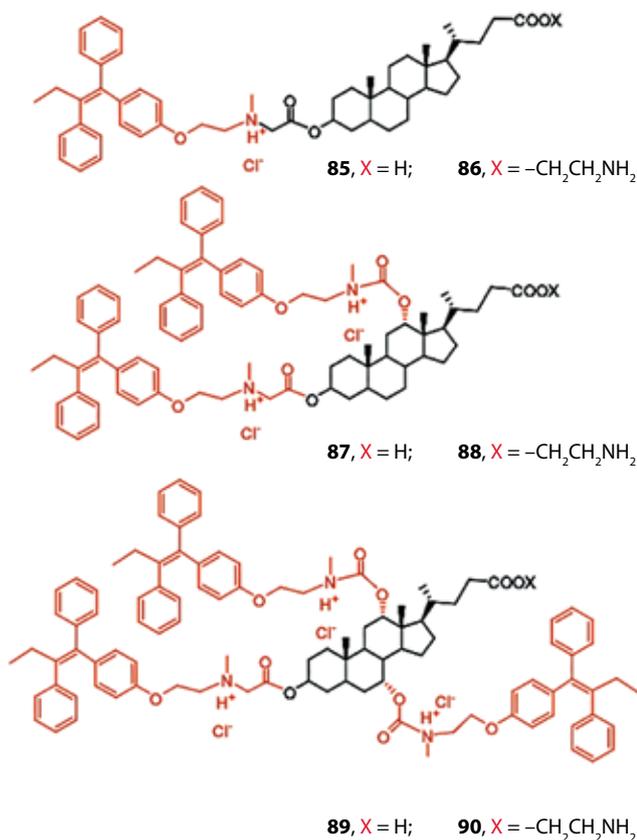


Рис. 10. Конъюгаты желчных кислот с тамоксифеном: 85–90

Fig. 10. Conjugates of bile acids with tamoxifen: 85–90

В лаборатории Е. Братоева были синтезированы конъюгаты 6-кето-16-дегидропрегненолона с известными противовоспалительными препаратами: напроксеном, ибупрофеном, кетопрофеном, индометацином и сулиндаком **91–95** (рис. 11) и показано, что все конъюгаты, кроме производного кетопрофена **93**, эффективно подавляют рост клеток астроциты линии U373 [77]. Наибольшей активностью обладал конъюгат сулиндака **95**.

В исследовании А. S. Letis и соавт. установлено, что конъюгаты желчных кислот с противомаларийным препаратом артемизинином эффективны при

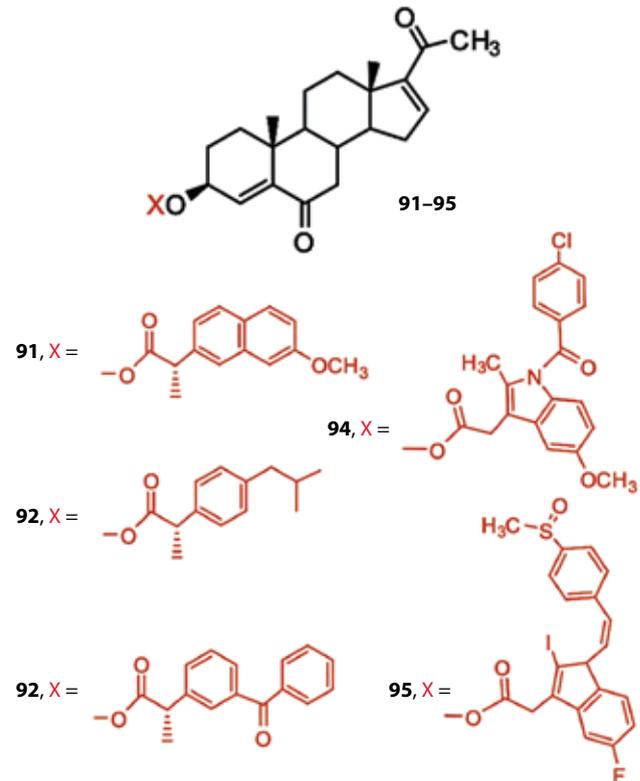


Рис. 11. Конъюгаты 6-кето-16-дегидропрегненолона с напроксеном, ибупрофеном, кетопрофеном, индометацином и сулиндаком: 91–95

Fig. 11. Conjugates of 6-keto-16-dehydropregnenolone with naproxen, ibuprofen, ketoprofen, indomethacin and sulindac: 91–95

лейкозе. Было получено 9 конъюгатов артемизинина с производными 7,12-диацетилхолата (**96–104**) (рис. 12), а также исследовано их взаимодействие с линиями клеток CCRF-CEM и CEM/ADR5000 [78].

Все конъюгаты проявляли большую токсичность в клетках CCRF-CEM. Токсичность конъюгатов была выше токсичности неконъюгированного артемизинина и доксорубина; наибольшую токсичность проявлял амидосодержащий конъюгат **101** (19 нМ в клетках CCRF-CEM и 345 нМ в клетках CEM/ADR5000). 3 $\alpha$ -конъюгаты проявляли большую активность по сравнению с 3 $\beta$ -изомерами. Введение

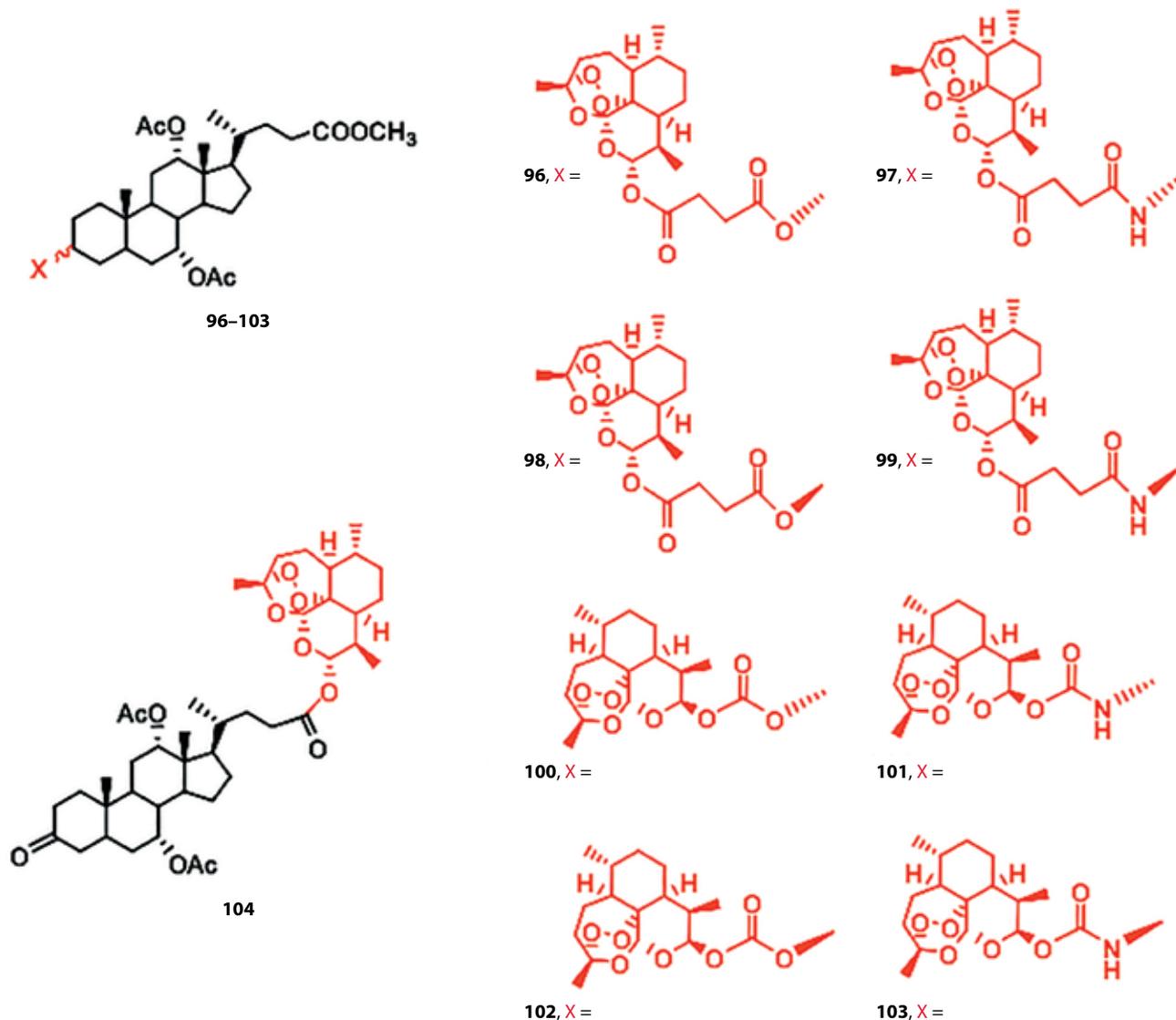


Рис. 12. Конъюгаты производных 7,12-диацетилхолата с артемизинином: 96–104

Fig. 12. Conjugates of derivatives 7,12-diacetylcholate with artemisinin: 96–104

сукцинатного спейсера увеличивало токсичность; эфир **104**, в котором остаток артемизинина связан с 24-карбоксильной группой, был на порядок менее активен, чем соответствующие 3-замещенные эфирные и амидные конъюгаты.

#### Стероидные димеры

С целью поиска новых ингибиторов стероид-сульфатазы STS в лаборатории D. Fournier был проведен синтез димерных конъюгатов эстранового ряда **105–114** (рис. 13) [79]. Среди синтезированных соединений только симметричные димеры эстрадиола, связанные в положении **17** (**111** и **112**), эффективно ингибировали активность STS. В исследовании A. Arenas-González и соавт. синтезированные конъюгаты эстрогена **115** и **116** и эпиандростерона **117** не

влияли на рост и пролиферацию клеток A2780 (рак яичников), HBL-100, T47D (PMЖ), HeLa (рак шейки матки), SW1573 (рак легкого) и WiDr (рак толстой кишки) [80].

Эстрогеновый и андрогеновый рецепторы функционируют в виде гомодимеров, поэтому попытки создания новых антагонистов этих рецепторов на основе стероидных димеров предпринимались неоднократно.

В лаборатории G. Vêrubé были синтезированы симметричные димерные конъюгаты  $17\beta$ -эстрадиола, эстрогена, тестостерона, 17-ацетокситестостерона, различающиеся структурой линкера и местом его введения в стероидный фрагмент (рис. 14). В серии соединений **118–128** только 2 димера (конъюгаты **119** и **120**) показали незначительную цитотоксичность

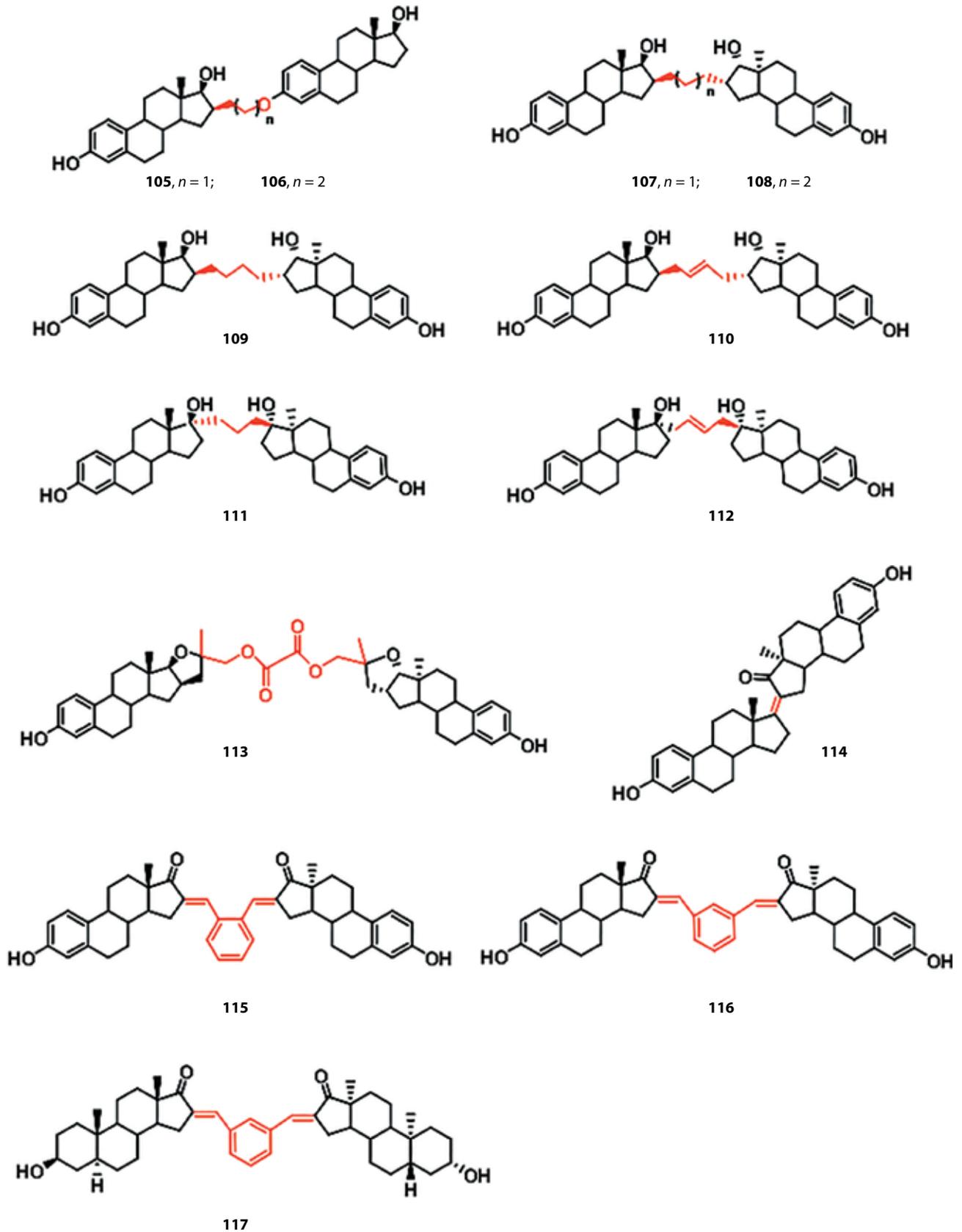


Рис. 13. Димеры стероидов эстранового ряда 105–114 и эпиандростерона 117

Fig. 13. Dimers of estrane steroids 105–114 and epiandrosterone 117

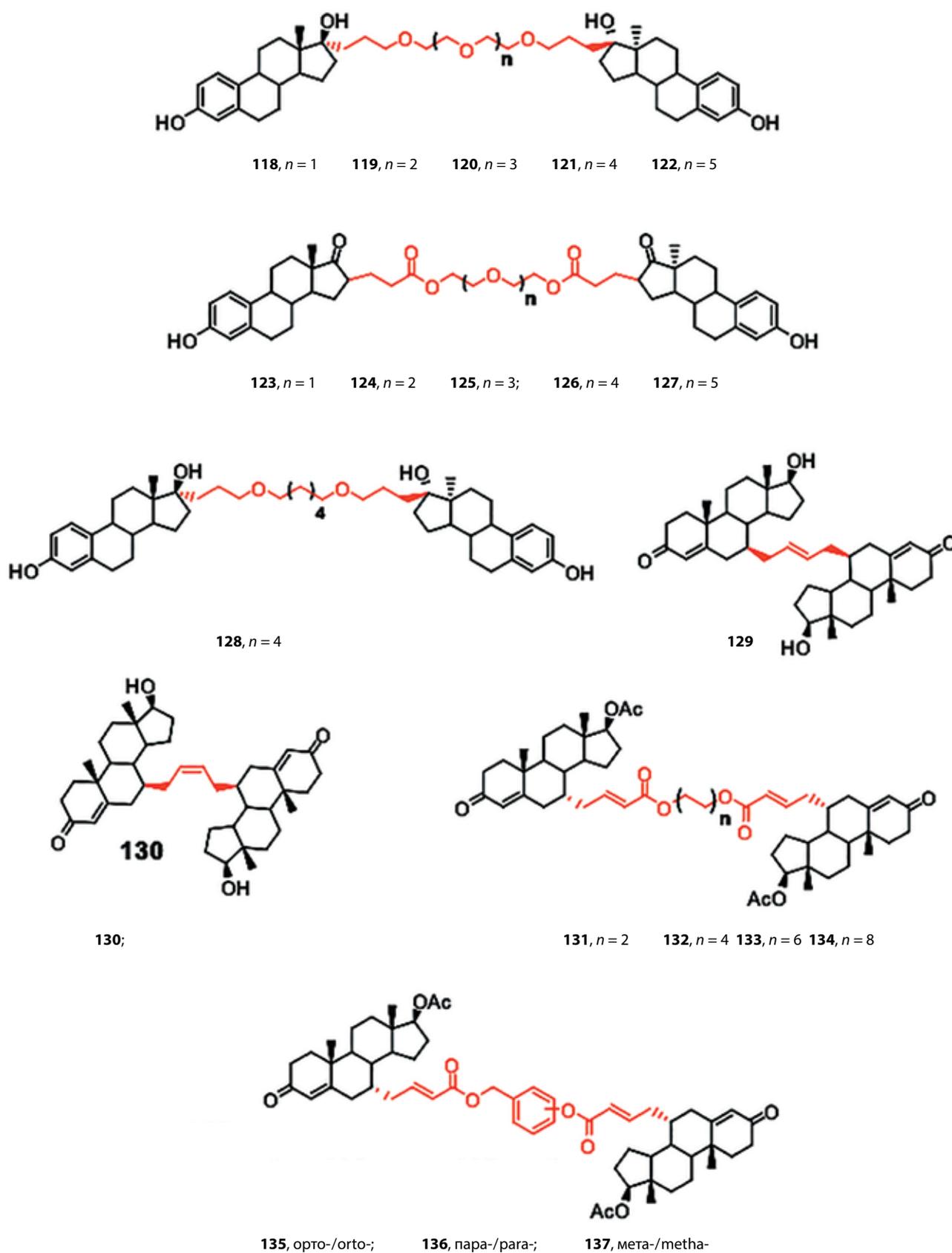


Рис. 14. Димеры эстрадиола, тестостерона и 17-ацетокситестостерона: 118–137

Fig. 14. Dimers of estradiol, testosterone and 17-acetoxitestosterone: 118–137

на клетках РМЖ MCF-7 (эстрогензависимых) и MDA-MB-231 (эстрогеннезависимых), остальные соединения были неактивны [81].

Изомерные димеры **129** и **130** исследовали как ингибиторы пролиферации андрогензависимых (LNCaP) и андрогеннезависимых (PC-3) клеток рака предстательной железы. Цис-димер **130** оказался более активным в обеих культурах, причем в клетках PC-3 эффект проявлялся сильнее; транс-димер **129** был активен только в клетках PC-3 [81]. В исследовании A.-R. Vespeg и соавт. было проведено сравнение сродства димеров **129** и **130** к цитохрому P450 CYP3A4. Оказалось, что цис-димер **130** сильнее связывается с CYP3A4, но положение транс-димера **129** в активном центре фермента ближе к положению тестостерона [82, 83].

Димеры **131–134** проявляли антипролиферативную активность в клетках карциномы предстательной железы LNCaP, DU-145 и PC-3, причем активность соединения **131** ( $IC_{50} = 3,8; 1,4$  и  $1,8$  мкМ для LNCaP, DU-145 и PC-3 соответственно) значительно превосходила активность известного антиандрогена ацетата ципротерона (в 12, 70 и 47 раз для LNCaP, DU-145 и PC-3 соответственно) [83]. Димеры с более длинным линкером **132**, **133** и **134** были менее активными, однако проявляли некоторую избирательность по отношению к гормонозависимым клеткам LNCaP [7]. Димеры **134** и **135** образовывали комплексы с ДНК и ТРНК, обладали сродством к полиаминовым дендримерам, сывороточным белкам и  $\beta$ -лактоглобулину [84–87].

В лаборатории P. Drašar были синтезированы димеры хлестовой кислоты **138**, **139**, этиеновой кислоты **140**, **141** и эстрогена **142**, содержащие 2,6-бис(1H-1,2,3-триазол-1-ил)-метил)пиридиновый линкер [88] (рис. 15).

Конъюгаты обладали невысокой цитотоксичностью на опухолевых клетках (всего было исследовано 10 линий), а также некоторым сродством к андрогеновому, прогестерононому, глюкокортикоидному и эстрогеновому  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторам, проявляя свойства агонистов. Наиболее токсичный конъюгат **138** проявлял слабую эстрогенную активность.

В исследовании Y.-M. Lu и соавт. были получены 2 симметричных димерных конъюгата сперминового амида хлестовой кислоты, различающиеся структурой линкера **143** и **144** (см. рис. 15). Конъюгаты обладали аниотропной активностью, причем активность соединения **144**, содержащего «жесткий» линкер, была выше. По мнению авторов, использование подобных конъюгатов в качестве противоопухолевых агентов перспективно, однако экспериментальные данные, подтверждающие это предположение, в указанном исследовании не приведены [89].

### Конъюгаты стероидов с фрагментами различных биологически активных молекул

Многочисленные исследования посвящены синтезу и изучению конъюгатов стероидов с фрагментами биологически активных молекул: углеводов, нуклеозидов, липидов, пептидов, витаминов, их синтетических производных и аналогов.

В лаборатории D. Poigier проводили поиск и изучение новых ингибиторов  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы ( $17\beta$ -HSD) – НАД(Ф)Н-зависимого фермента, катализирующего восстановление эстрогена в эстрадиол. В рамках этих исследований был осуществлен синтез конъюгатов **145** и **146** (рис. 16a), объединяющих в составе 1 молекулы и субстрат, и фрагмент кофактора [90, 91].

В комплексе конъюгата **145** с активным центром  $17\beta$ -HSD гидроксильные группы стероида, гидроксильные группы рибозы, аминогруппа и атом азота пуринового цикла аденина связаны с аминокислотными остатками белка водородными связями (рис. 16b) [92]. Конъюгаты **145** и **146** эффективно подавляли активность  $17\beta$ -HSD-1, причем активность конъюгата **146**, содержащего 17-кетогруппу, была выше по сравнению с конъюгатом **145**.

На основании результатов взаимодействия конъюгатов **145** и **146** с  $17\beta$ -HSD-1 в исследовании W. Qiu была получена серия конъюгатов эстрадиола с химерными структурами, моделирующими аденозин и взаимодействующими с теми же аминокислотными остатками активного центра фермента [92].

Венгерские химики получили серию конъюгатов эстрогена с дезоксиинуклеозидами **147–156** (рис. 17) [93]. Конъюгаты показали умеренную активность в качестве ингибиторов  $17\beta$ -HSD и умеренную антипролиферативную активность в клетках HeLa, MCF-7 и A2780; активность конъюгатов, содержащих защищенные нуклеозидные фрагменты, была выше. Наибольшую ингибиторную активность показал тимидиновый конъюгат **151**, самую высокую антипролиферативную активность – цитозиновый конъюгат **154**.

В исследовании B. Vodnár и соавт. синтезировали 14 конъюгатов D-секоэстрогена (содержащего 13-гидроксиметильную или 13-оксиминотетильную группу) с O-ацильными производными  $\alpha$ - и  $\beta$ -глюкопиранозидов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -маннопиранозидов,  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактопиранозидов и  $\alpha$ - и  $\beta$ -рибопиранозидов [94].

Антипролиферативная активность конъюгатов на клетках HeLa, A2780 и MCF-7 была незначительной; наивысшую активность проявляли  $\beta$ -гликозидные оксимсодержащие конъюгаты **157**, **158** и **159** (рис. 18). Значения  $IC_{50}$  составляли  $>30$ , 5,3, 10,7 мкМ в клетках HeLa; 8,9; 6,6; 9,4 мкМ в клетках A2780; 20,5; 8,8; 8,0 мкМ в клетках MCF-7 для конъюгатов **157**, **158** и **159** соответственно.

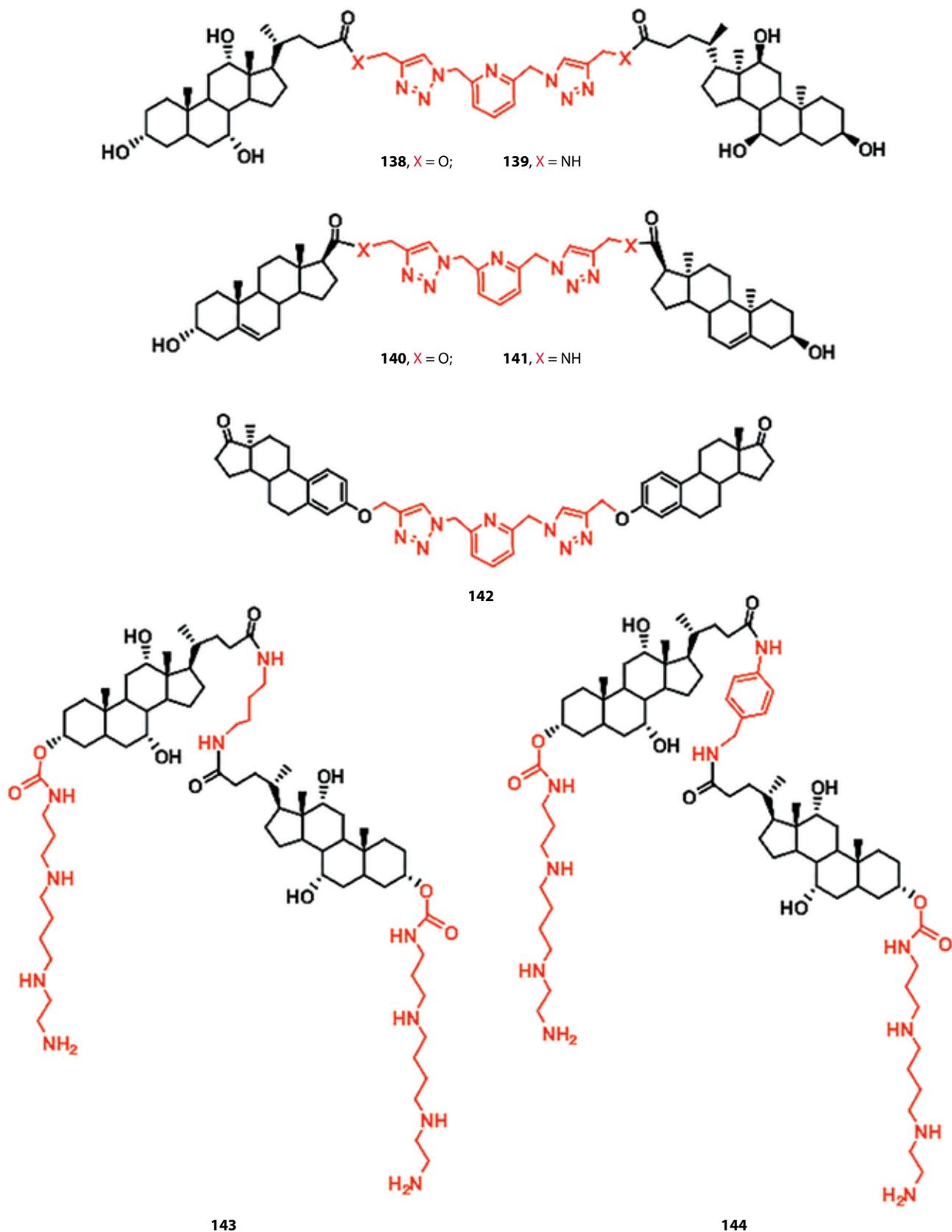
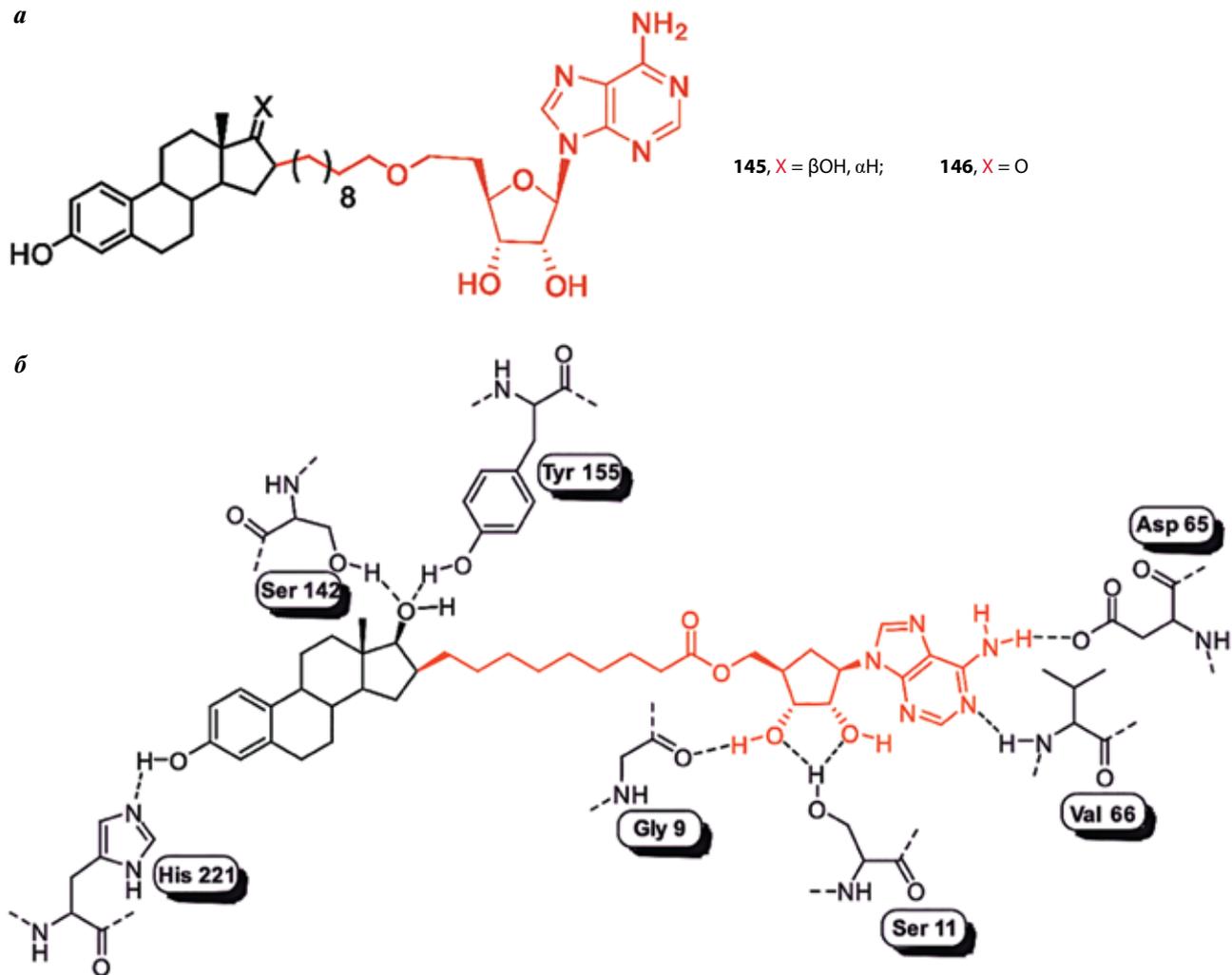


Рис. 15. Димеры холевой кислоты, этиеновой кислоты и эстрона: 140–144

Fig. 15. Dimers of cholic acid, ethienic acid and estrone: 140–144



**Рис. 16.** Синтез конъюгатов: *a* – конъюгаты **145** и **146**, ингибирующие активность  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы; *б* – расположение соединения **145** в активном центре  $17\beta$ -HSD

Fig. 16. Conjugate synthesis: *a* – conjugates **145** and **146** inhibiting the activity of  $17\beta$ -hydroxysteroid-dehydrogenase; *б* – is the location of compound **145** in the active center  $17\beta$ -HSD

В исследовании M.L. Navacchia и соавт. при помощи клик-реакции была синтезирована библиотека триазолсодержащих конъюгатов желчных кислот (хенодесоксихолевой, урсодесоксихолевой, нор-хенодесоксихолевой, нор-урсодесоксихолевой и таурохолевой) и рибо- и дезоксирибонуклеозидов [95]. Антипролиферативная активность конъюгатов была оценена на культурах клеток K562 (миелолейкоз) и HCT116 (рак толстой кишки). Из всей библиотеки только 6 конъюгатов **160–165** (рис. 19) подавляли рост раковых клеток и не были токсичными для нормальных фибробластов. Конъюгаты **160** и **161** были избирательно токсичными в клетках K562, а **162** и **163** были избирательно токсичными в клетках HCT116. Конъюгаты **164** и **165** показали антипролиферативный эффект в обеих культурах, однако активность всех 6 конъюгатов была невысокой.

В работе R. Mendoza-Sanchez и соавт. были синтезированы 4 конъюгата, содержащих остатки  $7\alpha$ -замещенного эстрадиола и ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC) (**166–169**) (рис. 20) [96]. Конъюгаты проявляли антиэстрогенную активность и ингибировали активность гистондеацетилазы, причем в случае бензамидсодержащих конъюгатов **167** и **169** была показана избирательность ингибирования HDAC3 1-го класса по сравнению с HDAC6 2-го класса.

Конъюгаты **166–169** проявляли цитотоксичность на эстроген-рецепторзависимых клетках MCF-7 и эстроген-рецепторнезависимых клетках MDA-MB-231 при концентрациях 0,1–1 мкМ.

В исследовании M. Jurásek и соавт. были синтезированы 5 стероидных конъюгатов **170–174** (рис. 21), содержащих остаток сесквитерпенового лактона трилоболида – эффективного ингибитора  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [97].

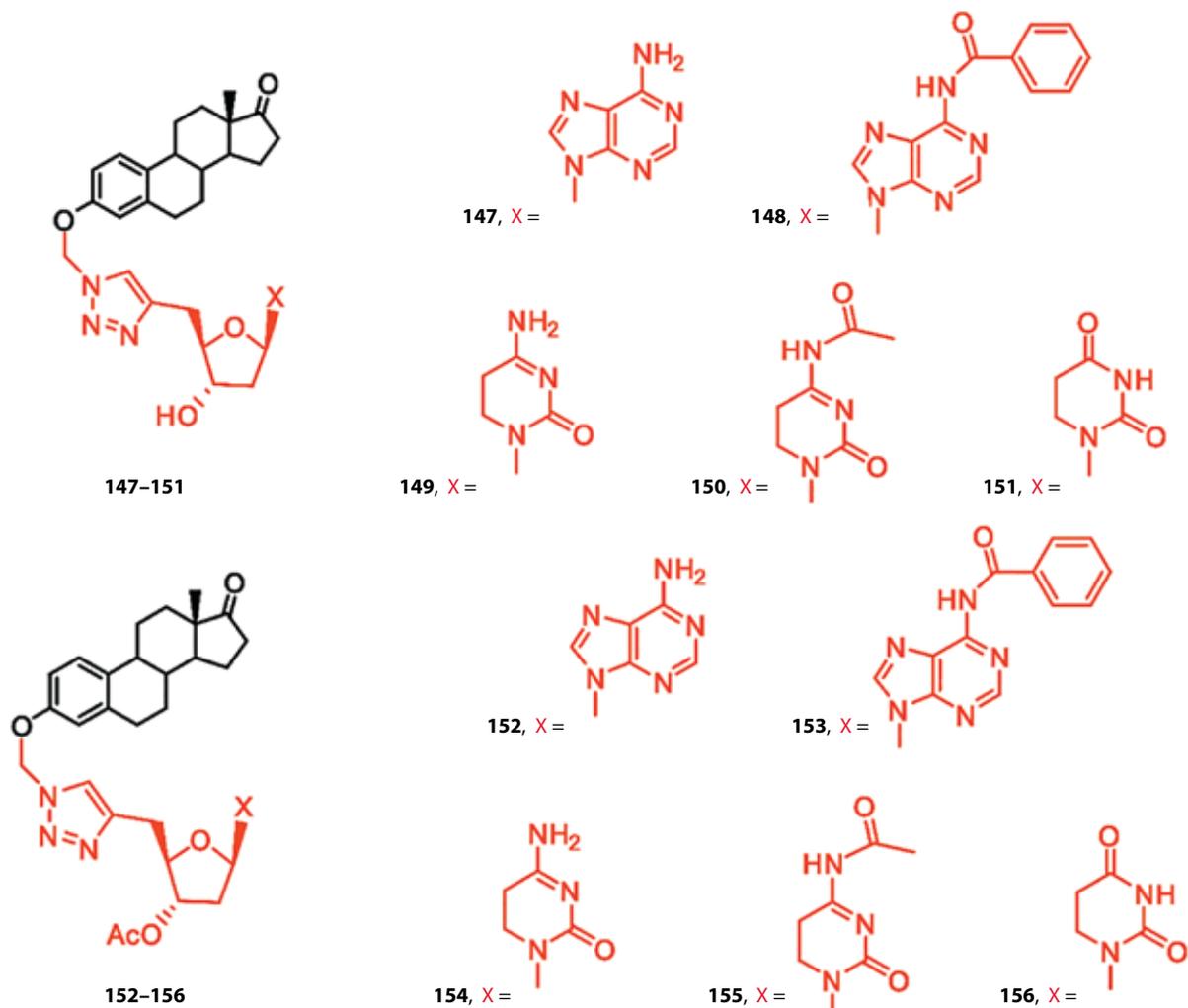


Рис. 17. Конъюгаты эстрогена с дезоксирибонуклеозидами: 147–156

Fig. 17. Conjugates of estrone with deoxynucleosides: 147–156

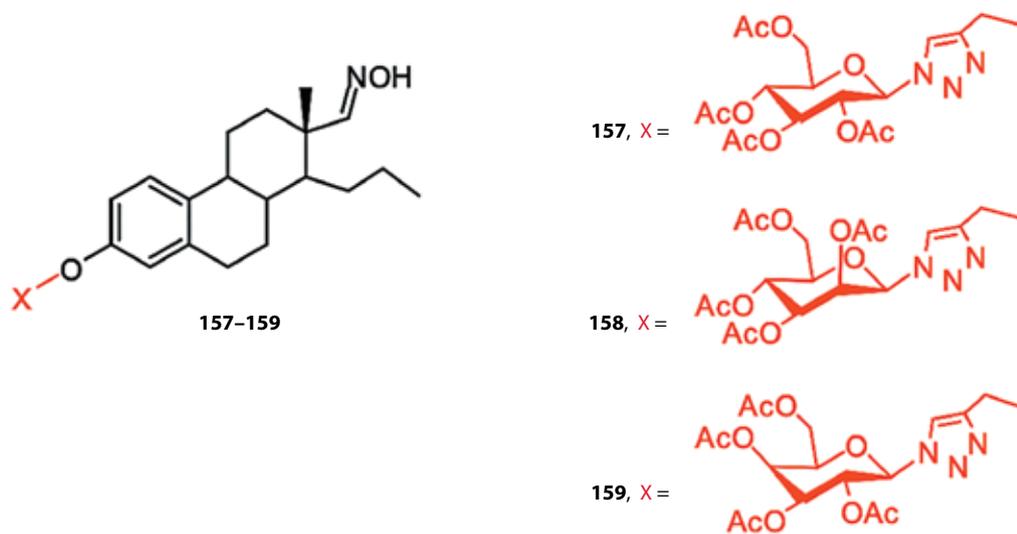


Рис. 18. Конъюгаты D-секоэстрогена с производными сахаров: 157–159

Fig. 18. Conjugates of D-secoestrone with derivatives of carbohydrate: 157–159

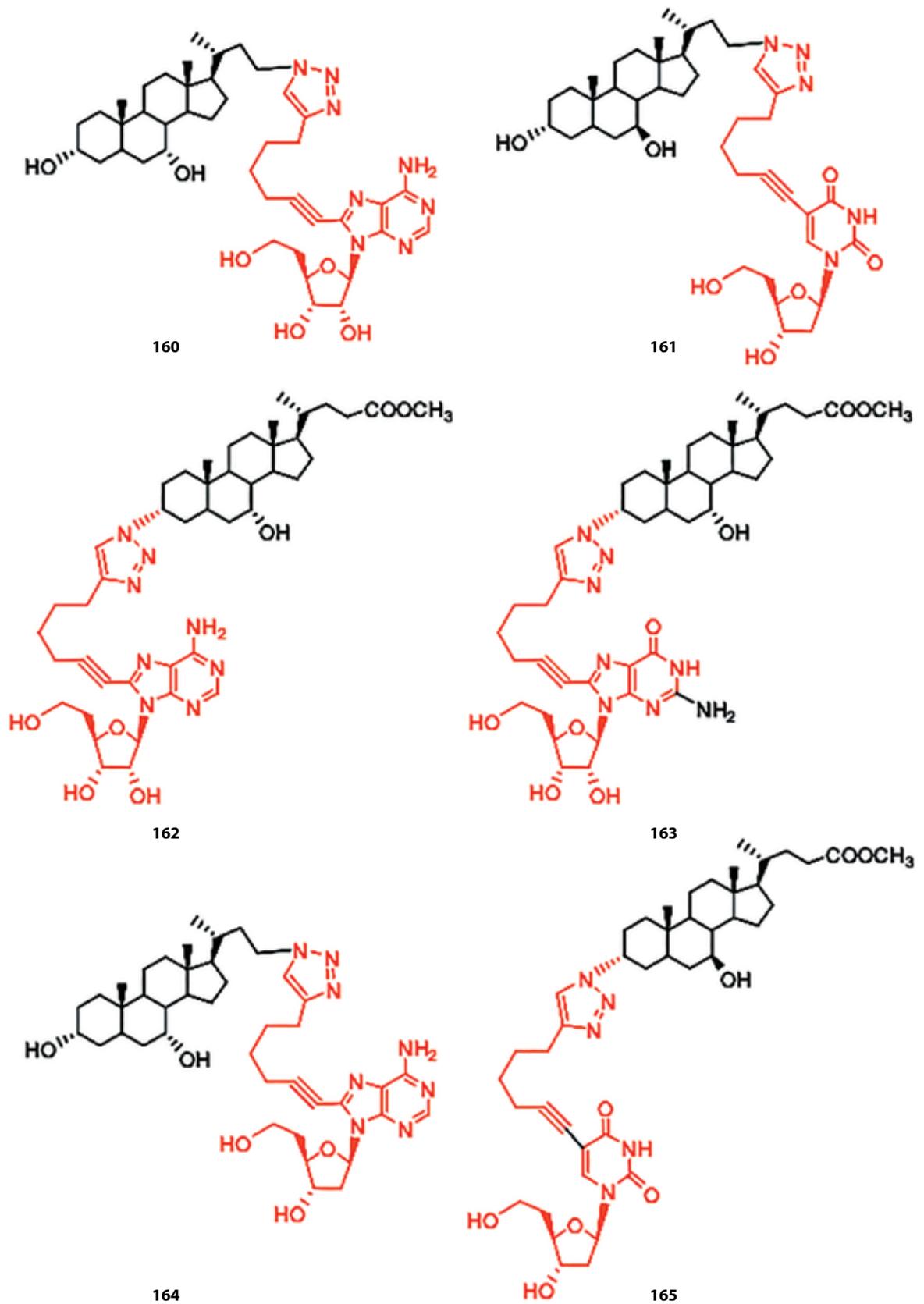


Рис. 19. Конъюгаты желчных кислот с нуклеозидами: 160–165

Fig. 19. Conjugates of bile acids with nucleosides: 160–165



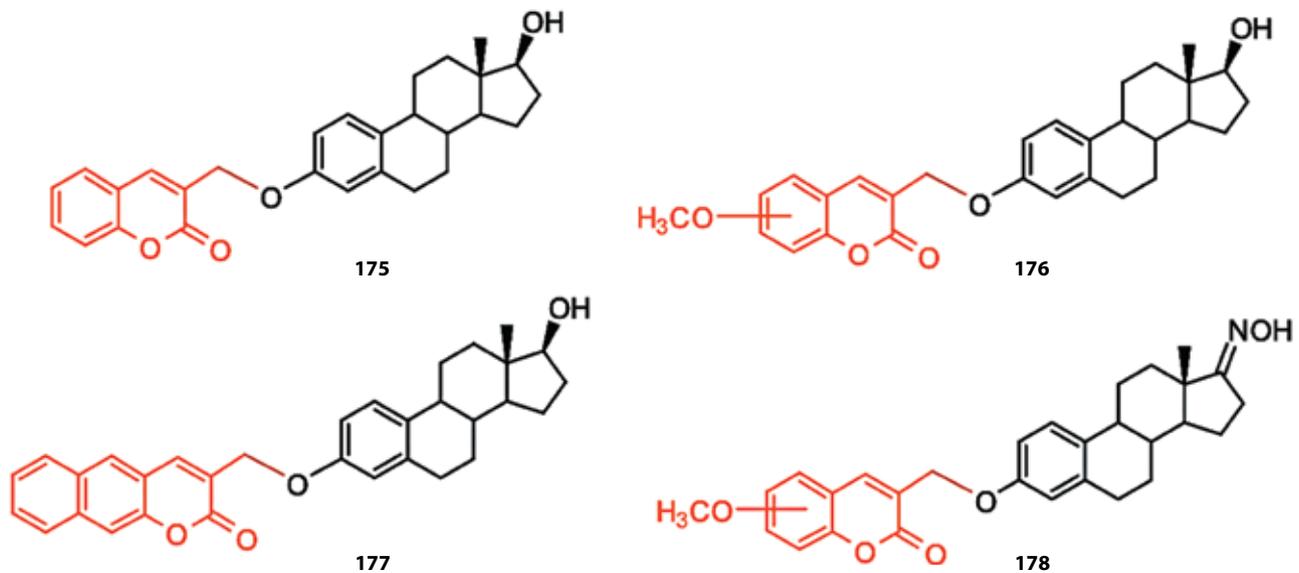


Рис. 22. Конъюгаты 3-О-замещенных производных эстренового ряда с кумаринами: 175–178

Fig. 22. Conjugates of 3-O-substituted derivatives of the estrane series with coumarins: 175–178

MDA-MB-231/ATCC, MDA-MB-435 и NCI/ADR-RES) [98]. Конъюгат **176** показал антипролиферативную активность на культуре клеток MCF-7, сравнимую с активностью 4-гидрокситамоксифена. По мнению авторов, конъюгаты **176** и **178** могут рассматриваться в качестве соединений-лидеров для разработки ЛП для лечения РМЖ.

В исследовании Е. В. Нуриевой и соавт. были синтезированы конъюгаты 2-этоксистердиола с адамантаном (рис. 23), соединенным линкером с фенольной гидроксигруппой [99]. Соединения **179–181** продемонстрировали умеренную цитотоксичность и слабое воздействие на сеть микротрубочек на культуре клеток рака легкого человека A549, сходное с эффектом кластеризации тубулокластина и его производных. Конъюгаты **182–187** проявляли слабую активность.

В работе J.L. Song и соавт. была получена библиотека из 25 конъюгатов прегненолона с арилсодержащими цианоакрилоильными производными – потенциальными ингибиторами фактора NF-κB. Конъюгаты **188–192** (рис. 24) подавляли TNFα-зависимую активацию NF-κB; при этом конъюгат **192** эффективно ингибировал активность NF-κB ( $IC_{50} = 2,5$  мкМ) и рост клеток MCF-7, A549, H157 и HL-60 ( $IC_{50} = 6,5–36,2$  мкМ). Наличие электронакцепторного заместителя в ароматическом кольце существенно для биологической активности конъюгатов [100].

В работе S. Ke был проведен синтез конъюгатов дегидроэпиандростерона с производными изатина **193–187** (рис. 25). Конъюгаты проявляли антипролиферативную активность на культуре клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2, Huh-7, BEL-7402/5-FU), а также меланомы A875. Наибольшую

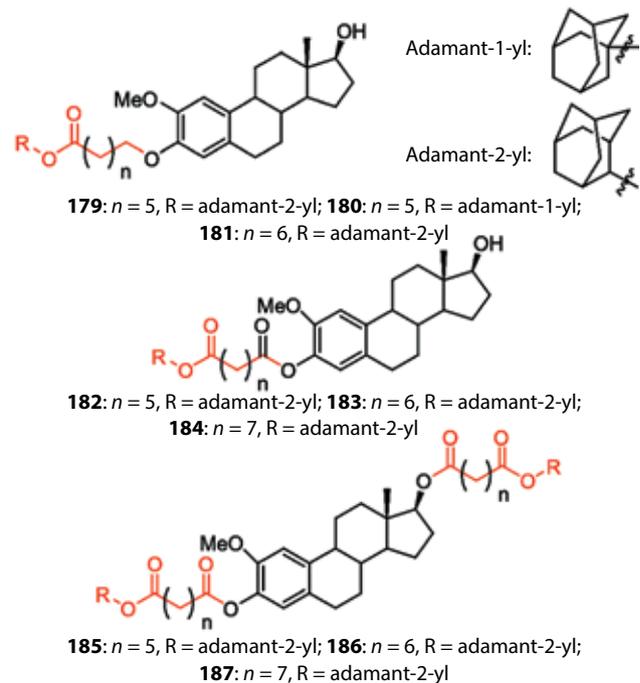


Рис. 23. Конъюгаты 2-метоксистердиола с адамантаном: 179–187

Fig. 23. Conjugates of 2-methoxyestradiol with adamantane: 179–187

активность проявлял бромсодержащий конъюгат **196** (в клетках BEL-7402/5-FU, устойчивых к 5-фторурацилу, значение  $IC_{50}$  составляло ~6 мкМ) [101].

В исследовании G. Sudhakar и соавт. были получены гибриды эстрадиола, содержащие фрагменты так называемых катионных липидов – четвертичных аммониевых солей, содержащих углеводородные цепи различной длины **198–202** (рис. 26) [102]. Цитотоксичность конъюгатов **198–202** оценивали

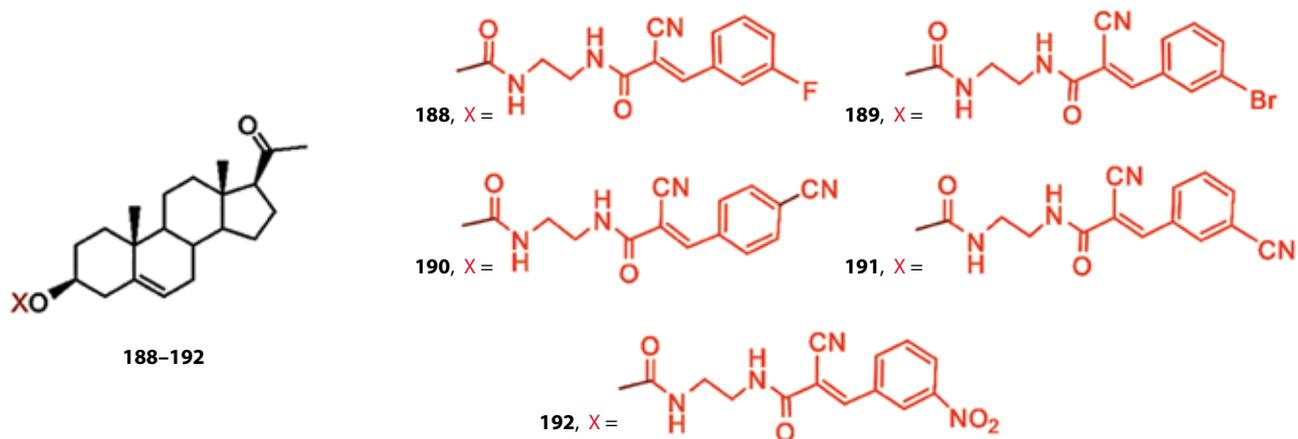


Рис. 24. Конъюгаты прегненолона с арилсодержащими цианоакрилоильными производными: 188–192

Fig. 24. Pregnenolone conjugates with aryl-containing cyanoacryloyl derivatives: 188–192

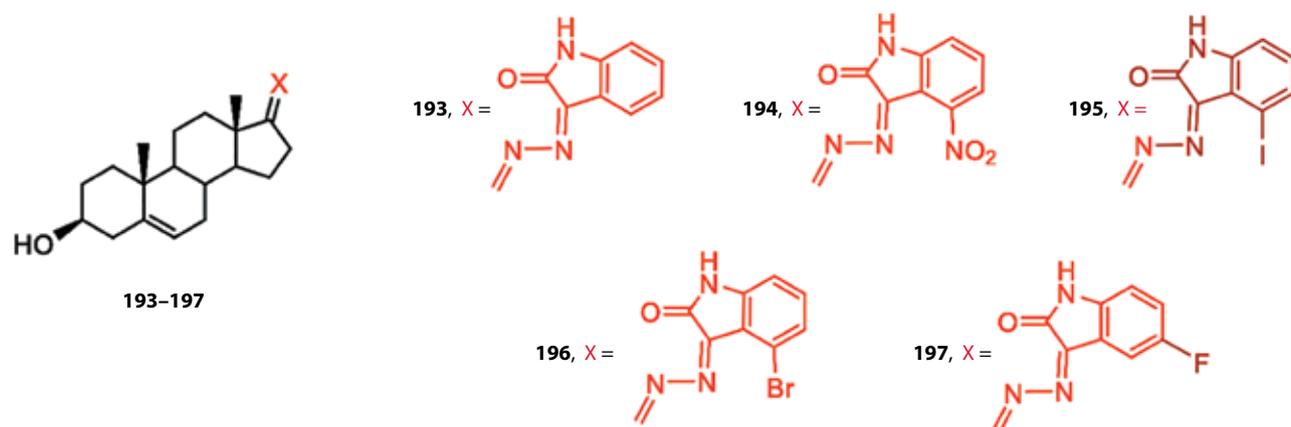


Рис. 25. Конъюгаты дегидроэпиандростерона с производными изатина: 193–197

Fig. 25. Conjugates of dehydroepiandrosterone with isatin derivatives: 193–197

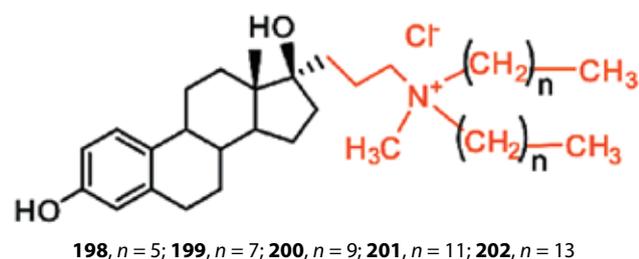


Рис. 26. Конъюгаты 17 $\alpha$ -замещенного эстрадиола с катионными липидами: 198–202

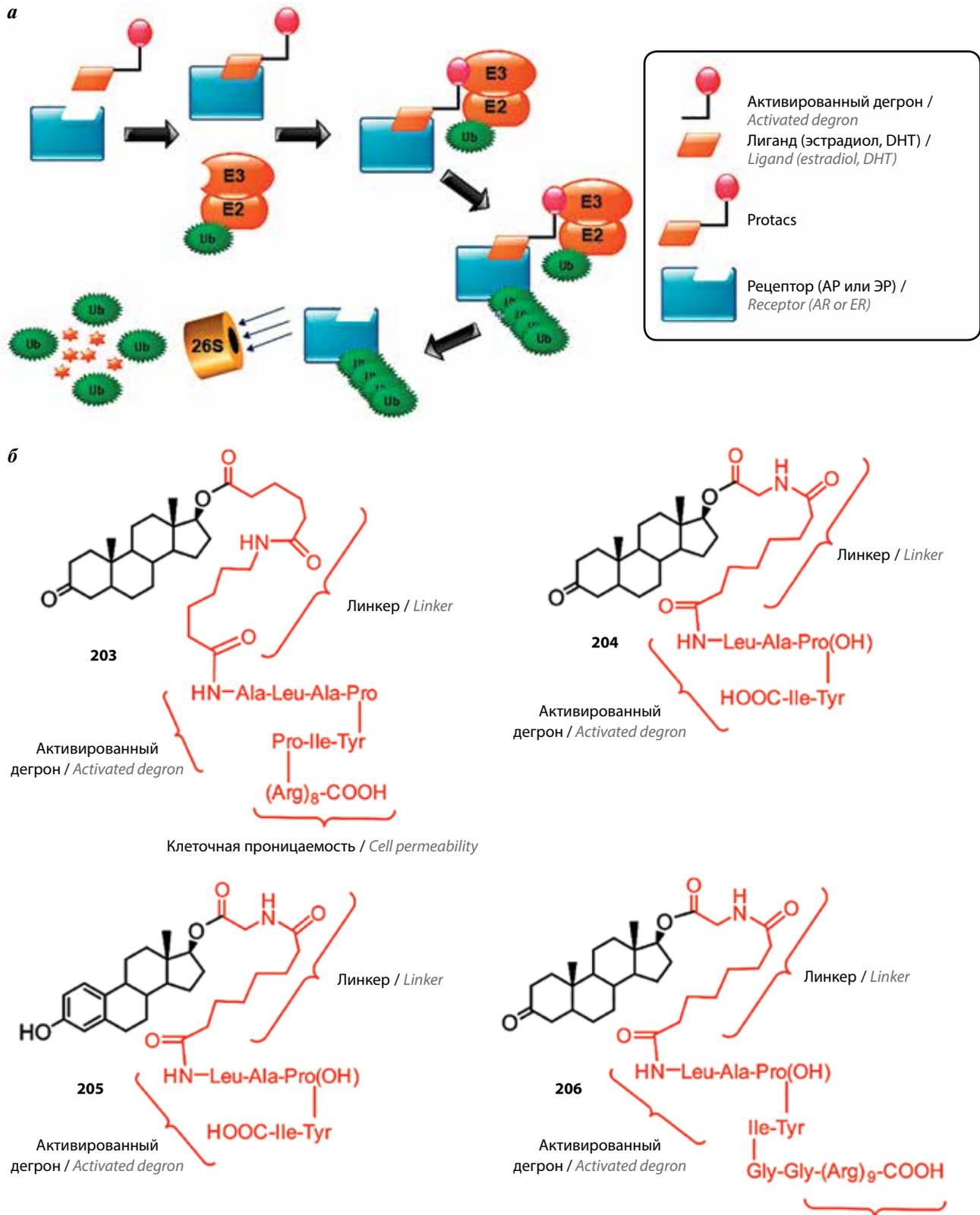
Fig. 26. Conjugates of 17 $\alpha$ -substituted estradiol with cationic lipids: 198–202

на культуре раковых клеток различного происхождения. Конъюгат **200**, содержащий децильный остаток, проявлял наибольшую токсичность в клетках MCF-7, MDA-MB-231, B16F10, MIAPaCa<sub>2</sub>, CHO и NIH 373 и не был токсичен в незлокачественных клетках, цитотоксичность не зависела от активности эстрогенового рецептора. Конъюгат **200** вызывал увеличение

количества злокачественных клеток в фазе G<sub>0</sub>, индуцировал апоптоз и ингибировал рост меланомы *in vivo*, что свидетельствует о перспективе дальнейших исследований стероид-липидных конъюгатов как прототипов противоопухолевых ЛП.

В лабораториях С.М. Crews и К.М. Sakamoto, разработавших технологию PROTAC (Proteolysis Targeting Chimeric molecules), был получен конъюгат дигидротестостерона **203**, содержащий пептидный фрагмент ALAPYIP, стимулирующий убиквитинирование и последующую деградацию белка-мишени (degron) и октааргининовую последовательность, облегчающую связывание конъюгата с клеткой (рис. 27a). Конъюгат **203** в концентрации 25 мкМ эффективно способствовал деградации андрогенового рецептора, стабильно экспрессируемого в клетках HEK293, без ущерба жизнеспособности клеток [103–105].

Впоследствии той же группой ученых были получены конъюгаты **204** и **205**, содержащие лиганд стероидного рецептора (17 $\beta$ -О-ацилированный



**Рис. 27.** Схема, иллюстрирующая направленный протеолиз с использованием технологии PROTAC (Ub – убиквитин, E1, E2, E3 – убиквитинлигазы) (а) и конъюгаты дегидротестостерона и эстрадиола, содержащего PROTAC-пептиды (б): 203–206

**Fig. 27.** Scheme illustrating directed proteolysis using PROTAC technology (Ub – ubiquitin, E1, E2, E3 – ubiquitin ligase) (a) and conjugates of dehydroepiandrosterone and estradiol containing PROTAC peptides (b): 203–206

дигидротестостерон или эстрадиол), пептид, обеспечивающий связывание с убиквитинлигазным комплексом (degron), и соединительный линкер [106] (рис. 27б). Коинкубация с конъюгатами культур клеток LNCaP и MCF-7 стимулировала протеосомную деградацию рецептора. В андрогензависимых клетках рака предстательной железы (LNCaP) и эстрогензависимых клетках РМЖ (MCF-7 и TD47D-7) конъюгаты **204** и **205** подавляли пролиферацию, индуцировали остановку клеточного цикла в фазе G1, снижали экспрессию циклина D1, а в гормоннезависимых клетках (PC-3 и SKBr3) не вызывали подобных изменений.

Японские специалисты разработали подход к специфической деградации рецепторов, основанный на использовании конъюгатов лиганда этого рецептора с пептидом или пептидомиметиком IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), обеспечивающим специфическую деградацию белка за счет убиквитинирования и протеосомной деградации (рис. 28а). Этот подход получил название SNIPERs (Specific and Nongenetic IAPs-dependent Protein ERasers). В исследовании Y. Itoh и соавт. описаны конъюгаты эстрадиола **207** и дигидротестостерона **209** с пептидомиметиком бестатином, лигандом клеточного ингибитора апоптоза-1 (сIAPs1) (рис. 28б) [107].

В клетках MCF-7, экспрессирующих эстрогеновый рецептор  $\alpha$  и андрогеновый рецептор, конъюгаты **207** и **209** значительно снижали уровень рецепторов. Неконъюгированный бестатин, а также конъюгат **208** (где фрагмент бестатина был заменен на остаток фенолмасляной кислоты) не проявляли активности, из чего авторы заключили, что конъюгаты SNIPERs могут применяться в качестве инструментов для биологических исследований, а также как противоопухолевые агенты, ингибирующие функции ядерных рецепторов посредством их деградации.

В лаборатории К. Kirshenbaum была получена серия конъюгатов тестостерона с линейными и циклическими пептоидами — полиамидами с алкилированным атомом азота, представляющими собой аналоги пептидов, устойчивые к действию протеолитических ферментов **210–220** [108–110] (рис. 29).

Линейные конъюгаты **213**, **214** и **215** вытесняли тестостерон из комплекса с андрогеновым рецептором, а линейные конъюгаты **210–212**, **216**, **217** и циклический конъюгат **220** не вытесняли, что доказывает важность структуры пептоидного фрагмента конъюгата для взаимодействия с рецептором. Конъюгаты **215** и **220** подавляли рост андрогензависимых клеток LNCaP-abl, но не влияли на рост и пролиферацию андрогеннезависимых клеток PC-3 и HEK293. Линейный конъюгат **215** блокировал активацию андрогенового рецептора, конкурируя

за образование комплекса с ДНК и препятствуя его связыванию с коактиваторами.

Циклический конъюгат **220** не связывался с андрогеновым рецептором *in vitro*, но влиял на его проникновение в ядро и на клеточный цикл. Конъюгат **215** подавлял экспрессию андрогенового рецептора, ингибировал рост ксенографтов энзалутамидоустойчивых клеток LNCaP-abl у иммунодефицитных мышей. Линейные и циклические конъюгаты по-разному влияли на экспрессию генов в LNCaP-abl клетках, что свидетельствует о воздействии циклических и линейных конъюгатов на различные регуляторные процессы в клетке.

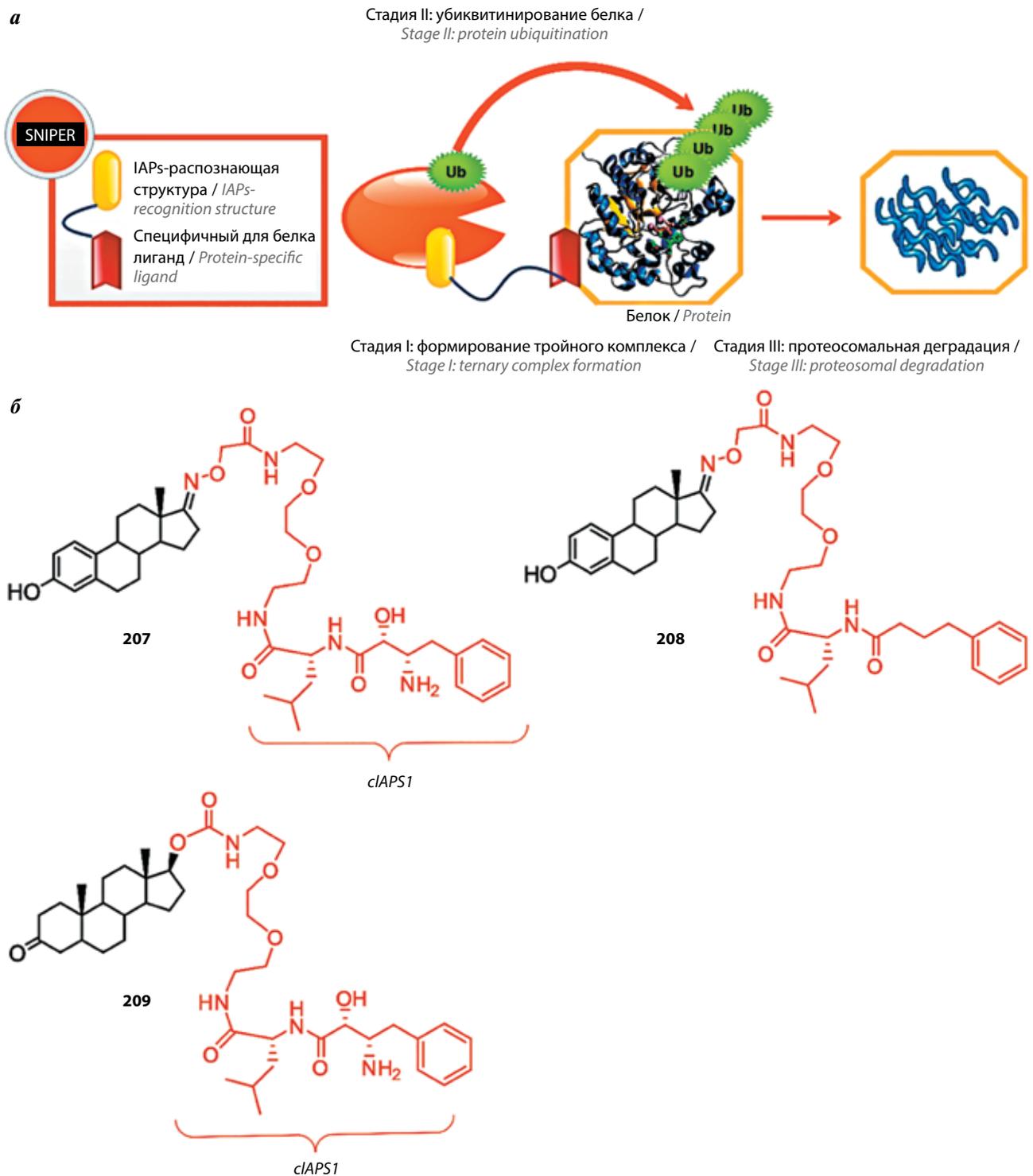
Стероидные конъюгаты с азотсодержащими макроциклами (рис. 30) привлекают внимание как перспективные специфичные агенты для фотодинамической терапии гормончувствительных опухолей. В исследовании R.N. Hanson и соавт. был получен конъюгат эстрадиола с тетрафенилпорфином **221** и изучено его взаимодействие с клетками РМЖ [111, 112]. Конъюгат **221** эффективно захватывался эстрогензависимыми клетками MCF-7 и слабо — эстрогеннезависимыми HS578t.

В исследовании N. El-Akra описаны конъюгаты эстрадиола с феофорбидом, различающиеся длиной линкера, — **222** и **223**. Конъюгат **223** (с длинным линкером) обладал высокой фотоиндуцированной токсичностью в эстрогензависимых клетках MCF-7 и слабой — в гормоннезависимых SKBR3; активность конъюгата **222** (с коротким линкером) в клетках MCF-7 была в 8 раз ниже [113]. S. Sadler и соавт. привели данные о проникновении конъюгата **223** в ядро и возможности его использования в качестве фотосенсибилизатора, однако о темновой токсичности конъюгатов информации не дано [114].

Конъюгат этинилэстрадиола с пиреофорбидом  $\alpha$  **224** эффективно захватывался и интернализировался клетками MCF-7, проникая в ядро [114].

В исследованиях В.А. Золотцева и соавт. были синтезированы конъюгаты пиреофорбида  $\alpha$  с 17-замещенными производными дигидротестостерона (**225**), тестостерона (**226**, **227**) и эпитестостерона (**228**, **229**), содержащие амидные линкеры с 2 и 5 метиленовыми звеньями, и изучено их взаимодействие с клетками рака предстательной железы LNCaP и PC-3. Конъюгаты **225** и **226** показали высокую темновую и фотоиндуцированную цитотоксичность [115]. Захват, интернализация и антипролиферативная активность конъюгатов **225–229** в клетках LNCaP и PC-3 зависели от структуры соединения и не зависели от активности андрогенового рецептора. Наиболее эффективным оказался конъюгат эпитестостерона с коротким линкером **228** [116].

В исследовании М.О. Таратыновой и соавт. были синтезированы комплексные конъюгаты **230** и **231**,



**Рис. 28.** Схема, иллюстрирующая направленный протеолиз с использованием технологии SNIPER (а) и конъюгаты дигидротестостерона и эстрадиола с ингибитором IAP 207 и 209, и его неактивным аналогом 208 (б)

Fig. 28. Diagram illustrating directional proteolysis using SNIPER technology (a) and conjugates of dihydrotestosterone and estradiol with an IAP inhibitor 207 and 209, and its inactive analogue 208 (b)

легко образующие смешанные мицеллы с фосфатидилхолином и плуроником F68. Эти смешанные мицеллы эффективно интернализировались клетками гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и сла-

бо – клетками рака предстательной железы LNCaP, причем интернализация зависела от структуры конъюгата, но не зависела от способа солюбилизации [117].

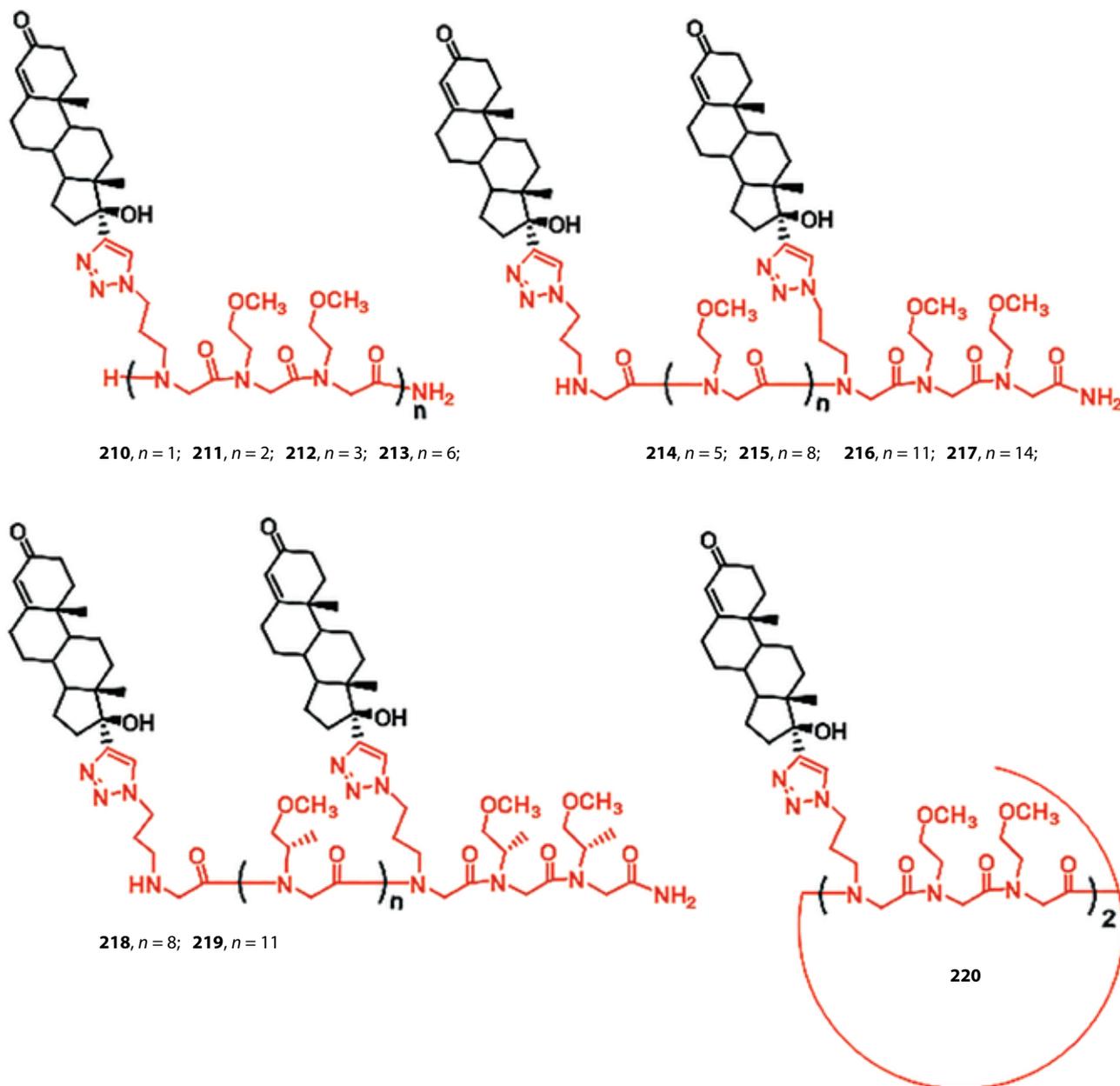


Рис. 29. Конъюгаты тестостерона с линейными и циклическими пептидами: 210–220

Fig. 29. Testosterone conjugates with linear and cyclic peptides: 210–220

### Заключение

Наибольший прогресс достигнут в использовании конъюгатов стероидов с известными и широко применяемыми в клинической практике противоопухолевыми препаратами: получены конъюгаты с высокой специфичностью, а также с биологической активностью, отличной от активности прототипа. Стероидные димеры, очевидно, являются полезными инструментами для исследования биомишеней, в первую очередь стероидных рецепторов, однако в литературе пока нет сообщений об использовании димеров в качестве ЛП. Что касается конъюгатов стероидов с другими биологически активными молекулами

или их фрагментами, несмотря на впечатляющие результаты лабораторных исследований, оценить их потенциал в качестве ЛП в настоящее время сложно.

Многие из стероидных конъюгатов обладают значительной биологической активностью и могут выступать в качестве соединений-лидеров для разработки ЛП. Однако сама разработка ЛП требует оптимизации структуры соединения-лидера. В этом случае разумно использовать подходы биомедицинской химии, хорошо зарекомендовавшие себя при разработке обычных (неконъюгированных) препаратов. Таким образом, создание ЛП на основе

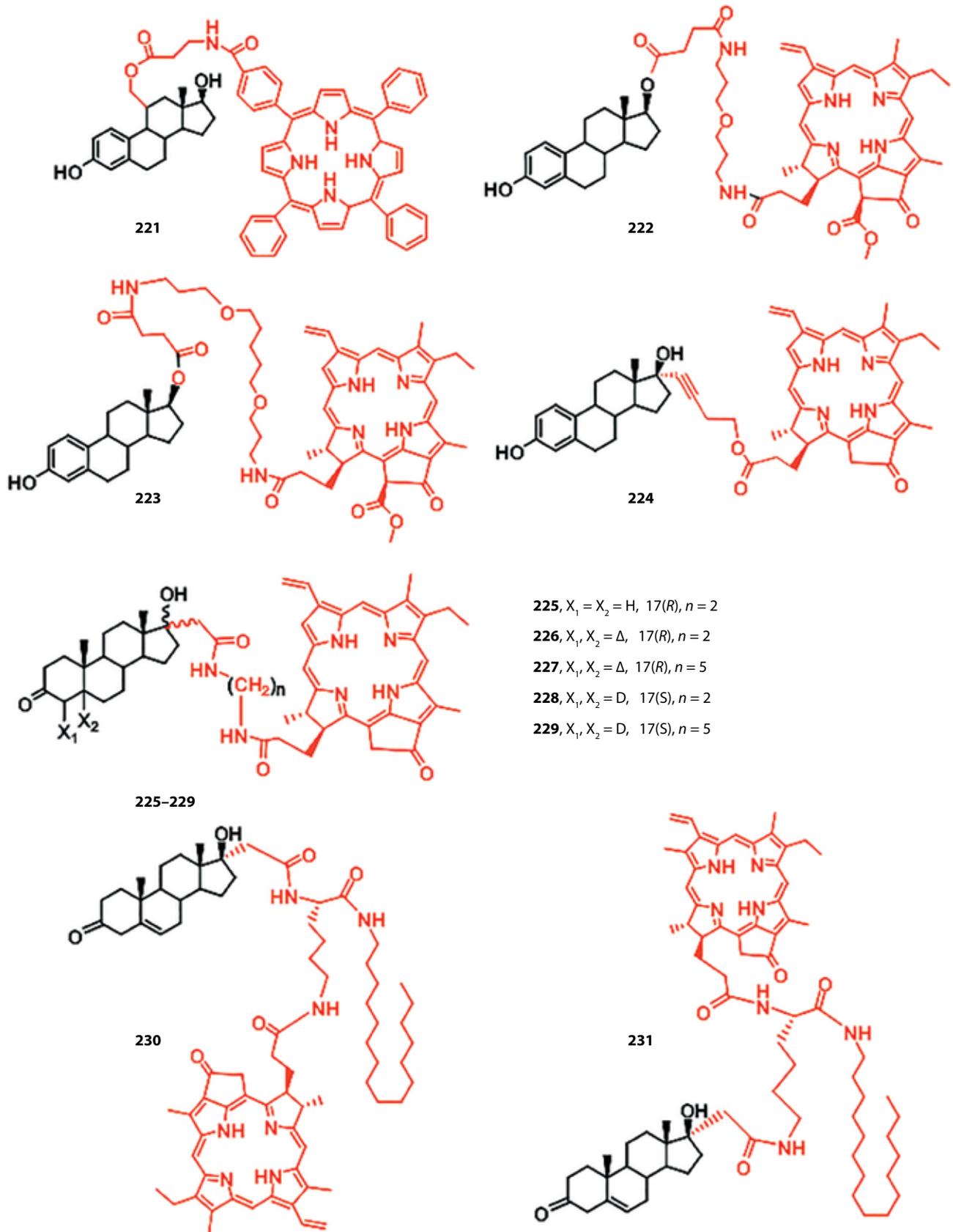


Рис. 30. Конъюгаты стероидов с азотсодержащими макроциклами: 221–231

Fig. 30. Steroid conjugates with nitrogen-containing macrocycles: 221–231

конъюгатов не имеет принципиальных отличий от разработки препаратов на основе производных и аналогов неконъюгированных природных соединений.

В современной научно-популярной и рекламной литературе, посвященной проблеме создания новых лекарств, часто приводится аналогия с детским конструктором, при помощи которого можно создавать новые молекулы. На первый взгляд, получение конъюгатов и является подобной задачей. Однако это далеко не так. Реальные полифункциональные молеку-

лы важны и интересны именно влиянием отдельных функциональных групп друг на друга и на свойства молекулы в целом, в том числе и на ее биологическую активность. В процессе получения и исследования биологически активного конъюгата химик сначала преследует цель механического соединения фармакофоров, после чего, изучив свойства полученного конъюгата, пытается изменить структуру для достижения требуемой активности и только потом вместе с биохимиками и фармакологами участвует в разработке препарата.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hadden M.K., Blagg B.S.J. Dimeric approaches to anti-cancer chemotherapeutics. *Anticancer Agents Med Chem* 2008;8(7):807–16. DOI: 10.2174/187152008785914743.
- Prokopiou E.M., Ryder S.A., Walsh J.J. Tumour vasculature targeting agents in hybrid/conjugate drugs. *Angiogenesis* 2013;16(3):503–24. DOI: 10.1007/s10456-013-9347-8.
- Bailly C. Cell-targeted cytotoxics: a new generation of cytotoxic agents for cancer treatment. *Phytochemistry Rev* 2014;13(1):171–81. DOI: 10.1007/s11101-013-9300-x.
- Rana A., Alex J.M., Chauhan M. et al. A review on pharmacophoric designs of antiproliferative agents. *Med Chem Res* 2015;24(3):903–20. DOI: 10.1007/s00044-014-1196-5.
- Nepali K., Sharma S., Sharma M. et al. Rational approaches, design strategies, structure activity relationship and mechanistic insights for anticancer hybrids. *Eur J Med Chem* 2014;77:422–87. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.03.018.
- Bansal Y., Silakari O. Multifunctional compounds: smart molecules for multifactorial diseases. *Eur J Med Chem* 2014;76:31–42. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.01.060.
- Fortin S., Bérubé G. Advances in the development of hybrid anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2013;8(8):1029–47. DOI: 10.1517/17460441.2013.798296.
- Kerru N., Singh P., Koorbanally N. et al. Recent advances(2015–2016) in anticancer hybrids. *Eur J Med Chem* 2017;142:179–212. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.07.033.
- Bérubé G. Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists. *Curr Med Chem* 2006;13:131–54. DOI: 10.2174/092986706775197908.
- Bérubé G. An overview of molecular hybrids in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2016;11(3):281–305. DOI: 10.1517/17460441.2016.1135125.
- Ding H., Yang D., Zhao C. et al. Protein-gold hybrid nanocubes for cell imaging and drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7(8):4713–9. DOI: 10.1021/am5083733.
- Pandita D., Kumar S., Lather V. Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid)nanoparticles: design and delivery prospectives. *Drug Discov Today* 2015;20(1):95–104. DOI: 10.1016/j.drudis.2014.09.018.
- Deng C., Wu J., Cheng R. et al. Functional polypeptide and hybrid materials: precision synthesis via  $\alpha$ -amino acid N-carboxyanhydride polymerization and emerging biomedical applications. *Prog Polymer Sci* 2014;39(2):330–64. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2013.10.008.
- Su T.L., Lee T.C., Kakadiya R. The development of bis (hydroxymethyl) pyrrole analogs as bifunctional DNA cross-linking agents and their chemotherapeutic potential. *Eur J Med Chem* 2013;69:609–21. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.09.016.
- Katsori A.M., Hadjipavlou-Litina D. Coumarin derivatives: an updated patent review(2012–2014). *Expert Opin Ther Pat* 2014;24(12):1323–47. DOI: 10.1517/13543776.2014.972368.
- Teiten M.H., Dicato M., Diederich M. Hybrid curcumin compounds: a new strategy for cancer treatment. *Molecules* 2014;19(12):20839–63. DOI: 10.3390/molecules191220839.
- Shao M., Yuan Y., Yu K. et al. Discovery and identification of PIM-1 kinase inhibitors through a hybrid screening approach. *Mol Divers* 2014;18(2):335–44. DOI: 10.1007/s11030-014-9504-z.
- Zhan P., Pannecouque C., de Clercq E. et al. Anti-HIV drug discovery and development: current innovations and future trends. *J Med Chem* 2016;59(7):2849–78. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00497.
- Zhan P., Liu X. Rationally designed multitarget anti-HIV agents. *Curr Med Chem* 2013;20(13):1743–58. DOI: 10.2174/0929867311320130011.
- Drwal M.N., Griffith R. Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening. *Drug Discov Today Technol* 2013;10(3):395–401. DOI: 10.1016/j.ddtec.2013.02.002.
- Zhan P., Itoh Y., Suzuki T., Liu X. Strategies for the discovery of target-specific or isoform-selective modulators. *J Med Chem* 2015;58(19):7611–33. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00229.
- Chauhan J.S., Dhanda S.K., Singla D. et al. QSAR-based models for designing quinazoline/imidazothiazoles/pyrazolopyrimidines based inhibitors against wild and mutant EGFR. *PLoS One* 2014;9(7):101079. DOI: 10.1371/journal.pone.0101079.
- Rao G.V., Price C.C. Synthesis of some steroidal nitrogen mustards. *J Org Chem* 1962;27:205–10. DOI: 10.1021/jo01048a052.
- Jones J.B., Adam D.J., Leman J.D. Steroids and steroidases. 10. Potentially antitumor active androstane compounds containing C-17 nitrogen mustard functions. *J Med Chem* 1971;14(9):827–33. DOI: 10.1021/jm00291a013.
- Jones J.B., Leman J.D. Steroids and steroidases. XI. Synthetic approaches to C-17 bis(2-hydroxyethyl)-amino compounds as potential precursors of 17-hydroxyandrostane nitrogen mustards. *Can J Chem* 1971;49(14):2420–6. DOI: 10.1139/v71-395.
- Carroll F.I., Philip A., Blackwell J.T. et al. Antitumor and antileukemic effects of some steroids and other biologically

- interesting compounds containing an alkylating agent. *J Med Chem* 1972;15(11):1158–61. DOI: 10.1021/jm00281a016.
27. Bansal R., Acharya P.C. Man-made cytotoxic steroids: exemplary agents for cancer therapy. *Chem Rev* 2014;114(14):6986–7005. DOI: 10.1021/cr4002935.
28. Ларионов Л.Ф., Дегтева С.А., Лесная Н.А. Экспериментальные данные о противоопухолевом препарате фенестерин. *Вопросы онкологии* 1962;8(4):12–4. [Larionov L.F., Degteva S.A., Lesnaia N.A. Experiments with the anticancer preparation, phenesterine. *Voprosy onkologii = Problems in oncology* 1962;8(4):12–4. (In Russ.)].
29. Дегтева С.А. Спектр и селективность противоопухолевого действия фенестерина. *Вопросы онкологии* 1964;10:52–6. [Degteva S.A. Spectrum and selectivity of the antitumor action of fenesterin. *Voprosy onkologii = Problems in oncology* 1964;10:52–6. (In Russ.)].
30. Дегтева С.А., Ларионов Л.Ф. Токсичность и противоопухолевое действие  $\beta$ -ситостерола и сложных эфиров холестерина п-[бис(2-хлорэтил)амино]фенилуксусной кислоты. *Вопросы онкологии* 1966;12:51–3. [Degteva S.A., Larionov L.F. Toxicity and antitumor effect of  $\beta$ -sitosterol and cholesterol esters of p-[bis(2-chloroethyl)amino]phenylacetic acid. *Voprosy onkologii = Problems in oncology* 1966;12:51–3. (In Russ.)].
31. Saha P., Debnath C., Bérubé G. Steroid-linked nitrogen mustards as potential anticancer therapeutics: a review. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013;137:271–300. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.05.004.
32. Ansfield F.J., Carter A.C., Goldenberg I.S., Segaloff A. Phase I study of phenesterin (NSC-104469). *Cancer Chemother Rep* 1971;55(3):259–63.
33. Bloom R.E., Polivogianis L., Davis T.E. et al. Phase II evaluation of phenesterin in patients with advanced ovarian cancer. *Cancer Chemother Rep* 1983;67(6):601–2.
34. Papageorgiou A., Koutsourea A.I., Arsenou E.S. et al. Structure-antileukemic activity relationship study of B- and D-ring modified and non-modified steroidal esters of chlorambucil's active metabolite. *Anticancer Drugs* 2005;16(10):1075–82.
35. Mitra K., Marquis J.C., Hillier S.M. et al. A rationally designed genotoxin that selectively destroys estrogen receptor-positive breast cancer cells. *J Am Chem Soc* 2002;124(9):1862–3. DOI: 10.1021/ja017344p.
36. Fouteris M.A., Koutsourea A.I., Arsenou E.S. et al. Structure-antileukemic activity relationship study of B- and D-ring modified and nonmodified steroidal esters of 4-methyl-3-N,N-bis(2-chloroethyl) amino benzoic acid: a comparative study. *Anticancer Drugs* 2007;18(9):997–1004. DOI: 10.1097/CAD.0b013e3281822629.
37. Muntzing J., Shukla S.K., Chu T.M. et al. Pharmacoclinical study of oral estramustine phosphate (Estracyt) in advanced carcinoma of the prostate. *Investig Urol* 1974;12:65–8.
38. Dahllöf B., Billström A., Cabral F., Hartley-Asp B. Estramustine depolymerizes microtubules by binding to tubulin. *Cancer Res* 1993;53(19):4573–81.
39. Panda D., Miller H.P., Islam K. et al. Stabilization of microtubule dynamics by estramustine by binding to a novel site in tubulin: a possible mechanistic basis for its antitumor action. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(20):10560–4. DOI: 10.1073/pnas.94.20.10560.
40. Hauser A.R., Merryman R. Estramustine phosphate sodium. *Drug Intell Clin Pharm* 1984;18(5):368–74. DOI: 10.1177/106002808401800502.
41. Catsoulacos P., Papageorgiou A., Margariti E. et al. Comparison of current alkylating agents with a homo-aza-steroidal ester for antineoplastic activity. *Oncology* 1994;51(1):74–8. DOI: 10.1159/000227314.
42. Evenaar A.H., Wins E.H., van Putten L.M. Cell killing effectiveness of an alkylating steroid (Leo 1031). *Eur J Cancer* 1973;9(10):773–4. DOI: 10.1016/0014-2964(73)90071-6.
43. Brandt L., Kónyves I., Moller T.R. Therapeutic effect of Leo 1031, an alkylating corticosteroid ester, in lymphoproliferative disorders. I. Chronic lymphocytic leukaemia. *Acta Med Scand* 1975;197(4):317–22. DOI: 10.1111/j.0954-6820.1975.tb04925.x.
44. Moller T.R., Brandt L., Kónyves I. et al. Therapeutic effect of Leo 1031, an alkylating corticosteroid ester, in lymphoproliferative disorders. II. Lymphocytic lymphoma. *Acta Med Scand* 1975;197(4):323–7. DOI: 10.1111/j.0954-6820.1975.tb04926.x.
45. Brandt L., Kónyves I. Therapeutic effect of prednimustine (LEO 1031) in various types of leukaemia. *Eur J Cancer* 1977;13(4–5):393–8. DOI: 10.1016/0014-2964(77)90088-3.
46. Harrap K.R., Riches P.G., Gilby E.D. et al. Studies on the toxicity and antitumor activity of prednimustine, a prednisolone ester of chlorambucil. *Eur J Cancer* 1977;13(8):873–1. DOI: 10.1016/0014-2964(77)90143-8.
47. Kubota T., Kawamura E., Suzuki T. et al. Antitumor activity and pharmacokinetics of estra-1,3,5(10)-triene-3,17 $\beta$ -diol, 3-benzoate, 17-((4-(4-(bis(2-chloroethyl)amino)phenyl)-1-oxobutoxy)acetate)(bestrabucil) in human tumor xenografts serially transplanted into nude mice. *Jpn J Clin Oncol* 1986;16(4):357–64. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jjco.a039161.
48. Catsoulacos P., Boutis L. Aza-steroids. Beckmann rearrangement of  $\beta$ -acetoxy-5 $\alpha$ -androstan-17-one oxime acetate with boron fluoride. Alkylating agents. *Chimie Thérapie* 1973;8:215–7. DOI: 10.1002/chin.197332315.
49. Catsoulacos P., Pairs G. Activity of 17 beta-hydroxy-3-aza-A-homo-4 alpha-androsten-4-one-p-N, N-bis(2-chloroethyl)aminophenoxyacetate-(NSC-620480) in P388 leukemia. Activity of steroidal lactams in Ehrlich tumor. *Methods and Find Exp Clin Pharmacol* 1990;12(7):501–5.
50. Athanasiou C., Pairs G., Catsoulacos P., Athanasiou K. Synthesis of a new nor-aza-steroidal ester of p-N,N-bis(2-chloroethyl)aminophenylbutyric acid and *in vitro* study of its mutagenicity and clastogenicity. *Oncology* 1986;43(6):390–4. DOI: 10.1159/000226408.
51. Camoutsis C., Trafalis D.T. An overview on the antileukemic potential of D-homo-aza- and respective 17beta-acetamido-steroidal alkylating esters. *Invest New Drugs* 2003;21(1):47–54. DOI: 10.1023/A:1022964225715.
52. Karayianni V., Papageorgiou A., Mioglou E. et al. 7-Keto hybrid steroidal esters of nitrogen mustard: cytogenetic and antineoplastic effects. *Anticancer Drugs* 2002;13(6):637–43. DOI: 10.1097/00001813-200207000-00011.
53. Голубовская Л.Е., Смирнова Ж.С., Толкачев В.Н. и др. Цитотоксические стероиды с антиэстрогенной активностью в ряду 11-ашилоксистероидов эстра-1,3,5(10)-триенов. *Биоорганическая химия* 2006;32(2):221–3. DOI: 10.1134/S1068162006020130. [Golubovskaya L.E., Smirnova Z.S., Tolkahev V.N. et al. Cytotoxic steroids with antiestrogenic activity of the 11-acyloxyestra-1,3,5(10)-triene series. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2006;32(2):221–3. (In Russ.)].
54. Резников В.М., Голубовская Л.Е., Маяцкая Е.Е. и др. Противоопухолевые стероиды. 3. Синтез и биологическая активность производных

- 11 $\beta$ -гидроксиэстра-1,3,5(10)-триенов с бис-(2-хлорэтил)аминосодержащим заместителем в положении 3. Химико-фармацевтический журнал 2008;42(3):9–12. DOI: 10.1007/s11094-008-0080-3. [Rzheznikov V.M., Golubovskaya L.E., Mayatskaya E.E. et al. Antitumor steroids. 3. Synthesis and biological activity of 11 $\beta$ -hydroxy-estra-1,3,5(10)-triene derivatives with bis-(2-chloroethyl)amino-containing substituents in the 3-position. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal = Pharmaceutical Chemistry Journal 2008;42(3):9–12. (In Russ.)].
55. Gupta A., Saha P., Descôteaux C. et al. Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-chlorambucil hybrids as anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20(5):1614–8. DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.01.053.
  56. Bastien D., Hanna R., Leblanc V. et al. Synthesis and preliminary *in vitro* biological evaluation of 7 $\alpha$ -testosterone-chlorambucil hybrid designed for the treatment of prostate cancer. *Eur J Med Chem* 2013;64:442–7. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.04.027.
  57. Acharya P.C., Bansal R. Synthesis of androstene oxime-nitrogen mustard bioconjugates as potent antineoplastic agents. *Steroids* 2017;123:73–83. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.04.005.
  58. Trafalis D., Geromichalou E., Dalezis P. et al. Synthesis and evaluation of new steroidal lactam conjugates with aniline mustards as potential antileukemic therapeutics. *Steroids* 2016;115:1–8. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.07.009.
  59. Sanchez-Cano C., Huxley M., Ducani C. et al. Conjugation of testosterone modifies the interaction of mono-functional cationic platinum (II) complexes with DNA, causing significant alterations to the DNA helix. *Dalton Trans* 2010;39(47):11365–74. DOI: 10.1039/c0dt00839g.
  60. Sanchez-Cano C., Huxley M., Ducani C. et al. An androgenic steroid delivery vector that imparts activity to a non-conventional platinum (II) metallo-drug. *Dalton Trans* 2010;39(47):11353–64. DOI: 10.1039/c0dt00838a.
  61. Descôteaux C., Leblanc V., Bélanger G. et al. Improved synthesis of unique estradiol-linked platinum (II) complexes showing potent cytotoxic activity and affinity for the estrogen receptor alpha and beta. *Steroids* 2008;73(11):1077–89. DOI: 10.1016/j.steroids.2008.04.009.
  62. Descôteaux C., Provencher-Mandeville J., Mathieu I. et al. Synthesis of 17 $\beta$ -estradiol platinum (II) complexes: biological evaluation on breast cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett* 2003;13(22):3927–31. DOI: 10.1016/j.bmcl.2003.09.011.
  63. Provencher-Mandeville J., Debnath C., Mandal S.K. et al. Design, synthesis and biological evaluation of estradiol-PEG-linked platinum (II) hybrid molecules: comparative molecular modeling study of three distinct families of hybrids. *Steroids* 2011;76(1–2):94–103. DOI: 10.1016/j.steroids.2010.09.004.
  64. Provencher-Mandeville J., Descôteaux C., Mandal S.K. et al. Synthesis of 17 $\beta$ -estradiol-platinum (II) hybrid molecules showing cytotoxic activity on breast cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett* 2008;18(7):2282–7. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.03.005.
  65. Saha P., Descôteaux C., Brasseur K. et al. Synthesis, antiproliferative activity and estrogen receptor  $\alpha$  affinity of novel estradiol-linked platinum (II) complex analogs to carboplatin and oxaliplatin. Potential vector complexes to target estrogen-dependent tissues. *Eur J Medicinal Chem* 2012;48:385–90. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.12.017.
  66. Fortin S., Brasseur K., Morin N. et al. New platinum (II) complexes conjugated at position 7 $\alpha$  of 17 $\beta$ -acetyl-testosterone as new combi-molecules against prostate cancer: design, synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation. *Eur J Med Chem* 2013;68:433–43. DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.08.011.
  67. Wüst F., Scheller D., Spies H. et al. Synthesis of oxorhenium (V) complexes derived from 7 $\alpha$ -functionalized testosterone: first rhenium-containing testosterone derivatives. *Eur J Inorg Chem* 1998;(6):789–93.
  68. Dhyani M.V., Satpati D., Korde A. et al. Synthesis and preliminary bioevaluation of 99m tc(co)3-17 $\alpha$ -triazolylandrost-4-ene-3-one derivative prepared via click chemistry route. *Cancer Biother Radiopharm* 2011;26(5):539–45. DOI: 10.1089/cbr.2011.0966.
  69. Zhang X., Zuo Z., Tang J. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel estrogen-derived steroid metal complexes. *Bioorg Med Chem Lett* 2013;23(13):3793–7. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.088.
  70. Szánti-Pintér E., Wouters J., Gömöry Á. et al. Synthesis of novel 13 $\alpha$ -18-norandrostane-ferrocene conjugates via homogeneous catalytic methods and their investigation on TRPV1 receptor activation. *Steroids* 2015;104:284–93. DOI: 10.1016/j.steroids.2015.10.016.
  71. Anstead G.M., Carlson K.E., Katzenellenbogen J.A. The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997;62(3):268–303. DOI: 10.1016/s0039-128x(96)00242-5.
  72. Sadeghi-Aliabadi H., Brown J.E. Synthesis, analysis and biological evaluation of novel steroidal estrogenic prodrugs for the treatment of breast cancer. *Pharm Biol* 2004;42(4–5):367–73. DOI: 10.1080/13880200490519686.
  73. Hartman N.G., Patterson L.H., Workman P. et al. Doxorubicin-3'-NH-oestrone-17-oxime-ethyl-carbonyl, a doxorubicin-oestrone conjugate that does not redox cycle in rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1990;40(5):1164–7. DOI: 10.1016/0006-2952(90)90511-1.
  74. Saha P., Fortin S., Leblanc V. et al. Design, synthesis, cytotoxic activity and estrogen receptor  $\alpha$  affinity of doxorubicin conjugates at 16 $\alpha$ -position of estrogen for site-specific treatment of estrogen receptor positive breast cancer. *Steroids* 2012;77(11):1113–22. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.06.004.
  75. Cai B., Liao A., Lee K.K. et al. Design, synthesis of methotrexate-diosgenin conjugates and biological evaluation of their effect on methotrexate transport-resistant cells. *Steroids* 2016;116:45–51. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.10.006.
  76. Sreekanth V., Bansal S., Motiani R.K. et al. Design, synthesis, and mechanistic investigations of bile acid-tamoxifen conjugates for breast cancer therapy. *Bioconjug Chem* 2013;24(9):1468–84. DOI: 10.1021/bc300664k.
  77. Garrido M., González-Arenas A., Camacho-Arroyo I. et al. Effect of new hybrids based on 5,16-pregnadiene scaffold linked to an anti-inflammatory drug on the growth of a human astrocytoma cell line (U373). *Eur J Med Chem* 2015;93:135–41. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.01.048.
  78. Letis A.S., Seo E.J., Nikolopoulos S.S. et al. Synthesis and cytotoxic activity of new artemisinin hybrid molecules against human leukemia cells. *Bioorg Med Chem* 2017;25(13):3357–67. DOI: 10.1016/j.bmc.2017.04.021.
  79. Fournier D., Poirier D. Estradiol dimers as a new class of steroid sulfatase reversible inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2009;19(3):693–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.12.047.
  80. Arenas-González A., Mendez-Delgado L.A., Merino-Montiel P. et al. Synthesis of monomeric and dimeric steroids containing [1,2,4]triazolo [1,5- $\alpha$ ] pyrimidines. *Steroids* 2016;116:13–9. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.09.014.
  81. Hadden M.K., Blagg B.S.J. Dimeric Approaches to Anti-Cancer Chemotherapeutics. *Anticancer Agents*

- Med Chem 2008;8(7):807–16.  
DOI: 10.2174/187152008785914743
82. Denisov I.G., Mak P.J., Grinkova Y.V. et al. The use of isomeric testosterone dimers to explore allosteric effects in substrate binding to cytochrome P450 CYP3A4. *J Inorg Biochem* 2015;158:77–85. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.12.019.
83. Vesper A.-R., Lacroix J., C.-Gaudreault R. et al. Synthesis of novel C<sub>2</sub>-symmetric testosterone dimers and evaluation of antiproliferative activity on androgen-dependent and -independent prostate cancer cell lines. *Steroids* 2016;115:98–104. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.08.012.
84. Chanphai P., Agudelo D., Vesper A.R. et al. Effect of testosterone and its aliphatic and aromatic dimmers on DNA morphology. *Int J Biol Macromol* 2016;95:850–5. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.090.
85. Chanphai P., Agudelo D., Vesper A.R. et al. Testosterone and its dimers alter tRNA morphology. *J Pharm Biomed Anal* 2017;134:269–74. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.11.053.
86. Chanphai P., Bekale L., Tajmir-Riahi H.A. Conjugation of steroids with PAMAM nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;136:1035–41. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.10.042.
87. Chanphai P., Vesper A.R., Bekale L. et al. Transporting testosterone and its dimers by serum proteins. *J Photochem Photobiol B* 2015;153:173–83. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2015.09.008.
88. Jurásek M., Džubák P., Sedlák D. et al. Preparation, preliminary screening of new types of steroid conjugates and their activities on steroid receptors. *Steroids* 2013;78(3):356–61. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.11.016.
89. Lu Y.M., Deng L.Q., Huang X. et al. Synthesis and anionophoric activities of dimeric polyamine-steroid conjugates: the impact of rigid vs. flexible linkers. *Org Biomol Chem* 2013;11(47):8221–7. DOI: 10.1039/c3ob41969j.
90. Fournier D., Poirier D., Mazumdar M. et al. Design and synthesis of bisubstrate inhibitors of type 1 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: overview and perspectives. *Eur J Med Chem* 2008;43(11):2298–306. DOI: 10.1016/j.ejmech.2008.01.044.
91. Bérubé M., Poirier D. Improved synthesis of EM-1745, preparation of its C17-ketone analogue and comparison of their inhibitory potency on 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2009;24(3):832–43. DOI: 10.1080/14756360802399761.
92. Qiu W., Campbell R.L., Ganglof A. et al. A concerted, rational design of type 1 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitors: estradiol-adenosine hybrids with high affinity. *FASEB J* 2002;16(13):1829–31. DOI: 10.1096/fj.02-0026fje.
93. Bodnár B., Mernyák E., Wölfling J. et al. Synthesis and biological evaluation of triazolyl 13 $\alpha$ -estrone-nucleoside bioconjugates. *Molecules* 2016;21(9):1212. DOI: 10.3390/molecules21091212.
94. Bodnár B., Mernyák E., Szabó J. et al. Synthesis and *in vitro* investigation of potential antiproliferative monosaccharide-D-secoestrone bioconjugates. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27(9):1938–42. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.03.029.
95. Navacchia M.L., Marchesi E., Mari L. et al. Rational design of nucleoside-bile acid conjugates incorporating a triazole moiety for anticancer evaluation and SAR exploration. *Molecules* 2017;22(10):1710. DOI: 10.3390/molecules22101710.
96. Mendoza-Sanchez R., Cotoir-White D., Kulpa J. et al. Design, synthesis and evaluation of antiestrogen and histone deacetylase inhibitor molecular hybrids. *Bioorg Med Chem* 2015;23(24):7597–606. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.11.005.
97. Jurásek M., Džubák P., Rimpelová S. et al. Trilobolide-steroid hybrids: synthesis, cytotoxic and antimycobacterial activity. *Steroids* 2016;117:97–104. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.08.011.
98. Musa M.A., Khan M.O., Cooperwood J.S. Synthesis and antiproliferative activity of coumarin-estrogen conjugates against breast cancer cell lines. *Lett Drug Des Discov* 2009;6(2):133–8. DOI: 10.2174/157018009787582624.
99. Нуриева Е.В., Зефиоров Н.А., Мамаева А.В. и др. Синтез стероидных аналогов тубулокластина, их цитотоксичность и действие на микротрубочки клеток карциномы А549. *Известия Академии наук. Серия химическая* 2018;67(4):688–9393. DOI: 10.1007/s11172-018-2123-6. [Nurieva E.V., Zefirov N.A., Mamaeva A.V. et al. Synthesis of steroid analogs of tubuloclastin, their cytotoxicity and effect on microtubules of A549 carcinoma cells. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya khimicheskaya = Russian Chemical Bulletin* 2018;67(4):688–93. (In English).
100. Song J.L., Zhang J., Liu C.L. et al. Design and synthesis of pregnenolone/2-cyanoacryloyl conjugates with dual NF- $\kappa$ B inhibitory and anti-proliferative activities. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27(20):4682–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.09.013.
101. Ke S., Shi L., Yang Z. Discovery of novel isatin-dehydroepiandrosterone conjugates as potential anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2014;25(20):4628–31. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.08.041.
102. Sudhakar G., Bathula S.R., Banerjee R. Development of new estradiol-cationic lipid hybrids: ten-carbon twin chain cationic lipid is a more suitable partner for estradiol to elicit better anticancer activity. *Eur J Med Chem* 2014;86:653–63. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.030.
103. Sakamoto K.M., Kim K.B., Kumagai A. et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(15):8554–9. DOI: 10.1073/pnas.141230798.
104. Sakamoto K.M., Kim K.B., Verma R. et al. Development of Protacs to target cancer-promoting proteins for ubiquitination and degradation. *Mol Cell Proteomics* 2003;2(12):1350–8. DOI: 10.1074/mcp.T300009-MCP200.
105. Schneekloth J.S.Jr., Fonseca F.N., Koldobskiy M. et al. Chemical genetic control of protein levels: selective *in vivo* targeted degradation. *J Am Chem Soc* 2004;126(12):3748–54. DOI: 10.1021/ja039025z.
106. Rodriguez-Gonzalez A., Cyrus K., Salcius M. et al. Targeting steroid hormone receptors for ubiquitination and degradation in breast and prostate cancer. *Oncogene* 2008;27(57):7201–11. DOI: 10.1038/onc.2008.320.
107. Itoh Y., Kitaguchi R., Ishikawa M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of nuclear receptor-degradation inducers. *Bioorg Med Chem* 2011;19(22):6768–78. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.09.041.
108. Levine P.M., Imberg K., Garabedian M.J., Kirshenbaum K. Multivalent Peptidomimetic conjugates: a versatile platform for modulating androgen receptor activity. *J Am Chem Soc* 2012;134(16):6912–5. DOI: 10.1021/ja300170n.
109. Wang Y., Dehigaspitiya D.C., Levine P.M. et al. Multivalent peptoid conjugates which overcome enzalutamide resistance in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2016;76(17):5124–32. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0385.
110. Levine P.M., Lee E., Greenfield A. et al. Androgen receptor antagonism by divalent ethisterone conjugates in castrate-resistant prostate cancer cells. *ACS Chem Biol* 2012;7(10):1693–701. DOI: 10.1021/cb300332w.
111. James D.A., Swamy N., Paz N. et al. Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer. *Bioorg Med Chem*

- Lett 1999;9(16):2379–84.  
DOI: 10.1016/s0960-894x(99)00390-x.
112. Swamy N., James D.A., Mohr S.C. et al. An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Bioorg Med Chem* 2002; 10(10):3237–43.  
DOI: 10.1016/s0968-0896(02)00242-0.
113. El-Akra N., Noirot A., Faye J.C. et al. Synthesis of estradiol-pheophorbide  $\alpha$  conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells. *Photochem Photobiol Sci* 2006;5(11): 996–9. DOI: 10.1039/b606117f.
114. Sadler S., Persons K.S., Jones G.B. et al. Internalization of a C17 $\alpha$ -alkynyl-estradiol-porphyrin conjugate into estrogen receptor positive MCF-7 breast cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21(15):4638–41.  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.05.094.
115. Zolottsev V.A., Zazulina O.V., Morozovich G.E. et al. Conjugates of pyropheophorbide  $\alpha$  with androgen receptor ligands. *Makroheterotsikly = Macroheterocycles* 2017;10(1):77–80.  
DOI: 10.6060/mhc160857p.
116. Zolottsev V.A., Ponomarev G.V., Taratynova M.O. et al. Conjugates of 17-substituted testosterone and epitestosterone with pyropheophorbide a differing in the length of linkers. *Steroids* 2018;138:82–90.  
DOI: 10.1016/j.steroids.2018.06.011.
117. Taratynova M.O., Zolottsev V.A., Tkachev Ya.V. et al. Trifunctional (pyropheophorbide  $\alpha$ -steroid-hexadecyl chain) conjugates: synthesis, solubilization, interaction with cultured cells. *Makroheterotsikly = Macroheterocycles* 2018;11(3):277–85.  
DOI: 10.6060/mhc180999p.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

В.А. Золотцев/V.A. Zolottsev: <https://orcid.org/0000-0002-2067-5887>

А.С. Латышева/A.S. Latysheva: <https://orcid.org/0000-0001-6669-5739>

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено в рамках Программы фундаментальных исследований Государственной академии наук на 2013–2020 гг. при поддержке РФФИ (Проект № 18-75-10008).

**Financing.** The study was carried out within the Fundamental Research Program of the State Academy of Sciences for 2013–2020 with the support of RSF (Project No. 18-75-10008).

Статья поступила: 17.09.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 17.09.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.

## $\beta_2$ -ИНТЕГРИНЫ LFA-1, MAC-1 – МИШЕНЬ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ ИММУНИТЕТА ПРОТИВ ОПУХОЛИ

О.А. Бочарова<sup>1</sup>, Р.В. Карпова<sup>1</sup>, Е.В. Бочаров<sup>1</sup>, А.А. Вершинская<sup>1</sup>, М.А. Барышникова<sup>1</sup>,  
И.В. Казеев<sup>1</sup>, Ю.Н. Соловьев<sup>1</sup>, В.Г. Кучеряну<sup>2</sup>

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

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

**Контакты:** Регина Васильевна Карпова [planta39@rambler.ru](mailto:planta39@rambler.ru)

**Цель исследования** – изучение экспрессии  $\beta_2$ -интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18) на клетках крови у мышей CBA в онтогенезе, а также под влиянием сухого экстракта мультифитоадаптогена в 1-й месяц постнатального развития.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на мышцах-самцах линии CBA (сублиния CBA/LacY). Животные опытной группы получали 0,3 % водный раствор сухого экстракта мультифитоадаптогена в течение 1-го месяца жизни (профилактическое применение). Препарат был изготовлен по технологии сублимирования из жидкой формы мультифитоадаптогена, включающего компоненты экстрактов 40 растений, в том числе *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea*, и другие адаптогены. В возрасте 4, 8, 22 мес определяли экспрессию CD11a- и CD11b-антигенов на клетках периферической крови в реакции непрямой иммунофлуоресценции. Статистический анализ результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0.

**Результаты.** При развитии гепатокарцином у генетически предрасположенных мышеч-самцов CBA наблюдали подавление продукции CD11a- и CD11b-антигенов на клетках крови. Введение сухого экстракта мультифитоадаптогена в 1-й месяц постнатального онтогенеза повышало экспрессию CD11a- и CD11b-антигенов. Активность исследуемого препарата в отношении данного показателя не отличалась от жидкой формы фитоадаптогена, показанной ранее.

**Заключение.** Улучшение продукции  $\beta_2$ -интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови мышеч, генетически предрасположенных к раку печени, при введении сухого экстракта препарата в 1-й месяц постнатального развития способствует адгезии эффекторов иммунитета с клетками опухолей.

**Ключевые слова:**  $\beta_2$ -интегрины LFA-1 и Mac-1, адгезионные взаимодействия, противоопухолевый иммунитет, спонтанные гепатомы, фитоадаптогены

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-53-58



### LFA-1, MAC-1 LEUKOCYTE INTEGRINS – TARGET FOR TUMOUR IMMUNITY MAGNIFICATION

O.A. Bocharova<sup>1</sup>, R.V. Karpova<sup>1</sup>, E.V. Bocharov<sup>1</sup>, A.A. Vershinskaya<sup>1</sup>, M.A. Baryshnikova<sup>1</sup>, I.V. Kazeev<sup>1</sup>,  
Y.N. Soloviev<sup>1</sup>, V.G. Kucheryanu<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

**The aim** of this investigation was to evaluate the expression of LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18)  $\beta_2$  integrins on blood cells in CBA mice in ontogeny as well as under the dry extract of multifitoadaptogen administration during the first month of postnatal development.

**Materials and methods.** The study was carried out on CBA male mice (CBA/LacY). The experimental mice received 0.3 % dry multifitoadaptogene extract water-solution during the first month of life (preventive administration). Preparation was produced by a desiccation technology of forty medical herbs (including *Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea*) water-ethanol extracts components. The CD11a and CD11b antigens expressions on peripheral blood cells were analyzed by indirect immunofluorescence reaction at the age of 4, 8, 22 months. Statistical analysis was performed with the program Statistica 6.0.

**Results.** The development of genetically predisposed hepatocarcinomas in CBA male-mice was accompanied by a decrease in the expression of CD11a and CD11b antigens on blood cells. Dry multifitoadaptogene extract administration during the first month of postnatal ontogeny revealed the CD11a and CD11b antigens up-regulated expression. The effect of the dry multifitoadaptogene extract is comparable to that for the liquid form of multifitoadaptogen previously identified.

**Conclusion.** Up-regulated LFA-1 and Mac-1  $\beta_2$  integrins expression on blood cells using dry multifitoadaptogene extract administration during the first month of postnatal development is essential for enhance the contact interactions of immune effectors and cancer cells.

**Key words:** LFA-1, Mac-1  $\beta_2$  integrins, adhesive interaction, anti-tumour immunity, spontaneous hepatomas, CBA male-mice, phytoadaptogenes

### Введение

$\beta_2$ -интегрины, к которым, в частности, относятся LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen-1, CD11a/CD18) и Mac-1 (monocyte adhesion complex CD11b/CB18), играют существенную роль в привлечении активированных цитотоксических лейкоцитов из периферической крови в опухолевую ткань. Контррецепторами LFA-1 и Mac-1 являются гистонеспецифические молекулы адгезии ICAM-1, участвующие также в поддержании гомотипической интеграции тканей [1].

Исследования ряда авторов показывают, что ослабленная экспрессия ICAM-1 на мембранах опухолевых клеток представляет собой механизм, подавляющий экспрессию LFA-1 и Mac-1, что снижает прикрепление иммунных эффекторов к клеткам-мишеням и тем самым – внутриопухолевую инфильтрацию лейкоцитов [2, 3]. Очевидно, изучение возможности восстановления адгезионных контактов при опухолевом процессе может внести вклад в реализацию противоопухолевого эффекта.

Интерес в данном аспекте представляют фитоадаптогены, которые продемонстрировали способность нормализовать межклеточную адгезию и усиливать реакции иммунитета против опухоли [4, 5].

В предыдущих исследованиях на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей CBA было выявлено, что кратковременное в раннем онтогенезе воздействие на примере комплексного мультифитоадаптогена (МФА) в форме жидкого экстракта приводит к усилению экспрессии интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках периферической крови. Оно сопровождается признаками лейкоцитарной инфильтрации и деструкции гепатом, подавлением сывороточного уровня иммуносупрессивных интерлейкинов 6 и 10. Эти результаты оказались существенными для снижения частоты спонтанного опухолеобразования и увеличения продолжительности и качества жизни животных [6–9].

Однако до сих пор не определен фенотип клеток, инфильтрирующих опухоль, и вопрос о том, экспрессированы ли на этих клетках, в частности, молекулы лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 при использовании МФА, до конца не выяснен. Наряду с этим с фармакологической точки зрения более современной и перспективной является сухая форма экстракта, практически субстанция препарата.

В связи с этим исследование воздействия сухого экстракта мультифитоадаптогена (СМФА) на экспрессию лейкоцитарных интегринов, а также оценка

значимости коррекции нарушений для усиления контактных взаимодействий иммунных эффекторов с опухолевыми клетками является актуальным.

**Цель исследования** – изучение экспрессии  $\beta_2$ -интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18) на клетках крови у мышей CBA в онтогенезе, а также под влиянием СМФА в 1-й месяц постнатального развития.

### Материалы и методы

Работа проведена на мышках-самцах высокоразовой линии CBA, сублинии CBA/Lac Y [10]. Источник получения мышей: локальная колония НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Животных содержали и выводили из эксперимента в соответствии с требованиями Европейской директивы по охране животных, используемых в научных целях. Контрольные животные получали только воду в качестве питья. Животные опытной группы получали 0,3 % водный раствор СМФА в 1-й месяц постнатального развития (профилактическое применение). Препарат получали самки, начиная с последних сроков беременности до отъема детенышей в возрасте 3 нед. Затем 1 нед детеныши-самцы пили воду с препаратом самостоятельно.

Мультифитоадаптоген представляет собой нетоксичную фармацевтическую композицию на основе компонентов экстрактов 40 растений, в том числе фитоадаптогенов (женьшеня, элеутерококка, аралии и др.). В составе МФА определены тритерпеновые сапонины, флавоноиды, эфирные масла, аминокислоты, витамины и другие соединения. Разработаны способы его биологической и физико-химической стандартизации [11–13]. Определены антиоксидантные, антистрессорные, гормонотонизирующие, антимутагенные, противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства [14–17].

Сухой экстракт МФА был приготовлен из жидкой формы с использованием технологии сублимирования.

У контрольных и опытных животных в возрасте 4, 8, 22 мес на лимфоцитах периферической крови исследовали уровни экспрессии лейкоцитарных интегринов CD11a, CD11b методом непрямой иммунофлуоресценции. Оставшиеся животные находились под наблюдением вплоть до их естественной гибели.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы Statistica 6.0, применяя дисперсионный анализ One-way ANOVA. Данные

выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Для оценки различий между группами применяли критерий Ньюмена–Кейлса. Статистически значимым считали различие при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты воздействия СМФА на экспрессию CD11a-антигена клетками крови у мышей-самцов СВА в онтогенезе. Из таблицы видно, что в возрасте 4 и 8 мес у мышей обеих групп количество клеток, экспрессирующих CD11a-антиген, статистически не различалось ( $p \geq 0,5$ ). К 22-месячному возрасту у мышей контрольной группы выявлено статистически достоверное снижение этого показателя с  $45,9 \pm 3,4$  % (в возрасте 8 мес) до  $36,5 \pm 1,9$  % ( $p_{8-22} = 0,03$ ). У мышей опытной группы к 22 мес изменение экспрессии CD11a-антигена по сравнению с ранним периодом онтогенеза происходит статистически незначимо ( $52,3 \pm 3,0$  и  $44,6 \pm 2,1$  % соответственно,  $p_{4-22} = 0,05$ ). По сравнению с 8-месячным возрастом этот показатель статистически не различался ( $p_{8-22} = 0,2$ ). Вместе с тем значение этого показателя оказалось выше в сравнении с аналогичным периодом онтогенеза (22 мес) у мышей контрольной группы ( $p_{1-2} = 0,01$ ).

Результаты воздействия СМФА на экспрессию CD11b-антигена клетками крови мышей СВА в онтогенезе представлены в табл. 2. Согласно этим данным у мышей контрольной группы количество лимфоцитов крови, экспрессирующих CD11b-антиген, в возрасте 8 мес ( $12,1 \pm 1,7$  %) достоверно не отличалось

от такового у 4-месячных животных ( $13,4 \pm 1,7$  %;  $p_{4-8} = 0,6$ ). В возрасте 22 мес этот показатель статистически достоверно снизился до  $6,8 \pm 1,1$  % ( $p_{8-22} = 0,02$ ;  $p_{4-22} = 0,004$ ). У мышей опытной группы уровни экспрессии CD11b-антигена в возрасте 4 и 8 мес не различались ( $17,2 \pm 1,5$  % и  $15,6 \pm 1,4$  %;  $p_{4-8} = 0,5$ ), но имели тенденцию к повышению по сравнению с контрольными животными в аналогичные периоды онтогенеза ( $p_{1-2} = 0,1$ ). К 22-месячному возрасту уровень экспрессии снизился до  $12,1 \pm 1,1$  % ( $p_{8-22} = 0,06$ ;  $p_{4-22} = 0,01$ ). Вместе с тем в позднем онтогенезе в данной группе уровень экспрессии CD11b-антигена достоверно превышал значение у мышей контрольной группы в этом возрасте ( $p_{1-2} = 0,003$ ).

Таким образом, полученные результаты показали, что при профилактическом воздействии СМФА у опытных мышей число лимфоцитов, экспрессирующих молекулы LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18), повышено по сравнению с контрольными животными.

Учитывая, что лигандами LFA-1 являются молекулы межклеточной адгезии ICAM-1, ICAM-2, можно полагать, что увеличение количества лимфоцитов, экспрессирующих лейкоцитарный интегрин CD11a, под воздействием СМФА способствует более высокой иммунореактивности таких животных в осуществлении киллинга клеток-мишеней эффекторами иммунитета (NK-клетками, цитотоксическими лимфоцитами) [18, 19].

Вместе с тем молекула Mac-1 экспрессируется на нейтрофилах, лимфоцитах и NK-клетках, являясь

**Таблица 1.** Уровень экспрессии CD11a-антигена лимфоцитами крови у мышей СВА при воздействии сухого экстракта мультифитоадаптогена в 1-й месяц постнатального развития

**Table 1.** The CD11a antigen expression by blood lymphocytes in CBA mice under multiphytoadaptogen dry extract administration during the first month of postnatal development

Группа животных Animal group	CD 11a + лимфоциты, % CD 11a + lymphocytes, %			
	4 мес 4 months	8 мес 8 months	22 мес 22 months	p
1-я Контроль (интактные), n = 33 1 Control (intact), n = 33	49,4 $\pm$ 3,6 n = 11	45,9 $\pm$ 3,4 n = 10	36,5 $\pm$ 1,9 n = 11	$p_{4-8} = 0,5$ $p_{8-22} = 0,03$ $p_{4-22} = 0,005$
2-я Опыт (воздействие СМФА), n = 36 2 Experiment (MDE exposure), n = 362	52,3 $\pm$ 3,0 n = 12	49,0 $\pm$ 2,9 n = 12	44,6 $\pm$ 2,1 n = 12	$p_{4-8} = 0,4$ $p_{8-22} = 0,2$ $p_{4-22} = 0,05$
p	$p_{1-2} = 0,5$	$p_{1-2} = 0,5$	$p_{1-2} = 0,01$	

**Примечание.** Здесь и в табл. 1, 2: СМФА – сухой экстракт мультифитоадаптогена; n – количество животных;  $p_{1-2}$  – различие показателей между группами;  $p_{4-8}$  – различие показателей на 4-м и 8-м месяце;  $p_{8-22}$  – различие показателей на 8-м и 22-м месяце;  $p_{4-22}$  – различие показателей на 4-м и 22-м месяце.

**Note.** Here and in the table 1, 2: MDE – multiphytoadaptogen dry extract; n – animals number;  $p_{1-2}$  – intergroup difference;  $p_{4-8}$  – 4–8 months difference;  $p_{8-22}$  – 8–22 months difference;  $p_{4-22}$  – 4–22 months difference.

**Таблица 2.** Уровень экспрессии CD11b-антигена лимфоцитами крови у мышей СВА при воздействии сухого экстракта мультифитоадаптогена в 1-й месяц постнатального развития

Table 2. The CD11b antigen expression by blood lymphocytes in CBA mice under multiphytoadaptogen dry extract administration during the first month of postnatal development

Группа животных Animal group	CD 11b + лимфоциты, % CD 11b + lymphocytes, %			
	4 мес 4 months	8 мес 8 months	22 мес 22 months	p
1-я Контроль (интактные), n = 36 1 Control (intact), n = 36	13,4 ± 1,7 n = 12	12,1 ± 1,7 n = 12	6,8 ± 1,1 n = 12	$p_{4-8} = 0,6$ $p_{8-22} = 0,02$ $p_{4-22} = 0,004$
2-я Опыт (воздействие СМФА), n = 36 2 Experiment (MDE exposure), n = 36	17,2 ± 1,5 n = 12	15,6 ± 1,4 n = 12	12,1 ± 1,1 n = 12	$p_{4-8} = 0,5$ $p_{8-22} = 0,06$ $p_{4-22} = 0,01$
p	$p_{1-2} = 0,1$	$p_{1-2} = 0,1$	$p_{1-2} = 0,003$	

лигандом ICAM-1. Поэтому аналогичные выводы уместны и в отношении повышенного уровня экспрессии CD11b-антигена у мышей опытной группы по сравнению с контрольными животными. В данном случае также возможна активация способности иммунных эффекторов инфильтрировать опухоль, контактировать с клетками-мишенями, что помогает гибели последних [20].

На основании предшествующих и настоящих исследований можно полагать, что у мышей при спонтанном гепатоканцерогенезе сниженная активность Т-лимфоцитов обусловлена недостатком экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 на эффекторах иммунитета. Фитоадаптогены, обладающие адгезиогенным действием, способны нормализовать обозначенные показатели.

Таким образом, при введении СМФА в течение 1-го месяца постнатального онтогенеза высокогепато-

номным мышам, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени (5–15-й день постнатального развития), можно обеспечить длительный по времени эффект повышения экспрессии на клетках крови молекул лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1.

Вместе с тем эффективность профилактического воздействия СМФА на уровень экспрессии лейкоцитарных интегринов сравнима с таковой для жидкой формы фитоадаптогена, выявленной в предыдущем исследовании [6].

### Выводы

Улучшение продукции  $\beta_2$ -интегринов LFA-1 и Mac-1 на клетках крови мышей, генетически предрасположенных к раку печени, при введении сухого экстракта препарата в 1-й месяц постнатального развития способствует адгезии эффекторов иммунитета с клетками опухолей.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Schttenhelm L., Hilkens C.M., Morrison V.L.  $\beta_2$  Integrins as regulators of dendritic cell, monocyte, and macrophage function. *Front Immunol* 2017;20(8):1866–77. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01866.
- Бочарова О.А. Адгезионная концепция в биологии злокачественного роста. Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2014;58(2):87–93. DOI: 10.25557/0031-2991.2014.02.87–93. [Bocharova O.A. Adhesive concept in biology of malignant growth. *Patologicheskaya fiziologiya i ehksperimentalnaya terapiya = Pathological Physiology and Experimental Therapy* 2014;58(2):87–93. (In Russ.)].
- Takeichi T., Mocevicius P., Deduchovas O. et al.  $\alpha_1\beta_2$  integrin is indispensable for CD8<sup>+</sup> T-cell recruitment in experimental pancreatic and hepatocellular cancer. *Int J Cancer* 2012;130(9):2067–76. DOI: 10.1002/ijc.26223.
- Бочарова О.А. Профилактическая онкология и фитоадаптогены. Вестник РАМН 2009;7:41–5. [Bocharova O.A. Preventive oncology and phytoadaptogens. *Vestnik RAMN = Bull RAMS* 2009;7:41–5. (In Russ.)].
- Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G. *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J.Wen: an overview of pharmacological studies. *Phytomedicine* 2016;23(12):1409–21. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.07.011.
- Бочарова О.А., Карпова П.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрины при гепатоканцерогенезе мышей высокорасовой линии СВА.

- Российский биотерапевтический журнал 2013;12(3):53–6. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Ilyenko V.A. et al. Leukocyte integrins at hepato carcinogenesis in high-cancer CBA strain of mice. Rossijskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(3):53–6. (In Russ.)].
7. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитoadаптогена у высококоракowych мышей СВА. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(2):73–6. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Reduced occurrence of hepatomas in phytoadaptogen exposed high-cancer CBA strain of mice. Rossijskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(2):73–6. (In Russ.)].
  8. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Вершинская А.А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высококораковой линии СВА при воздействии мультифитoadаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):85–90. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Verzhinskaya A.A. et al. Hepatocarcinomas infiltration lymphocytes in high-cancer CBA mice when multiphytoadaptogen exposed in early postnatal ontogenesis. Rossijskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):85–90. (In Russ.)].
  9. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Воздействие мультифитoadаптогена в раннем постнатальном онтогенезе, улучшающее выживаемость и соматическое состояние мышей высококораковой линии. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(1):76–81. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogen effect in early postnatal ontogenesis improves survival and mice somatic condition of high-cancer CBA strain of mice. Rossijskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(1):76–81. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-76-81.
  10. Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линейных мышей. Экспериментальная онкология 1983;5(3):39–42. [Modyanova E.A., Bocharova O.A., Malenkov A.G. The kontaktins-chalones preventive action on spontaneous carcinogenesis in mice inbred strains. Eksperimentalnaya onkologiya = Experimental oncology 1983;5(3):39–42. (In Russ.)].
  11. Бочарова О.А., Барышников А.Ю. Фитoadаптогены в онкологии. Зоо-МедВет 2004. 138 с. [Bocharova O.A., Baryshnikov A.Y. Phytoadaptogens in oncology. ZooMedVet 2004. 138 p. (In Russ.)].
  12. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П. и др. Аналитические возможности метода ЯМР для определения компонентов препарата Фитомикс-40. Заводская лаборатория. Диагностика материалов 2006;72(8):15–23. [Shejchenko V.I., Bocharova O.A., Schejchenko O.P. et al. Analytical opportunities of NMR method for determination of Fitomix-40 preparation composition. Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov = Factory laboratory. Material diagnostics 2006;72(8):15–23. (In Russ.)].
  13. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитoadаптогена методом ВЭЖХ. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2012;10:52–9. [Shejchenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Study of complex phytoadaptogen by HPLC method. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoj i farmatsevticheskoy khimii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2012;10:52–9. (In Russ.)].
  14. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л. и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции неспецифическим иммуномодулятором. Иммунология 2004;25(1):36–43. [Bocharova O.A., Pozharitskaya M.M. Adhesive impairments in the pathogenesis of leukoplakia and potentialities of their correction by immunomodulator. Immunologiya = Immunology 2004;25(1):36–43. (In Russ.)].
  15. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. и др. Влияние комплексного фитoadаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006;141(5):495–8. [Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N. et al. The effect of complex phytoadaptogen on MPTP-induced Parkinson's syndrome in mice Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2006;141(5):495–8. (In Russ.)].
  16. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А. и др. Перспективы применения фитoadаптогена в лечении распространенного рака желудка. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2009;148(7):96–9. [Bocharova O.A., Davydov M.I., Klimentov A.A. et al. Prospects of using phytoadaptogen in the treatment of diffuse stomach cancer. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2009;148(7):96–9. (In Russ.)].
  17. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитoadаптогена в клетках дрожжей-сахаромисетов. Генетика 2013;49(12):1364–9. DOI: 10.7868/S0016675813120059. [Kurenная O.N., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Antimutagenesis of multiphytoadaptogene in yeast saccharomyces. Genetika = Russian Journal of Genetics 2013;49(12):1364–9. (In Russ.)].
  18. Li N., Yang H., Wang M. et al. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. Mol Biol Cell 2018;29(4):408–18. DOI: 10.1091/mbc.E16-12-0827.
  19. Sharma A., Lawry S.M., Klein B.S. et al. LFA-1 Ligation by high-density ICAM-1 is sufficient to activate IFN- $\gamma$  release by innate T-lymphocytes. J Immunol 2018;201(8):2452–61. DOI: 10.4049/jimmunol.1800537.
  20. Sasada T., Suekane S. Variation of tumor-infiltrating lymphocytes in human cancers: controversy on clinical significance. Immunotherapy 2011;3(10):1235–51. DOI: 10.2217/imt.11.106.

**ORCID авторов/ ORCID of authors**

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

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

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

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

**Вклад авторов**

О.А. Бочарова: разработка дизайна исследования, планирование работы, анализ рукописи;

Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров: получение и анализ данных, написание текста рукописи;

А.А. Вершинская: получение и анализ данных;

М.А. Барышникова, Ю.Н. Соловьев: анализ рукописи;

И.В. Казеев: получение и анализ данных;

В.Г. Кучеряну: обзор публикаций по теме исследования.

**Authors' contributions**

O.A. Bocharova: developing the research design, study planning, manuscript analysis;

R.V. Karpova, E.V. Bocharov: data collection and analysis, writing the manuscript;

A.A. Verzhinskaya: data collection and analysis;

M.A. Baryshnikova, Y.N. Soloviev: manuscript analysis;

I.V. Kazeev: data collection and analysis;

V.G. Kucheryanu: reviewing of publications of the article's theme.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено без спонсорской поддержки.

**Financing.** The study was performed without external funding.

**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: 01.10.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 01.10.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.

# ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ПРЕПАРАТА БАКТЕРИОСЕНС ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Н.Б. Морозова<sup>1</sup>, Е.А. Плотникова<sup>1</sup>, А.Д. Плютинская<sup>1</sup>, В.О. Страмова<sup>1</sup>, М.С. Воронцова<sup>1</sup>,  
А.А. Панкратов<sup>1</sup>, Е.А. Макарова<sup>2</sup>, Е.А. Лукьянец<sup>2</sup>, А.Д. Каприн<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва,  
2-й Боткинский проезд, 3;

<sup>2</sup>ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»; Россия, 123001 Москва, ул. Большая Садовая, 1, корп. 4

**Контакты:** Наталья Борисовна Морозова n.b.morozova@yandex.ru

**Введение.** На протяжении последних лет особое внимание уделяется фотосенсибилизаторам, поглощающим и флуоресцирующим в ближней инфракрасной области спектра. Одним из наиболее перспективных фотосенсибилизаторов является синтетическое производное бактериохлорина – препарат бактериосенс.

**Цель исследования** – доклиническое изучение биораспределения и фармакокинетики препарата бактериосенс у животных.

**Материалы и методы.** Активный компонент препарата бактериосенс – (мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин) с  $\lambda_{max} = 747$  нм. Биораспределение и фармакокинетику препарата изучали на мышах и кроликах. Препарат вводили однократно внутривенно в 3 дозах: для мышей – 1,0; 2,5 и 6,25 мг/кг, для кроликов – 0,236; 0,59 и 1,475 мг/кг. Для количественного определения фармакокинетических параметров бактериосенса использовали метод локальной флуоресцентной спектроскопии.

**Результаты.** Из кровотока мыши бактериосенс выводится быстро: через 1 сут при использовании минимальной дозы 1,0 мг/кг и через 4 сут при максимальной дозе 6,25 мг/кг. В коже, мышце и селезенке препарат сохраняется до 4 сут при 6,25 мг/кг и до 24 ч при 1,0 мг/кг. Наиболее интенсивно накапливается и длительно удерживается препарат в сальнике, печени и почках – свыше 6 сут при дозе 6,25 мг/кг и 2 сут при 1,0 мг/кг.

Аналогичная картина наблюдается у кроликов. Бактериосенс быстро выводится из кровотока: через 1 сут при применении в дозе 0,236 мг/кг и через 3 сут при 1,475 мг/кг. В коже, мышце и селезенке препарат регистрируется до 4 сут при использовании дозы 1,475 мг/кг и до 3 сут при 0,236 мг/кг. Наиболее интенсивно накапливается и длительно удерживается бактериосенс в сальнике, печени и почках: более 6 сут при использовании дозы 1,475 мг/кг и 4 сут при дозе 0,236 мг/кг.

**Выводы.** Бактериосенс в течение 3–4 сут выводится из кровотока животных при использовании максимальной дозы, в 2,5 раза превышающей терапевтическую. Продолжительность периода полувыведения бактериосенса для мышей прямо пропорционально зависит от дозы и увеличивается от 8 до 24 мин; для кроликов период полувыведения независимо от дозы составил 20 мин. В коже препарат регистрируется не более 4 сут. Основные пути элиминирования бактериосенса из организма животных проходят через почки и печень.

**Ключевые слова:** бактериосенс, фармакокинетика, биораспределение, нормированная флуоресценция, сыворотка крови

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-59-70



## PRECLINICAL STUDY OF THE PHARMACOKINETICS OF BACTERIOSENS FOR THE PHOTODYNAMIC THERAPY OF MALIGNANT NEOPLASMS

N.B. Morozova<sup>1</sup>, E.A. Plotnikova<sup>1</sup>, A.D. Plyutinskaya<sup>1</sup>, V.O. Stramova<sup>1</sup>, M.S. Vorontsova<sup>1</sup>, A.A. Pankratov<sup>1</sup>,  
E.A. Makarova<sup>2</sup>, E.A. Lukyanets<sup>2</sup>, A.D. Kaprin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Center of Radiology;  
3, 2<sup>nd</sup> Botkinskiy proezd, Moscow 125284, Russia;

<sup>2</sup>SSC “NIOPIK”; Build. 4, 1 Bolshaya Sadovaya St., Moscow, 123001 Russia

**Introduction.** Special attention has been recently paid to photosensitizers that absorb and fluoresce in the near infrared region of the spectrum. One of the most promising photosensitizers is bacteriosens, a synthetic bacteriochlorin derivative.

**Objective.** To conduct a preclinical study of the biodistribution and pharmacokinetics of bacteriosens in animals.

**Materials and methods.** The active ingredient of bacteriosens is (meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin) with of  $\lambda_{max}$  747 nm). The bio-distribution and pharmacokinetics of the agent were studied in mice and rabbits. It was administered intravenously once at three doses: 1.0; 2.5 and 6.25 mg/kg for the mice and 0.236; 0.59 and 1.475 mg/kg for the rabbits. Local fluorescence spectroscopy was used for the quantitative determination of the pharmacokinetic parameters of bacteriosens.

**Results.** Bacteriosens was removed quickly from the mouse bloodstream at 1 and 4 days after using minimal (1.0 mg/kg) and maximal (6.25 mg/kg) doses, respectively. When given at doses of 6.25 mg/kg and 1.0 mg/kg, bacteriosens was recorded in the skin, muscle, and

spleen for 4 days and 24 h, respectively. The agent most intensively accumulated and long persisted in the omentum, liver, and kidneys for more than 6 days (6.25 mg/kg) and 2 days (1.0 mg/kg). A similar pattern was observed in the rabbits. Bacteriosens was rapidly removed from the rabbit bloodstream at 1 and 3 days after using at doses of 0.236 and 1.475 mg/kg, respectively. The agent was recorded in the skin, muscle, and spleen up to 4 days (1.475 mg/kg) and 3 days (0.236 mg/kg). It most intensively accumulated and long persisted in the omentum, liver, and kidneys for more than 6 days (1.475 mg/kg) and 4 days (0.236 mg/kg).

**Conclusion.** Bacteriosens was removed from the animal bloodstream within 3–4 days after administration of the maximum dose that was 2.5 times higher than therapeutic one. The half-life of bacteriosens for mice was directly proportional to the dose and increased from 8 to 24 min; the half-life for rabbits was 20 min, irrespective of the dose. The drug was recorded in the skin for no more than 4 days. The main routes of bacteriosens elimination from the body of animals were the kidneys and liver.

**Key words:** bacteriosens, pharmacokinetics, biodistribution, normalized fluorescence, serum

## Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ), являясь одним из эффективных методов в лечении злокачественных новообразований практически всех основных локализаций, используется как самостоятельно, так и в сочетании с традиционными видами противоопухолевой терапии (хирургический, лучевая и химиотерапия) [1, 2].

На протяжении последних лет особое внимание уделяется фотосенсибилизаторам (ФС), поглощающим и флуоресцирующим в ближней инфракрасной (ИК) области спектра, что позволяет свету проникать глубже в пораженную ткань и активировать накопившийся в ней ФС, открывая при этом возможность лечения объемных и глубокозалегающих опухолей. Наибольшую глубину проникновения света могут обеспечить ФС с длиной волны спектрального максимума в ближнем ИК-диапазоне (700–850 нм), где собственное поглощение несенсибилизированной ткани минимально [2–5].

В настоящее время один из наиболее перспективных классов ФС составляют синтетические производные бактериохлорина. В ГНЦ «НИОПИК» совместно с НМИЦ радиологии на основе стандартной субстанции разработан препарат бактериосенс, который предназначен для ФДТ злокачественных новообразований различных локализаций (рис. 1).

Препарат обладает высокой фотоиндуцированной активностью в отношении опухолевых клеток человека эпителиального происхождения и мышцы различного генеза (величина ИК<sub>50</sub> составляет 0,08–1,21 мкМ в зависимости от клеточной линии и обеспечивает высокую дозозависимую противоопухолевую эффективность у животных с опухолями различного генеза [6]. Использование оптимальных режимов проведения ФДТ позволяет добиться 100 % излечения мышей с опухолями малого размера, 100 % торможения роста опухолей и 38–100 % излечения мышей с опухолями большого размера [6].

**Цель исследования** — доклиническое изучение биораспределения и фармакокинетики препарата бактериосенс у животных.

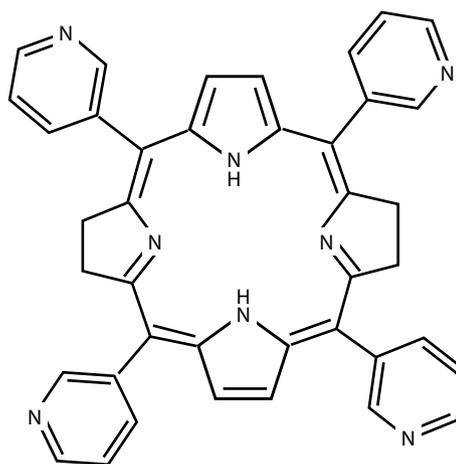


Рис. 1. Структурная формула мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, активного компонента препарата бактериосенс

Fig. 1. Structural formula of meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin, the active ingredient of bacteriosens

## Материалы и методы

**Фотосенсибилизатор.** Препарат бактериосенс — лиофилизат для приготовления раствора для инфузий производства ГНЦ «НИОПИК» (Россия). Активный компонент — мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин с  $\lambda_{\max} = 747$  нм; вспомогательные компоненты: kolliphor® ELP, D(–) — маннит, лимонная кислота [7]. В качестве растворителя использовали 0,025 % раствор гидрокарбоната натрия (NaHCO<sub>3</sub>). Для проведения исследований раствор препарата готовили *ex tempore*.

**Животные.** Для оценки биораспределения и фармакокинетики использовали интактных животных: мышей-гибридов (СВА × С57В1/6) F1, самок в возрасте 9–10 нед, и кроликов породы советская шиншилла, самцов в возрасте 20–24 нед. Мышей получали из питомника Научного центра биомедицинских технологий РАМН (филиал «Андреевка»), кроликов — из «Кролинфо».

Животные находились на стандартной сбалансированной диете с использованием экструдированного комбикорма для содержания мелких лабораторных

грызунов (мышей и кроликов) SPF-статуса «ЧАРА» компании «Ассортимент-Агро» и водопроводной воды, фильтрованной путем системы обратного осмоса Osmos Stream Compact OD 200. Исследования были одобрены комиссией по биоэтике и проведены с соблюдением принципов гуманности в соответствии с национальными стандартами.

#### Оценка биораспределения и фармакокинетики препарата у интактных животных

Биораспределение и фармакокинетику бактериосенса изучали на 2 видах животных – мышах и кроликах. Препарат вводили однократно внутривенно в 3 дозах. При выборе доз бактериосенса исходили из терапевтической дозы (ТД) для мышей (2,5 мг/кг) и расчетной эквитерапевтической дозы (ЭТД) для кроликов (0,59 мг/кг). Межвидовой перенос доз лекарственных средств осуществляли по методам Е.Ж. Freireich и И.П. Улановой [8, 9]. Эти дозы для мышей составили 1,0 мг/кг (0,4 ТД), 2,5 мг/кг (1 ТД) и 6,25 мг/кг (2,5 ТД), для кроликов – 0,236 мг/кг (0,4 ЭТД<sub>кролик</sub>), 0,59 мг/кг (ЭТД<sub>кролик</sub>) и 1,475 мг/кг (2,5 ЭТД<sub>кролик</sub>). Контрольным животным вводили растворитель – 0,025 % раствор NaHCO<sub>3</sub>.

Для количественного определения фармакокинетических параметров бактериосенса использовали метод локальной флуоресцентной спектроскопии. На лазерной установке для флуоресцентной диагностики и контроля ФДТ «ЛЭСА-6» («БиоСпек», Россия) оценивали уровень нормированной флуоресценции (НФ), отражающей накопление фотоактивной формы ФС в крови, органах и тканях животных.

Через различные интервалы времени после введения ФС (5 с, 15, 30 мин, 1, 3, 5, 14, 24, 48, 72 ч, 6 сут) животных подвергали эвтаназии путем передозировки эфира для наркоза (мышь) и внутривенного введения 10 % раствора тиопентала натрия в дозе 150–200 мг/кг (кролики). Затем производили забор крови у животных, из тел извлекали образцы внутренних органов и тканей (печень, почки, селезенку, кожу (бедрá и уха), мышцу, сальник и глаза) для измерения в них флуоресценции. Из крови готовили сыворотку с помощью центрифугирования в течение 6 мин при 6000 об/мин (центрифуга MiniSpin plus Eppendorf AG, Германия). Измерение экзогенной флуоресценции тканей проводили *ex vivo* сразу после эвтаназии животного. Для каждой точки использовали биологический материал от 5 мышей и 3 кроликов и проводили не менее 3 измерений в каждом органе, ткани или сыворотке крови. НФ ФС в тканях животного оценивали при длине волны, соответствующей максимуму его флуоресценции (747 ± 2 нм).

Математическую обработку спектров флуоресценции проводили с помощью программного обеспечения «ЛЭСА-06». При возбуждении флуо-

ресценции в красной области спектра (632,8 нм) интегральную интенсивность флуоресценции в диапазоне 640–850 нм (S<sub>1</sub>) нормировали на интегральную интенсивность сигнала обратного диффузного рассеяния возбуждающего лазерного излучения (S<sub>2</sub>) и определяли НФ препарата в сыворотке крови, органах и тканях животных (НФ = S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>) [10, 11]. В ходе анализа фармакокинетических данных оценивали общий клиренс препарата (Cl<sub>t</sub>), отражающий объем тест-ткани, освобождающийся от лекарственного средства в единицу времени (мл/мин); стационарный объем распределения препарата, отражающий интенсивность распределения фармакологического средства между тест-тканью и другими тканями (мл); продолжительность периода полувыведения (T<sub>1/2</sub>) – времени (мин), в течение которого концентрация лекарственного средства снижается в сыворотке крови в 2 раза [12].

Для всех количественных данных вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартную ошибку среднего (m). Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica for Windows ver. 7.0 (StatSoft, Inc.). Достоверность различий между группами данных оценивали с применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни. Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

#### Результаты и обсуждение

##### Изучение биораспределения и фармакокинетики препарата бактериосенс в органах и тканях интактных мышей

Анализ полученных данных показал, что максимальная флуоресценция препарата определялась в сыворотке крови интактных мышей сразу после его введения и в течение суток снижалась на 92 % для дозы 6,25 мг/кг, на 99 % – для дозы 2,5 мг/кг, а для дозы 1,0 мг/кг через 24 ч не регистрировалась (табл. 1).

Наиболее интенсивно накапливался и дольше удерживался бактериосенс во внутренних органах и сальнике, которые являются органами-мишенями. В печени НФ препарата увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне в течение 5 ч, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в печени НФ снижалась на 78 % (6,25 мг/кг), 91 % (2,5 мг/кг) и 100 % (1,0 мг/кг) от максимального значения.

Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в печени более 6 сут (6,25 мг/кг), до 4 сут (2,5 мг/кг) и 1 сут (1,0 мг/кг).

В почках НФ бактериосенса увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне 5 ч, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в почках НФ снижалась на 75 % (6,25 мг/кг), 88 % (2,5 мг/кг) и 91 % (1,0 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась

**Таблица 1.** Распределение препарата бактериоцены в сыворотке крови, органах и тканях интактных мышей в интервале от 5 с до 6 сут  
**Table 1.** The distribution of the drug bacteriocens in blood serum, organs and tissues of intact mice in the interval from 5 sec to 6 days

Органы и ткани Organs and tissues	Нормированная флуоресценция, усл. ед. Normalized fluorescence, a.u.												Фон* Background*
	5 с 5 sec	15 мин 15 min	30 мин 30 min	1 ч 1 hour	3 ч 3 hour	5 ч 5 hour	14 ч 14 hour	24 ч 24 hour	48 ч 48 hour	72 ч 72 hour	6 сут 6 days		
<b>Препарат в дозе 1,0 мг/кг</b> The drug at 1 mg/kg													
Сыворотка крови Blood serum	77,8 ± 0,6	22,4 ± 1,3	17,2 ± 0,2	15,8 ± 0,3	14,8 ± 1,0	10,1 ± 0,4	7,5 ± 0,6	5,4 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,1	5,4 ± 0,5	
Печень Liver	9,2 ± 0,4	21,0 ± 1,7	21,6 ± 0,1	20,2 ± 0,7	14,2 ± 0,7	13,2 ± 0,1	9,1 ± 0,7	8,3 ± 0,4	8,2 ± 0,3	8,3 ± 0,2	8,5 ± 0,2	8,5 ± 0,3	
Почки Kidneys	10,9 ± 0,4	12,7 ± 0,4	12,1 ± 0,3	12,6 ± 0,1	12,5 ± 0,5	11,1 ± 0,1	8,5 ± 0,6	6,3 ± 0,2	5,7 ± 0,2	5,5 ± 0,1	5,7 ± 0,2	5,7 ± 0,2	
Селезенка Spleen	8,4 ± 0,3	12,5 ± 1,0	11,8 ± 0,1	10,3 ± 0,2	9,9 ± 0,3	8,6 ± 0,1	8,1 ± 0,3	8,2 ± 0,5	8,1 ± 0,4	8,0 ± 0,2	8,1 ± 0,2	8,1 ± 0,8	
Сальник Gland	3,8 ± 0,3	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,3	5,1 ± 0,2	8,0 ± 0,2	7,5 ± 1,1	5,7 ± 0,1	3,7 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,1	3,4 ± 0,2	
Мышца Muscle	3,9 ± 0,2	5,3 ± 0,3	5,2 ± 0,4	5,2 ± 0,4	5,0 ± 0,3	4,7 ± 0,5	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2	
Кожа бедра Thigh skin	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,5 ± 0,1	
Кожа уха Ear skin	2,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,5	2,4 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,2	
Глаза Eyes	6,9 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,3	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,3	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1	
<b>Препарат в дозе 2,5 мг/кг</b> The drug at 2,5 mg/kg													
Сыворотка крови Blood serum	89,3 ± 1,0	37,0 ± 3,7	27,9 ± 3,6	20,6 ± 2,0	18,6 ± 1,4	17,7 ± 1,8	9,1 ± 0,4	5,9 ± 0,2	3,2 ± 0,1	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,6	
Печень Liver	10,4 ± 1,0	38,5 ± 1,4	36,3 ± 2,5	35,0 ± 0,4	31,4 ± 1,9	31,7 ± 0,6	11,6 ± 0,5	10,9 ± 0,3	8,9 ± 0,1	8,6 ± 0,4	8,4 ± 0,2	8,3 ± 0,3	
Почки Kidneys	11,6 ± 0,9	15,4 ± 0,7	14,6 ± 0,2	14,0 ± 0,7	14,1 ± 1,0	13,6 ± 0,7	8,9 ± 0,7	7,5 ± 0,8	6,2 ± 0,3	6,2 ± 0,1	6,3 ± 0,2	6,4 ± 0,3	
Селезенка Spleen	8,9 ± 1,0	13,1 ± 0,9	12,6 ± 0,1	11,5 ± 0,4	11,0 ± 0,5	10,1 ± 0,9	10,1 ± 0,6	8,6 ± 0,4	7,6 ± 0,1	7,9 ± 0,2	7,6 ± 0,2	7,9 ± 0,3	
Сальник Gland	4,0 ± 0,4	4,4 ± 0,4	5,5 ± 0,2	5,6 ± 0,3	8,4 ± 0,6	9,7 ± 0,9	8,6 ± 0,3	5,7 ± 0,7	5,6 ± 0,2	4,6 ± 0,7	4,6 ± 0,2	3,5 ± 0,3	
Мышца Muscle	4,6 ± 0,2	6,9 ± 0,7	6,5 ± 0,3	6,0 ± 0,4	5,5 ± 0,3	5,3 ± 0,5	3,3 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	

Окончание табл. 1  
End of table 1

Органы и ткани Organs and tissues	Нормированная флуоресценция, усл. ед. Normalized fluorescence, a.u.											Фон* Background*
	5 с 5 sec	15 мин 15 min	30 мин 30 min	1 ч 1 hour	3 ч 3 hour	5 ч 5 hour	14 ч 14 hour	24 ч 24 hour	48 ч 48 hour	72 ч 72 hour	6 сут 6 days	
Кожа бедра Thigh skin	1,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,4 ± 0,5	2,6 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,9 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Кожа уха Ear skin	2,3 ± 0,3	2,6 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,7 ± 0,1	4,5 ± 0,4	4,5 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2
Глаза Eyes	6,8 ± 0,8	6,7 ± 0,7	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,9	6,9 ± 0,5	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,7	6,6 ± 0,1	6,7 ± 0,4	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,2
<b>Препарат в дозе 6,25 мг/кг</b> The drug at 6,25 mg/kg												
Сыворотка крови Blood serum	97,7 ± 3,7	61,3 ± 4,0	44,5 ± 6,1	36,5 ± 4,5	32,5 ± 3,9	28,4 ± 1,1	19,7 ± 2,3	12,4 ± 1,0	10,2 ± 0,2	7,5 ± 1,7	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,7
Печень Liver	27,0 ± 1,8	42,5 ± 5,4	42,6 ± 1,5	49,3 ± 0,9	47,4 ± 0,3	43,4 ± 1,4	17,8 ± 0,9	17,4 ± 0,7	14,1 ± 0,3	10,8 ± 1,2	9,3 ± 0,4	8,2 ± 0,5
Почки Kidneys	20,3 ± 0,6	22,5 ± 2,3	22,8 ± 1,5	25,3 ± 1,6	30,2 ± 0,4	26,1 ± 0,4	15,1 ± 0,8	12,2 ± 0,1	9,6 ± 0,2	7,2 ± 0,3	6,6 ± 0,1	6,3 ± 0,3
Селезенка Spleen	12,1 ± 0,3	17,6 ± 1,4	17,3 ± 1,1	16,6 ± 1,2	16,7 ± 0,3	15,3 ± 0,5	12,2 ± 0,3	10,4 ± 0,5	9,9 ± 0,2	9,5 ± 0,2	7,8 ± 0,6	7,9 ± 0,5
Сальник Gland	4,5 ± 0,4	6,2 ± 0,8	9,6 ± 1,4	13,9 ± 1,8	27,3 ± 1,1	28,3 ± 0,8	25,2 ± 0,9	25,1 ± 1,7	22,8 ± 0,4	20,4 ± 2,6	10,3 ± 0,8	3,6 ± 0,2
Мышца Muscle	7,0 ± 0,4	8,7 ± 0,2	9,2 ± 1,6	10,4 ± 0,7	14,7 ± 0,2	13,0 ± 0,5	4,0 ± 0,4	3,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Кожа бедра Thigh skin	1,9 ± 0,1	2,3 ± 0,1	3,9 ± 1,2	4,3 ± 0,5	4,0 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,2	2,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,3
Кожа уха Ear skin	2,6 ± 0,1	3,2 ± 0,2	4,9 ± 0,5	5,2 ± 0,2	4,9 ± 0,2	3,8 ± 0,3	3,3 ± 0,2	3,1 ± 0,2	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1
Глаза Eyes	6,8 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1	6,8 ± 0,1	6,8 ± 0,4	6,7 ± 0,4	6,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2	6,7 ± 0,1	6,6 ± 0,3	6,7 ± 0,1	6,7 ± 0,6

**Примечание.** Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne-лазера ( $\lambda_{max} = 632,8$  нм), измерения проводили в диапазоне длин волн 650–850 нм. Полуэирным шрифтом выделены значения нормированной флуоресценции, достоверно превышающие уровень фона ( $p < 0,05$ ); курсивом — недостоверно превышающие уровень фона ( $p \geq 0,05$ ), обычный шрифт соответствует значениям нормированной флуоресценции на уровне фона; \*нормированная флуоресценция у мышей, которым вводили растворитель (0,025 % раствор  $\text{NaHCO}_3$ ).

**Note.** Fluorescence, excited by a He-Ne laser ( $\lambda_{max} = 632.8$  nm); measurements were carried out at 650–850 nm; measurements exceeding the background level ( $p < 0.05$ ) are in bold; values insignificantly exceeding the background level ( $p \geq 0.05$ ) are in italics, regular font corresponds to normalized fluorescence values at the background level; \*normalized fluorescence in mice injected with a solvent (0.025 %  $\text{NaHCO}_3$  solution).

в почках до 6 сут (6,25 мг/кг) и до 2 сут (2,5 мг/кг и 1,0 мг/кг).

В селезенке НФ препарата увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне 0,5–3 ч в зависимости от дозы, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в селезенке НФ снижалась на 74 % (6,25 мг/кг), 87 % (2,5 мг/кг) и 100 % (1,0 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в селезенке до 4 сут (6,25 мг/кг), до 2 сут (2,5 мг/кг) и 14 ч (1,0 мг/кг).

В сальнике НФ бактериосенса увеличивалась медленнее, в течение 3 ч, удерживалась на достигнутом уровне 5–24 ч, в зависимости от дозы ФС, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в сальнике НФ снижалась на 13 % (6,25 мг/кг), 65 % (2,5 мг/кг) и 93 % (1,0 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в сальнике более 6 сут (6,25 мг/кг и 2,5 мг/кг) и до 2 сут (1,0 мг/кг).

Незначительное количество бактериосенса аккумулировалось в коже и мышце. В течение 30 мин НФ препарата увеличивалась в коже бедра и уха, удерживалась на достигнутом уровне в течение 3–5 ч, в зависимости от дозы препарата, а затем быстро снижалась. Через 1 сут после введения препарата в коже бедра и уха НФ снижалась на 48 и 35 % (6,25 мг/кг), 60 и 55 % (2,5 мг/кг) и 100 % (1,0 мг/кг) от максимального значения соответственно. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в коже бедра и уха до 4 сут (6,25 мг/кг), до 3 сут (2,5 мг/кг) и 14 ч (1,0 мг/кг).

В мышце НФ препарата увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне 5 ч, а затем быстро снижалась. Через 1 сут после введения в мышце НФ снижалась на 98 % (6,25 мг/кг), 92 % (2,5 мг/кг) и 100 % (1,0 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в мышце до 3 сут (6,25 мг/кг), 2 сут (2,5 мг/кг) и 1 сут (1,0 мг/кг).

В глазах НФ препарата регистрировалась на уровне фоновых значений.

Таким образом, препарат бактериосенс быстро выводился из кровотока мыши: через 1 сут при использовании минимальной дозы (1,0 мг/кг) и через 4 сут применения максимальной дозы (6,25 мг/кг). В коже, мышце и селезенке бактериосенс накапливался быстро, но также быстро и выводился – максимальная доза (6,25 мг/кг) регистрировалась до 4 сут, минимальная доза (1,0 мг/кг) – не более 24 ч. Наиболее интенсивно накапливался и длительно удерживался препарат в сальнике, печени и почках: более 6 сут при использовании максимальной дозы (6,25 мг/кг) и 2 сут при минимальной дозе (1,0 мг/кг). Основные пути элиминирования препарата из организма мышей происходили через почки и печень.

### Изучение биораспределения и фармакокинетики препарата бактериосенс в органах и тканях интактных кроликов

Фармакокинетика бактериосенса у кроликов и мышей по характеру не отличалась. Анализ полученных данных показал, что максимальная флуоресценция препарата определялась в сыворотке крови интактных кроликов сразу после его введения и в течение суток снижалась на 91 % для доз 1,475 и 0,59 мг/кг, для дозы 0,236 мг/кг – на 98 % (табл. 2).

Распределение бактериосенса в организме кроликов происходило схожим образом. В органах-мишенях (печени, почках, селезенке, сальнике) выявлены наиболее интенсивное накопление и длительная аккумуляция. В печени НФ препарата увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне 3 ч, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в печени НФ снижалась на 67 % (1,475 мг/кг) и 77 % (0,59 и 0,236 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в печени более 6 сут (1,475 мг/кг), до 4 сут (0,59 мг/кг) и до 3 сут (0,236 мг/кг).

В почках НФ бактериосенса увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне 14 ч, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в почках НФ снижалась на 37 % (1,475 мг/кг), 28 % (0,59 мг/кг) и 34 % (0,236 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в почках более 6 сут (1,475 мг/кг) и до 4 сут (0,59 и 0,236 мг/кг).

В селезенке НФ препарата увеличивалась в течение 15 мин, удерживалась на достигнутом уровне 0,5–1 ч в зависимости от дозы, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в селезенке НФ снижалась на 98 % (1,475 мг/кг) и 100 % (0,59 и 0,236 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в селезенке до 1 сут (1,475 мг/кг), до 14 ч (0,59 мг/кг) и 3 ч (0,236 мг/кг).

В сальнике НФ бактериосенса увеличивалась медленнее, в течение 3 ч, удерживалась на достигнутом уровне 5–14 ч в зависимости от дозы ФС, а затем снижалась. Через 1 сут после введения в сальнике НФ снижалась на 47 % (1,475 мг/кг), 50 % (0,59 мг/кг) и 78 % (0,236 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в сальнике до 6 сут (1,475 мг/кг), до 4 сут (0,59 мг/кг) и до 3 сут (0,236 мг/кг).

В коже бедра, уха и мышце выявлены слабое накопление и быстрая элиминация бактериосенса. В течение 30 мин НФ препарата увеличивалась в коже бедра, удерживалась на достигнутом уровне на протяжении 1–14 ч в зависимости от дозы препарата, а затем быстро снижалась. Через 1 сут после введения препарата в коже бедра НФ снижалась на 26 % (1,475 мг/кг), 21 % (0,59 мг/кг) и 40 % (0,236 мг/кг)

**Таблица 2.** Распределение препарата бактериоцине в сыворотке крови, органах и тканях интактных кроликов в интервале от 5 с до 6 сут  
 Table 2. The distribution of the drug bacteriocins in blood serum, organs and tissues of intact rabbits in the interval from 5 sec. to 6 nights

Органы и ткани Organs and tissues	Нормированная флуоресценция, усл. ед. Normalized fluorescence, a.u.											Фон* Background*
	5 с 5 sec	15 мин 15 min	30 мин 30 min	1 ч 1 hour	3 ч 3 hour	5 ч 5 hour	14 ч 14 hour	24 ч 24 hour	48 ч 48 hour	72 ч 72 hour	6 сут 6 days	
<b>Препарат в дозе 0,236 мг/кг</b> The drug at 0,236 mg/kg												
Сыворотка крови Blood serum	24,1 ± 0,4	19,4 ± 0,4	14,3 ± 0,3	13,5 ± 0,4	12,7 ± 0,2	8,9 ± 0,3	7,4 ± 0,3	5,7 ± 0,1	5,5 ± 0,3	5,2 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1
Печень Liver	16,6 ± 0,5	21,7 ± 0,6	25,3 ± 0,3	22,3 ± 0,4	19,1 ± 0,5	16,6 ± 0,8	13,5 ± 0,3	10,3 ± 0,4	8,2 ± 0,2	6,1 ± 0,4	5,8 ± 0,5	5,9 ± 0,2
Почки Kidneys	8,3 ± 0,5	10,7 ± 0,4	10,9 ± 0,3	10,3 ± 0,3	9,2 ± 0,2	9,1 ± 0,1	9,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	7,5 ± 0,3	5,9 ± 0,3	5,2 ± 0,1	5,3 ± 0,1
Селезенка Spleen	9,5 ± 0,3	15,9 ± 0,6	14,2 ± 0,4	11,6 ± 0,4	9,1 ± 0,4	8,9 ± 0,4	9,1 ± 0,4	9,0 ± 0,4	8,8 ± 0,2	9,1 ± 0,6	8,7 ± 0,3	8,9 ± 0,4
Сальник Gland	2,0 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,8 ± 0,2	3,2 ± 0,1	3,6 ± 0,2	2,9 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,3	1,8 ± 0,2
Мышца Muscle	1,7 ± 0,2	2,7 ± 0,3	3,6 ± 0,1	3,1 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,2
Кожа бедра Thigh skin	1,5 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,1 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Кожа уха Ear skin	1,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2	3,3 ± 0,3	2,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Глаза Eyes	2,6 ± 1,4	2,7 ± 1,3	2,6 ± 1,4	2,5 ± 1,2	2,6 ± 1,2	2,8 ± 1,5	2,7 ± 1,4	2,5 ± 1,3	2,7 ± 1,3	2,5 ± 1,2	2,5 ± 1,5	2,5 ± 1,3
<b>Препарат в дозе 0,59 мг/кг</b> The drug at 0,59 mg/kg												
Сыворотка крови Blood serum	33,8 ± 0,5	26,6 ± 0,5	19,5 ± 0,2	16,5 ± 0,3	15,7 ± 0,4	13,7 ± 0,2	10,9 ± 0,3	8,1 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,4	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,2
Печень Liver	24,8 ± 2,0	31,8 ± 0,9	38,6 ± 0,8	34,6 ± 0,6	29,5 ± 1,1	28,7 ± 1,4	21,3 ± 0,3	13,3 ± 0,5	10,2 ± 0,3	7,0 ± 0,3	5,7 ± 0,3	5,9 ± 0,5
Почки Kidneys	14,6 ± 0,3	16,6 ± 0,5	17,5 ± 0,5	17,1 ± 0,3	16,7 ± 0,4	15,9 ± 0,7	15,8 ± 0,5	14,1 ± 0,4	12,5 ± 0,2	8,8 ± 0,2	5,8 ± 0,3	5,7 ± 0,1
Селезенка Spleen	16,2 ± 1,0	18,4 ± 0,7	17,8 ± 0,4	13,7 ± 0,3	9,6 ± 0,5	9,5 ± 0,4	9,5 ± 0,2	9,3 ± 0,7	9,2 ± 0,2	9,1 ± 0,6	9,2 ± 0,4	9,3 ± 0,2
Сальник Gland	2,7 ± 0,1	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,2	4,1 ± 0,2	4,6 ± 0,3	4,9 ± 0,3	4,1 ± 0,3	3,3 ± 0,4	3,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3	1,7 ± 0,3	1,7 ± 0,2

Окончание табл. 2  
End of table 2

Органы и ткани Organs and tissues	Нормированная флуоресценция, усл. ед. Normalized fluorescence, a.u.											Фон* Background*
	5 с 5 sec	15 мин 15 min	30 мин 30 min	1 ч 1 hour	3 ч 3 hour	5 ч 5 hour	14 ч 14 hour	24 ч 24 hour	48 ч 48 hour	72 ч 72 hour	6 сут 6 days	
Мышца Muscle	2,7 ± 0,4	3,4 ± 0,1	4,1 ± 0,4	3,9 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,1 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2
Кожа бедра Thigh skin	1,9 ± 0,1	2,2 ± 0,3	2,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,3 ± 0,2	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Кожа уха Ear skin	2,1 ± 0,2	3,1 ± 0,2	3,8 ± 0,2	3,5 ± 0,1	3,1 ± 0,2	3,0 ± 0,5	2,7 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,0 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,2
Глаза Eyes	2,6 ± 1,3	2,7 ± 1,3	2,8 ± 1,2	2,6 ± 1,4	2,7 ± 1,1	2,8 ± 1,1	2,7 ± 1,3	2,7 ± 1,1	2,7 ± 1,2	2,5 ± 1,2	2,6 ± 1,0	2,7 ± 1,0
<b>Препарат в дозе 1,475 мг/кг</b> The drug at 1,475 mg/kg												
Сыворотка крови Blood serum	68,6 ± 0,7	43,2 ± 0,8	39,3 ± 0,7	34,2 ± 0,5	20,0 ± 0,3	16,0 ± 0,3	13,4 ± 0,5	11,3 ± 0,2	8,4 ± 0,4	5,6 ± 0,3	5,3 ± 0,2	5,7 ± 0,2
Печень Liver	34,7 ± 1,7	41,1 ± 0,4	45,3 ± 0,2	41,2 ± 0,9	37,2 ± 1,2	32,9 ± 0,8	25,9 ± 0,4	19,0 ± 1,0	17,1 ± 0,2	15,1 ± 0,2	11,6 ± 0,4	6,1 ± 0,5
Почки Kidneys	20,4 ± 0,7	24,5 ± 0,8	27,5 ± 0,5	25,1 ± 0,8	22,9 ± 0,3	22,2 ± 0,6	20,8 ± 0,6	19,4 ± 0,3	15,3 ± 0,3	11,2 ± 0,1	7,7 ± 0,4	5,7 ± 0,1
Селезенка Spleen	18,2 ± 1,2	25,0 ± 0,8	23,0 ± 0,5	18,4 ± 0,7	14,2 ± 0,6	12,1 ± 0,4	10,3 ± 0,5	8,5 ± 0,5	8,0 ± 0,3	8,1 ± 0,5	8,1 ± 0,8	8,1 ± 0,4
Сальник Gland	2,9 ± 0,2	3,7 ± 0,3	4,6 ± 0,4	4,9 ± 0,2	5,2 ± 0,4	6,1 ± 0,2	5,0 ± 0,3	4,1 ± 0,4	3,6 ± 0,2	3,2 ± 0,4	2,1 ± 0,2	1,8 ± 0,2
Мышца Muscle	3,7 ± 0,3	4,3 ± 0,2	4,9 ± 0,3	4,6 ± 0,2	4,3 ± 0,2	3,9 ± 0,3	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,2	2,4 ± 0,3	1,7 ± 0,1	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Кожа бедра Thigh skin	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,2	2,9 ± 0,3	3,0 ± 0,2	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,5	2,9 ± 0,3	2,6 ± 0,3	2,1 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Кожа уха Ear skin	2,2 ± 0,2	3,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,0 ± 0,3	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3	3,1 ± 0,3	2,5 ± 0,4	2,2 ± 0,3	2,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,1
Глаза Eyes	2,6 ± 1,3	2,5 ± 1,2	2,6 ± 1,2	2,5 ± 1,4	2,6 ± 1,2	2,7 ± 1,3	2,6 ± 1,3	2,5 ± 1,4	2,7 ± 1,4	2,6 ± 1,2	2,5 ± 1,3	2,5 ± 1,2

**Примечание.** Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne-лазера ( $\lambda_{max} = 632,8$  нм), измерения проводили в диапазоне длин волн 650–850 нм. Полушириным шрифтом выделены значения нормированной флуоресценции, достоверно превышающие уровень фона ( $p < 0,05$ ); курсивом — недостоверно превышающие уровень фона ( $p \geq 0,05$ ), обычный шрифт соответствует значениям нормированной флуоресценции на уровне фона; \*нормированная флуоресценция у кроликов, которым вводили растворитель (0,025 % раствор  $\text{NaHCO}_3$ ).

*Note.* Fluorescence, excited by a He-Ne laser ( $\lambda_{max} = 632.8$  nm); measurements were carried out at 650–850 nm. Values of normalized fluorescence, significantly exceeding the background level ( $p < 0.05$ ) are in bold; values insignificantly exceeding the background level ( $p \geq 0.05$ ) are in italics, regular font corresponds to normalized fluorescence values at the background level; \*normalized fluorescence in mice injected with a solvent (0.025%  $\text{NaHCO}_3$  solution).

Таблица 3. Длительность циркуляции препарата бактериосенс в организме интактных животных

Table 3. The duration of circulation of the drug bacteriocens in the organism of intact animals

Животные Animals	Доза, мг/кг Dose mg/kg	Длительность циркуляции, сут Circulation duration, days								
		Сыворотка крови Blood serum	Печень Liver	Почки Kidneys	Селезенка Spleen	Сальник Gland	Мышца Muscle	Кожа бедра Thigh skin	Кожа уха Ear skin	Глаза Eyes
Мыши Mice	1,0	1	1	2	14 ч 14 hour	2	1	14 ч 14 hour	14 ч 14 hour	0
	2,5	2	4	2	2	>6	2	3	3	0
	6,25	4	>6	6	4	>6	3	4	4	0
Кролики Rabbits	0,236	1	3	4	3 ч 3 hour	3	2	3	1	0
	0,59	2	4	4	14 ч 14 hour	4	4	3	2	0
	1,475	3	>6	>6	1	6	4	4	4	0

**Примечание.** Флуоресценцию возбуждали излучением He-Ne-лазера ( $\lambda_{max} = 632,8$  нм). Измерение проводили в диапазоне 650–850 нм.

*Note.* Fluorescence, excited by a He-Ne laser ( $\lambda_{max} = 632.8$  nm). The measurement was carried out at 650–850 nm.

от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в коже бедра до 4 сут (1,475 мг/кг) и до 3 сут (0,59 и 0,236 мг/кг).

В коже уха НФ бактериосенса увеличивалась в течение 30 мин, удерживалась на достигнутом уровне 1–3 ч в зависимости от дозы, а затем быстро снижалась. Через 1 сут после введения в кожу уха НФ снижалась на 67 % (1,475 мг/кг), 68 % (0,59 мг/кг) и 88 % (0,236 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в коже уха до 4 сут (1,475 мг/кг), 2 сут (0,59 мг/кг) и 1 сут (0,236 мг/кг).

В мышце НФ препарата увеличивалась в течение 30 мин, удерживалась на достигнутом уровне 1–5 ч в зависимости от дозы, а затем быстро снижалась. Через 1 сут после введения в мышцу НФ снижалась на 50 % (1,475 мг/кг), 54 % (0,59 мг/кг) и 73 % (0,236 мг/кг) от максимального значения. Флуоресцирующая форма ФС сохранялась в мышце до 4 сут (1,475 и 0,59 мг/кг) и 2 сут (0,236 мг/кг).

В глазах НФ препарата регистрировалась на уровне фоновых значений.

Таким образом, препарат бактериосенс быстро выводился из кровотока кролика, через 1 сут при использовании минимальной дозы (0,236 мг/кг) и через 3 сут при максимальной дозе (1,475 мг/кг). В коже, мышце и селезенке бактериосенс накапливался быстро и достаточно быстро выводился – максимальная доза (1,475 мг/кг) регистрировалась до 4 сут, минимальная доза (0,236 мг/кг) – до 3 сут. Наиболее интенсивно накапливался и длительно

удерживался препарат в сальнике, печени и почках: более 6 сут при использовании максимальной дозы (1,475 мг/кг) и 4 сут при минимальной дозе (0,236 мг/кг). Основные пути элиминирования препарата из организма кролика происходили через почки и печень.

#### Оценка фармакокинетических параметров препарата бактериосенс

При сравнительной оценке длительности циркуляции бактериосенса в организме мышей и кроликов выявлены общие закономерности: быстрая дозозависимая элиминация препарата из кровотока, кожи, мышцы, селезенки, отсутствие накопления препарата в глазах, длительная дозозависимая циркуляция в сальнике, печени и почках. Основными путями элиминирования для обоих видов животных являются печень и почки (табл. 3).

На рис. 2а и б представлены кривые «концентрация – время» для сыворотки крови при использовании различных доз препарата у интактных мышей и кроликов соответственно.

На основании полученных данных рассчитаны фармакокинетические параметры для сыворотки крови, которые представлены в табл. 4.

Анализ полученных данных показал, что общий клиренс с увеличением дозы бактериосенса уменьшался для обоих видов животных (мышей и кроликов), что свидетельствует об обратной пропорциональной зависимости общего клиренса от внутривенно введенной дозы препарата.

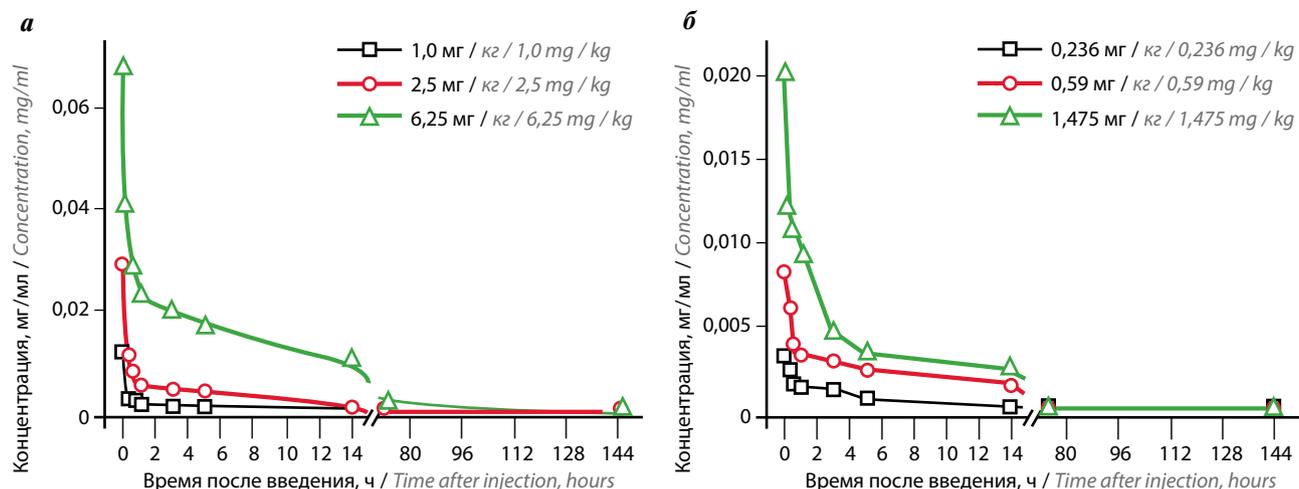


Рис. 2. Фармакокинетика бактериосенса. Кривые «концентрация – время» для сыворотки крови при использовании терапевтических доз препарата у интактных мышей (а) и эквивалентных доз у кроликов (б)

Fig. 2. The pharmacokinetics of bacteriocens. Concentration – time curves for blood serum when using therapeutic doses of the drug in the intact mice (a) and equicharacteristic doses in rabbits (b)

Таблица 4. Параметры фармакокинетики препарата бактериосенс в организме интактных животных

Table 4. Pharmacokinetics parameters of the drug bacteriocens in the organism of intact animals

Животные Animals	Доза, мг/кг Doze, mg/kg	Параметры фармакокинетики Pharmacokinetic parameters		
		Общий клиренс препара- та, мл/мин Total body clearance, ml/min	Стационарный объем распределения препарата, мл Steady-state volume of the drug distribution, ml	Продолжительность периода полувыведения, мин Half-life of the drug, min
Мыши Mice	1,0	0,130	2,1	8
	2,5	0,103	2,1	10
	6,25	0,062	2,3	24
Кролики Rabbits	0,236	0,318	178,8	20
	0,59	0,0423	179,9	20
	1,475	0,0367	182,5	20

Объем распределения препарата практически не зависел от введенной дозы для обоих видов животных.

Продолжительность  $T_{1/2}$  бактериосенса у мышей имеет прямо пропорциональную зависимость от дозы: с ее увеличением  $T_{1/2}$  также увеличивался от 8 до 24 мин. У кроликов  $T_{1/2}$  не зависел от дозы и составлял 20 мин.

### Выводы

1. Препарат бактериосенс быстро выводился из кровотока мыши: через 1 сут при использовании минимальной дозы (1,0 мг/кг) и через 4 сут при максимальной дозе (6,25 мг/кг). В коже, мышце и селезенке бактериосенс накапливался быстро, но также быстро и выводился: максимальная доза (6,25 мг/кг)

регистрировалась до 4 сут, минимальная доза (1,0 мг/кг) – не более 24 ч. Наиболее интенсивно накапливался и длительно удерживался препарат в сальнике, печени и почках: более 6 сут при использовании максимальной дозы (6,25 мг/кг) и 2 сут при минимальной дозе (1,0 мг/кг). Основные пути элиминирования препарата из организма мышей – через почки и печень.

2. У кроликов бактериосенс также быстро выводился из кровотока: через 1 сут при использовании минимальной дозы (0,236 мг/кг) и через 3 сут при применении максимальной (1,475 мг/кг). В коже, мышце и селезенке бактериосенс накапливался быстро и достаточно быстро выводился: максимальная доза (1,475 мг/кг) регистрировалась до 4 сут, минимальная (0,236 мг/кг) – до 3 сут. Наиболее

интенсивно накапливался и длительно удерживался препарат в сальнике, печени и почках: более 6 сут при использовании максимальной дозы (1,475 мг/кг) и 4 сут при минимальной дозе (0,236 мг/кг). Основные пути элиминирования препарата из организма кролика — через почки и печень.

3. Общий клиренс с увеличением дозы бактериосенса уменьшался как для мышей, так и для кроли-

ков, что свидетельствовало об обратно пропорциональной зависимости общего клиренса от внутривенно введенной дозы препарата. Продолжительность  $T_{1/2}$  бактериосенса для мышей имела прямо пропорциональную зависимость от дозы: с ее увеличением  $T_{1/2}$  также увеличивался от 8 до 24 мин. Для кроликов  $T_{1/2}$  не зависел от дозы и составил 20 мин.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Филоненко Е.В. Флюоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия — обоснование применения и возможности в онкологии. Фотодинамическая терапия и фотодиагностика 2014;1:3–8. [Filonenko E.V. Fluorescence diagnostics and photodynamic therapy: justification of applications and opportunities in oncology. Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika = Photodynamic therapy and photodiagnosis 2014;1:3–8. (In Russ.)].
2. Shafirstein G., Bellnier D., Oakley E. et al. Interstitial Photodynamic Therapy—A Focused Review. *Cancers (Basel)* 2017;9(2):12. DOI: 10.3390/cancers9020012.
3. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chem Rec* 2017;17(8):775–802. DOI: 10.1002/tcr.201600121.
4. Миронов А.Ф., Грин М.А. Сенситизаторы бактериохлоринового ряда: перспективы использования в фотодинамической терапии. *Вестник МИТХТ* 2006;4:5–28. [Mironov A.F., Grin M.A. Bacteriochlorin sensitizers: prospects of use in photodynamic therapy. *Vestnik MITHT* 2006;4:5–28. (In Russ.)].
5. Krzykawska-Serda M., Dąbrowski J.M., Arnaut L.G. et al. The role of strong hypoxia in tumors after treatment in the outcome of bacteriochlorin-based photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 2014;73:239–51. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.003.
6. Морозова Н.Б., Плотникова Е.А., Плютинская А.Д. и др. Доклиническое изучение препарата «Бактериосенс», предназначенного для фотодинамической терапии злокачественных новообразований, в том числе рака предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(3):55–64. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-55-64. [Morozova N.B., Plotnikova E.A., Plytinskaya A.D. et al. Preclinical trial of Bacteriosens used for the photodynamic therapy of malignant tumors, including prostate cancer. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(3):55–64. (In Russ.)].
7. Макарова Е.А., Якубовская Р.И., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор для фотодинамической терапии. Патент РФ на изобретение № 2549953 от 10.05.2015. Доступно по: [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_37814992\\_63599221.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_37814992_63599221.pdf). [Makarova E.A., Jakubovskaja R.I., Vorozhtsov G.N. et al. Photosensitizers for photodynamic therapy. Patent RF № 2549953 on 10.05.2015. Available on: [https://elibrary.ru/download/elibrary\\_37814992\\_63599221.pdf](https://elibrary.ru/download/elibrary_37814992_63599221.pdf). (In Russ.)].
8. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44.
9. Уланова И.П., Сидоров К.К., Халепо А.Н. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании. В сб.: *Токсикология новых промышленных химических веществ*. Под ред. А.А. Летавета, И.В. Саноцкого. Л.: Медицина, 1968;10:18–25. [Ulanova I.P., Sidorov K.K., Khalepo A.N. On consideration of the body surface of experimental animals during toxicological studies. In the collection of papers: *Toxicology of new industrial chemicals*. Ed. by A.A. Letavet, I.V. Sanotsky. Leningrad: Meditsina Publishers, 1968;10:18–25. (In Russ.)].
10. Zharkova N.N., Kozlov D.N., Polivanov Yu.N. et al. Laser-excited fluorescence spectrometric system for tissue diagnostics. *SPIE* 1994;2328:196–202. DOI: 10.1117/12.197510.
11. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M. Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostics. *Laser Physics* 2000;10(6):1188–207.
12. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. С.: 845–55. [Guidelines for pre-clinical studies of the pharmacokinetics of drugs. In: *A guide for preclinical drug studies. Part One*. Ed. by A.N. Mironov et al. Moscow: Grif & Co, 2012. Pp.: 845–55. (In Russ.)].

**Вклад авторов**

Н.Б. Морозова: проведение исследований, анализ полученных данных, написание текста рукописи;  
Е.А. Плотникова: проведение исследований, получение данных для анализа;  
А.Д. Плютинская: статистическая обработка полученных данных;  
В.О. Страмова: проведение исследований, получение данных для анализа;  
М.С. Воронцова: сбор и обработка биологического материала;  
А.А. Панкратов: концепция и разработка дизайна исследования, редактирование;  
Е.А. Макарова: подготовка образцов препарата для проведения исследований;  
Е.А. Лукьянец: обзор публикаций по теме статьи;  
А.Д. Каприн: руководство научными направлениями и исследованиями, включая клинические и экспериментальные в области фотодинамической терапии.

**Authors' contributions**

N.B. Morozova: research activity, data analysis, writing the manuscript;  
E.A. Plotnikova: research activity, data collection;  
A.D. Plyutinskaya: data statistical analysis;  
V.O. Stramova: research activity, data collection;  
M.S. Vorontsova: biological material collection and treatment;  
A.A. Pankratov: study design concept and development, editing;  
E.A. Makarova: preparing drug samples for the study;  
E.A. Lukyanets: reviewing publications on the topic;  
A.D. Caprin: heading the researches, including clinical and experimental ones on photodynamic therapy.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Н.Б. Морозова/N.B. Morozova: <https://orcid.org/0000-0002-7159-805X>  
Е.А. Плотникова/E.A. Plotnikova: <https://orcid.org/0000-0001-8711-6919>  
А.Д. Плютинская/A.D. Plyutinskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6898-2931>  
М.С. Воронцова/M.S. Vorontsova: <https://orcid.org/0000-0002-9320-1746>  
А.А. Панкратов/A.A. Pankratov: <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>  
Е.А. Макарова/E.A. Makarova: <https://orcid.org/0000-0003-4144-6159>  
Е.А. Лукьянец/E.A. Lukyanets: <https://orcid.org/0000-0002-8853-6912>  
А.Д. Каприн/A.D. Caprin: <https://orcid.org/0000-0001-8784-8415>

**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.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14.N08.12.0049).

**Financing.** The research was carried out with the financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation (state contract No. 14.N08.12.0049).

Статья поступила: 22.04.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 22.04.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.

# ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ PLGA НАНОЧАСТИЦ, НАГРУЖЕННЫХ ДОКСОРУБИЦИНОМ

Ю.А. Малиновская<sup>1,3,4</sup>, Е.И. Коваленко<sup>2</sup>, Т.С. Ковшова<sup>1,3,4</sup>, Н.С. Осипова<sup>1,4</sup>, О.О. Максименко<sup>1,4</sup>,  
В.Ю. Балабаньян<sup>3</sup>, В.А. Разживина<sup>1</sup>, М.В. Гречихина<sup>2</sup>, А.А. Бойко<sup>2</sup>, С.Э. Гельперина<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>ООО «Технология лекарств»; Россия, 141400 Химки, ул. Рабочая, 2а;

<sup>2</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»;  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; Россия, 119991 Москва, Ленинские Горы, 1;

<sup>4</sup>Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

**Контакты:** Юлия Александровна Малиновская j.malinovskaya@gmail.com

**Введение.** Использование полимерных биodeградируемых наночастиц (НЧ) в качестве средств доставки лекарственных веществ является перспективным способом преодоления гистогематических барьеров. Так, НЧ из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), модифицированные полочсамером 188, способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и доставлять лекарственные вещества, в частности доксорубин, в интракраниальную опухоль при внутривенном введении. На этапе доклинических исследований было важно оценить возможное токсическое действие НЧ на компоненты крови.

**Цель исследования** – оценка цитотоксичности и гемосовместимости PLGA НЧ, нагруженных доксорубицином (Dox-PLGA НЧ), изучение кинетики захвата наночастиц клетками глиобластомы человека.

**Материалы и методы.** Для изучения влияния НЧ на свертывающую систему крови определяли протромбиновое время до и после инкубации плазмы с НЧ. Уровень активации тромбоцитов определяли на проточном цитофлуориметре по уровню экспрессии P-селектина. Гемолитическую активность НЧ определяли спектрофотометрически по концентрации высвободившегося гемоглобина. Цитотоксичность НЧ оценивали с помощью MTS-теста. Захват НЧ клетками изучали с помощью проточного цитофлуориметра.

**Результаты.** Dox-PLGA НЧ не оказывали влияния на время коагуляции плазмы крови и активность тромбоцитов в диапазоне концентраций 0,1–100 мкг/мл: показатель протромбинового времени составил 12–15 с для всех тестируемых образцов и уровень экспрессии P-селектина не превысил 15 %. НЧ не вызывали гемолиз после 3 ч инкубации с образцами крови. Цитотоксический эффект Dox-PLGA НЧ на клетки глиобластомы U87MG был сравним с действием субстанции доксорубина. Результаты проточной цитометрии показали, что НЧ активно захватываются клетками.

**Заключение.** Проведенное исследование подтвердило гемосовместимость Dox-PLGA НЧ: НЧ не оказывали влияния на свертывающую систему крови и не вызывали гемолиз в исследуемом диапазоне концентраций. НЧ активно захватывались клетками глиобластомы и оказывали выраженный цитотоксический эффект.

**Ключевые слова:** PLGA наночастицы, биосовместимость, гемосовместимость, цитотоксичность, интернализация

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-71-80



## CYTOTOXICITY AND HEMOCOMPATIBILITY OF DOXORUBICIN-LOADED PLGA NANOPARTICLES

Yu. A. Malinovskaya<sup>1,3,4</sup>, E. I. Kovalenko<sup>2</sup>, T. S. Kovshova<sup>1,3,4</sup>, N. S. Osipova<sup>1,4</sup>, O. O. Maksimenko<sup>1,4</sup>,  
V. Yu. Balabanyan<sup>3</sup>, V. A. Razzhivina<sup>1</sup>, M. V. Grechikhina<sup>2</sup>, A. A. Boiko<sup>2</sup>, S. E. Gelperina<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Drug Technology LLC; 2a Rabochaya St., Khimki 141400, Russia;

<sup>2</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry; 16/10 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117997, Russia;

<sup>3</sup>M. V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

<sup>4</sup>D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia; 9 Miusskaya ploshchad', Moscow 125047, Russia

**Introduction.** The use of polymeric biodegradable nanoparticles (NP) as drug delivery systems is a promising approach to overcome histohematomatic barriers. Thus, poloxamer 188-coated poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) NP are able to overcome blood-brain barrier and to deliver therapeutic agents, in particular doxorubicin, into intracranial tumour upon intravenous administration. It is important to evaluate NP interaction with blood components in preclinical studies.

**The objective of the study** was to investigate cytotoxicity and hemocompatibility of doxorubicin-loaded PLGA NP (Dox-PLGA NP), to assess NP uptake by glioblastoma cells.

**Materials and methods.** The influence of NP on coagulation cascade was evaluated by prothrombin time measuring before and after plasma incubation with NP. To assess NP thrombogenicity the platelet activation level was determined by flow cytometry. The NP hemolytic activity (released hemoglobin concentration) was measured spectrophotometrically. NP cytotoxicity was determined by MTS assay. NP uptake by human glioblastoma cells was evaluated by flow cytometry.

**Results.** Dox-PLGA NP did not influence blood coagulation time and thrombocyte activity at concentrations up to 100 mcg/mL: PT values were 12–15 s for all tested samples, and P-selectin expression level did not exceed 15 %. All samples were not hemolytic after 3 h of incubation.

Cytotoxicity of doxorubicin released from PLGA NP on glioma U87MG cells was comparable to that of free doxorubicin. As shown by flow cytometry Dox-PLGA NP were efficiently internalized into the cells.

**Conclusion.** The study of hemocompatibility confirmed the safety of Dox-PLGA NP: NP did not influence blood coagulation system and did not induce hemolysis. NP were efficiently internalized into the human glioblastoma cells and produced considerable antitumor effect in vitro.

**Key words:** PLGA nanoparticles, biocompatibility, hemocompatibility, cytotoxicity, internalization

## Введение

Важными задачами современной фармакологии являются разработка систем направленной доставки противоопухолевых лекарственных веществ (ЛВ) и снижение системной токсичности в терапии злокачественных новообразований. В настоящее время на рынке существует более 40 препаратов на основе коллоидных систем доставки, одобренных системой контроля качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), и сотни нанотехнологических препаратов находятся на стадии разработки. В состав противоопухолевых наносомальных препаратов (наночастиц (НЧ), липосом) вводят как цитотоксические ЛВ, так и малые интерферирующие РНК (siРНК) и лизаты опухолевых клеток [1–4]. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является использование НЧ на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) [5–17]. Благодаря способности разлагаться в живом организме без образования токсичных продуктов полилактиды широко применяются в хирургии, ортопедии и стоматологии, а также в качестве полимеров-носителей для инъекционных лекарственных форм длительного действия (депо-форм), представляющих собой микросферы размером 50–150 мкм с включенным в них ЛВ [5–7].

Помимо биосовместимости, к полилактидам как к материалам, предназначенным для контакта с кровью, предъявляется еще и требование гемосовместимости, что подразумевает отсутствие отрицательного воздействия на кровь или ее компоненты. Гемосовместимый материал не должен провоцировать образование тромбов и тромбоэмболии, активировать свертывающую, фибринолитическую системы и систему комплемента, оказывать отрицательное действие на белковые и форменные элементы крови, нарушать электролитный баланс крови [18].

В то же время гемосовместимость наночастиц PLA/PLGA изучена недостаточно, данные часто противоречивы, что объясняется разнообразием свойств полилактидов и других ингредиентов, применяемых для получения НЧ [19, 20]. Так, в работах С. Fornaguera и соавт., S. Rahimian и соавт., N. Desai показано, что особенности взаимодействия НЧ с биологической

средой зависят от их физико-химических параметров, таких как гидрофобность, поверхностный заряд и размер [19, 21–23].

На этапе доклинических исследований важно оценить возможное токсическое действие НЧ на компоненты крови. Противоопухолевая активность НЧ, нагруженных цитостатическим ЛВ, зависит от способности НЧ захватываться клетками и высвобождать ЛВ в активной форме. Поэтому важно изучить цитотоксичность разрабатываемых НЧ в отношении опухолевых клеток и сравнить эффект со свободным ЛВ и плацебо-НЧ.

Необходимо отметить, что при переносе технологии получения наносомальной формы с лабораторного уровня на стадию клинических исследований часто лимитирующим фактором является отсутствие первичных систематических исследований по взаимодействию НЧ с биологическими компонентами, изучению биосовместимости и цитотоксичности НЧ.

Как показали проведенные ранее исследования, модификация поверхности НЧ PLGA полоксамером 188 позволяет им преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в мозг.

Наноразмерная форма доксорубина на основе модифицированных НЧ (Dox-PLGA НЧ) проявила высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной опухоли и весьма перспективна для клинического использования [24, 25]. В связи с этим помимо влияния на свертывающую систему крови, выявления возможных тромбогенных свойств и оценки гемолитической активности важно оценить цитотоксические свойства Dox-PLGA НЧ и их захват потенциальными клетками-мишенями (клетки глиомы человека U87MG).

**Цель исследования** — оценка цитотоксичности и гемосовместимости PLGA НЧ, Dox-PLGA НЧ, изучение кинетики захвата НЧ клетками глиобластомы человека.

## Материалы и методы

**Получение Dox-PLGA НЧ.** Для получения НЧ использовали PLGA марки Resomer® 502H с соотношением мономеров молочной и гликолевой кислот 50 : 50 (MM 7–17 кДа, Evonik Röhm GmbH, Германия).

НЧ получали методом двойных эмульсий (в/м/в). Доксорубин (25 мг, Teva, Sicor, Италия) растворяли в 0,001 н. соляной кислоте (4 мл) и смешивали с раствором PLGA (250 мг) в дихлорметане (6 мл). Смесь гомогенизировали с помощью диспергатора Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия) при 23 600 об/мин в течение 3 мин. Полученную первичную эмульсию (в/м) добавляли к 1 % раствору поливинилового спирта (9–10 кДа, Sigma, Германия) в фосфатном буфере (PBS, pH 7,4) и гомогенизировали сначала с помощью Ultra-Turrax T18, а затем с помощью гомогенизатора высокого давления (Panda Plus 2000, Италия) при 1000 бар. Органический растворитель удаляли под вакуумом; полученную суспензию лиофильно высушивали (Alpha 2–4 LSC, Martin Christ GmbH, Германия). В качестве криопротектора использовали маннит. Для получения PLGA-плацебо НЧ использовали аналогичную методику; при этом органическую фазу (раствор PLGA в дихлорметане) непосредственно добавляли к 1 % водному раствору поливинилового спирта. Для модификации поверхности НЧ полоксамером 188 (P188, BASF, Германия) непосредственно перед экспериментами лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1 % растворе полоксамера и инкубировали в течение 30 мин.

**Получение флуоресцентно-меченных НЧ.** Для визуализации *in vitro* использовали PLGA НЧ, меченные флуоресцентными красителями DiI и Cy5.5 (PLGA-Cy5.5 и PLGA-DiI НЧ соответственно). Для получения PLGA-Cy5.5 НЧ использовали конъюгат PLGA с цианиновым флуоресцентным красителем Cy5.5 (Cyanine5.5 amine, Lumiprobe, Германия). Соотношение краситель : полимер = 1 : 600 (в/в). Краситель конъюгировали с концевыми карбоксильными группами PLGA, активированными 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (Sigma, США). Для получения PLGA-DiI НЧ липофильный флуоресцентный краситель DiI (Sigma Life Science, США) вводили в состав органической фазы на стадии получения первичной эмульсии. Соотношение краситель : полимер = 1 : 750 (в/в). Свободный DiI отделяли от НЧ с помощью гельфильтрационной хроматографии на колонке с Sephadex G-25.

#### Определение физико-химических параметров наночастиц

Размеры НЧ (средний гидродинамический радиус), индекс полидисперсности (PDI) и  $\zeta$ -потенциалы определяли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Общее содержание доксорубина и флуоресцентных красителей Cy5.5 и DiI определяли спектрофотометрически после растворения НЧ в диметилсульфоксиде при длинах волн 480, 650 и 555 нм соответственно. Концентрацию свободного доксорубина и флуоресцентных красителей

в суспензии НЧ определяли спектрофотометрически в супернатантах, полученных после отделения НЧ ультрацентрифугированием (фильтры Microcon 30 kDa, Millipore, США; центрифуга Eppendorf Centrifuge 5415 R, Германия). Степень включения доксорубина в НЧ рассчитывали как отношение (%) свободного доксорубина к его общему содержанию в образце.

#### Исследование кинетики высвобождения доксорубина из наночастиц

Скорость высвобождения доксорубина из НЧ изучали в фосфатном буфере (PBS) при pH 7,4 и 4,5. НЧ ресуспендировали в PBS и помещали в шейкер-инкубатор (200 об/мин, 37 °C). Пробы отбирали через 0, 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч, НЧ отделяли центрифугированием (48300 g, 30 мин). Концентрацию доксорубина в супернатантах определяли спектрофотометрически ( $\lambda_{\max} = 480$  нм). Для каждого образца проводили по 3 параллельных измерения.

#### Клеточные линии

В исследовании использовали культуры клеток глиобластомы человека (U87MG), гепатокарциномы человека (HepG2) и иммортализованные клетки почечного эпителия свиньи (LLC-PK). Культуры клеток получены из Американского банка клеточных культур (ATCC, США). Клетки культивировали на ростовой среде (DMEM, Gibco) с добавлением смеси антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco, США), GlutaMAX (2 мМ, Gibco, США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, США) в стандартных условиях при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>.

#### Оценка цитотоксического действия наночастиц

Цитотоксическое действие Dox-PLGA НЧ оценивали на клеточных линиях U87MG, HepG2 и LLC-PK с помощью колориметрического MTS-теста. Для сравнения использовали ненагруженные НЧ (PLGA-плацебо НЧ) и свободный доксорубин. MTS-тест выполняли согласно стандартному протоколу с модификациями (Protocol TB245, Promega). В работе использовали CellTiter 96 AQ<sub>u</sub> One Solution Reagent (PROMEGA, США). Клетки высаживали в 96-луночные культуральные планшеты (по 4 тыс. клеток в 100 мкл ростовой среды (DMEM с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки)). В части лунок ростовую среду заменяли на питательную среду с образцами Dox-PLGA, PLGA-плацебо НЧ и доксорубин в диапазоне концентраций 1–500 мкг/мл НЧ, что соответствует 0,004–67 мкг/мл в пересчете на доксорубин. Через 24 ч культивирования определяли количество жизнеспособных клеток с помощью MTS-теста.

### Определение гемосовместимости

Образцы крови получали минимум от 3 доноров, не принимавших в течение 2 нед лекарственных средств, способных повлиять на результаты эксперимента. Для исследования протромбинового времени (ПВ) и реакции активации тромбоцитов кровь отбирали в пробирки с цитратом натрия, для тестирования гемолитической активности – в пробирки с литий-гепарином.

Для определения ПВ использовали бедную тромбоцитами плазму крови, полученную центрифугированием крови при 3000 об/мин (1500 g). Исследуемую плазму инкубировали в течение 30 мин с НЧ (PLGA-плацебо и Dox-PLGA) в концентрациях 1, 10, 100 мкг/мл. Для того чтобы исключить влияние времени инкубации на величину ПВ, использовали 2 контроля: ПВ определяли для плазмы крови непосредственно после центрифугирования и через 30 мин (время инкубации плазмы крови с НЧ).

Для определения активации тромбоцитов использовали плазму, обогащенную тромбоцитами (Platelet-rich plasma, PRP). Кровь в пробирке с этилендиаминтетрауксусной кислотой центрифугировали (1000 об/мин, 10 мин), затем отбирали белый ободок на границе форменных элементов и плазмы. Плазму (PRP) разбавляли в 20 раз PBS и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 1 ч с Dox-PLGA и PLGA-плацебо НЧ в концентрациях 0,1; 1,0; 10; 100 мкг/мл. В качестве положительного контроля плазму инкубировали с индуктором агрегации тромбоцитов аденозиндифосфатом (10 мкг/мл, 1 : 125); в качестве отрицательного контроля использовали PRP. Образцы фиксировали 1 % параформальдегидом и инкубировали с моноклональными антителами CD34, конъюгированными с FITC (Сорбент, Россия), и антителами к Р-селектину (CD62P), конъюгированными с PE (BioLegend, США), в течение 15 мин при комнатной температуре. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре MoFlo XDP (Beckman Coulter, США). CD34 использовали для выделения популяции тромбоцитов, а CD62P (P-selectin) – для идентификации активированных тромбоцитов. Уровень активации тромбоцитов определяли как долю CD62P-положительных тромбоцитов (%).

Для оценки гемолитической активности НЧ использовали фотометрический тест, основанный на детекции окисленных форм гемоглобина. Цельную кровь разбавляли в 25 раз PBS и центрифугировали при 800 g (15 мин); супернатант отбирали и использовали для определения свободного гемоглобина плазмы. Образцы крови инкубировали с PLGA-плацебо и Dox-PLGA НЧ в концентрации 1, 10, 100 мкг/мл в течение 3 ч при 37 °С. Для определения общего гемоглобина (tHb) в отдельный образец крови добавляли 1 % Triton X-100, вызывающий гемолиз (поло-

жительный контроль). После инкубации неповрежденные эритроциты отделяли центрифугированием. Супернатанты переносили в 96-луночные планшеты. Для индукции образования гемихромов в экспериментальные образцы добавляли додецилсульфат натрия. Количество гемоглобина в образце определяли, оценивая оптическую плотность раствора при 540 нм. Процент гемолиза рассчитывали как отношение оптической плотности образца к оптической плотности контроля.

### Изучение интернализации наночастиц методом проточной цитометрии

Клетки U87MG высаживали в 48-луночные культуральные планшеты. Dox-PLGA НЧ, меченные DiI или Cy5.5, ресуспендировали в 1 % растворе полоксамера, инкубировали в течение 30 мин, затем переносили в культуральную среду (DMEM), содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, и вносили в лунки культурального планшета в концентрации 40 мкг/мл. Клетки инкубировали с НЧ в течение 5, 15, 30, 60, 120, 240 и 300 мин. После инкубации среду удаляли. Клетки промывали PBS для удаления НЧ, связанных с мембраной клетки, затем снимали с подложки с помощью раствора трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты 0,25 %, центрифугировали (1000 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в питательной среде до конечной концентрации  $5 \times 10^5$  клеток/мл. Флуоресценцию клеток анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на клеточном сортере MoFlo XDP (Beckman Coulter, США). Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Summit V5.2.0.7477. Эффективность интернализации оценивали как процент клеток, интернализовавших НЧ. Для возбуждения флуоресценции DiI применяли лазер с длиной волны 561 нм; эмиссионные светофильтры: 580/23 нм (FL12-Dil) и 625/26 нм (FL13-Dil). Для возбуждения флуоресценции Cy5.5 использовали лазер 488 нм, эмиссионные светофильтры: 670/30 нм (FL4-PE-Cy5) и 725/40 нм (FL5-PE-Cy5).

### Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (Microsoft Excel 2010) и программы GraphPad Prism 6. Используемый статистический уровень значимости –  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Все полученные НЧ имели диаметр  $< 200$  нм, узкое распределение по размерам (PDI  $< 0,2$ ) и отрицательный  $\xi$ -потенциал поверхности (табл. 1). Для визуализации НЧ в экспериментах *in vitro* PLGA предварительно конъюгировали с индоцианиновым флуоресцентным красителем Cy5.5. Образование

Таблица 1. Физико-химические характеристики наночастиц (среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 3$ )Tabl. 1. Physicochemical parameters of nanoparticles (mean value  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

Образец наночастиц Nanoparticles sample	Концентрация активного вещества/ флуоресцентного красителя, мкг/мл Concentration of active substance/fluorescent dye, $\mu\text{g/ml}$	Средний размер, нм Mean size, nm	Индекс полидисперсности Polydispersity index	$\xi$ -потенциал, мВ $\xi$ -potential, mV
Dox-PLGA	Dox: 70,5	120 $\pm$ 1	0,104 $\pm$ 0,011	-11,6 $\pm$ 0,8
Dox-PLGA-Cy5.5	Dox: 67 Cy5: ~1,5	114 $\pm$ 1	0,196 $\pm$ 0,008	-14,9 $\pm$ 0,2
PLGA-DiI	DiI: 1,56	143 $\pm$ 2	0,138 $\pm$ 0,011	-30,8 $\pm$ 1,3

конъюгата подтверждали методом гельпроникающей хроматографии. Максимумы поглощения и флуоресценции Cy5.5 лежат в дальней красной области, поэтому введение этой флуоресцентной метки позволило дифференцировать меченые НЧ (Cy5.5  $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 690/712$  нм) и доxorубин ( $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 480/570$  нм).

#### Исследование кинетики высвобождения доxorубина из наночастиц

Влияние pH среды на скорость высвобождения доxorубина из НЧ изучали в фосфатном буфере при 2 значениях pH: 4,5 и 7,4. Данные значения pH были выбраны для моделирования профиля высвобождения доxorубина из НЧ в экстрацеллюлярном матриксе со значением pH, близким к 7,4, и органеллах клетки, внутри которых поддерживается кислая реакция среды (поздние эндосомы и лизосомы, pH 4,0–5,5) [26–28]. На рис. 1 видно, что кинетика высвобождения доxorубина из НЧ имеет двухфазный профиль. Высокая скорость высвобождения доxorубина в I фазе эксперимента (так называемый burst release) характерна для полимерных наносомальных форм и обусловлена диффузией ЛВ с поверхности НЧ [5]. В течение первых 2 ч высвобождается примерно 30 % доxorубина. В дальнейшем наблюдается медленное контролируемое высвобождение: так, в течение 24 ч высвобождается 60–70 % доxorубина. В кислой среде скорость его высвобождения выше: при pH 7,4 за 6 ч высвобождается около 40 % доxorубина, в то время как при pH 4,5 высвобождается 70 % доxorубина. Высокая скорость высвобождения доxorубина при кислых значениях pH коррелирует с данными, полученными другими авторами [29].

#### Оценка цитотоксического действия наночастиц

Цитотоксический эффект PLGA-плацебо НЧ оценивали на клеточных линиях HepG2, LLC-PK и U87MG. Культуры клеток LLC-PK и HepG2 часто используют как *in vitro* модели для оценки нефротоксического и гепатотоксического действия лекар-

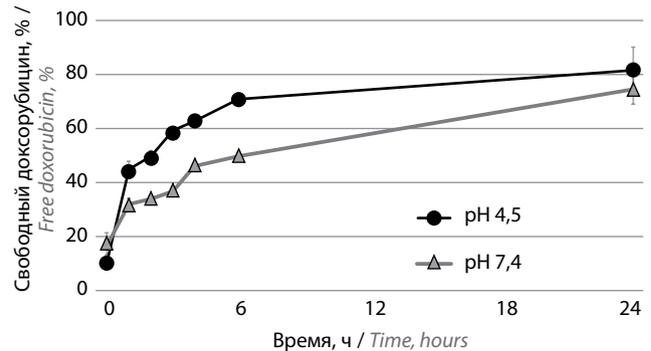


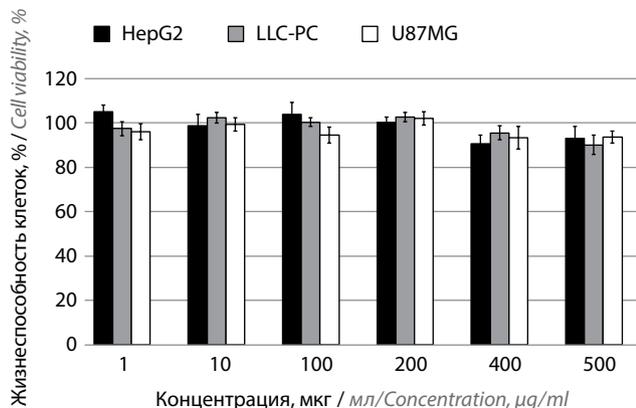
Рис. 1. Кинетика высвобождения доxorубина из PLGA наночастиц, нагруженных доxorубином, в PBS при pH 4,5 и 7,4 (25-кратное разведение; среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 3$ ;  $p = 0,95$ )

Fig. 1. Kinetics of doxorubicin release from Dox-PLGA nanoparticles (release medium PBS pH 4.5 and 7.4; 25-fold dilution; mean value  $\pm$  SD;  $n = 3$ ;  $p = 0.95$ )

ственных средств [30, 31]. Цитотоксический эффект Dox-PLGA НЧ в отношении опухолевых клеток оценивали на культурах клеток U87MG и HepG2. U87MG — хорошо изученная и часто используемая клеточная линия глиобластомы человека IV степени злокачественности. Показано, что данные клетки характеризуются средней чувствительностью к доxorубину по сравнению с другими клеточными линиями глиобластомы [32, 33]. Результаты MTS-теста после 24 ч инкубации подтвердили отсутствие цитотоксического действия PLGA-плацебо НЧ в исследуемом диапазоне концентраций (рис. 2). При инкубации клеток U87MG и HepG2 как с субстанцией, так и с наносомальной формой доxorубина наблюдалось достоверное снижение жизнеспособности клеток во всем диапазоне концентраций (рис. 3, 4). При этом цитотоксический эффект доxorубина, высвободившегося из НЧ, был сравним с действием субстанции доxorубина.

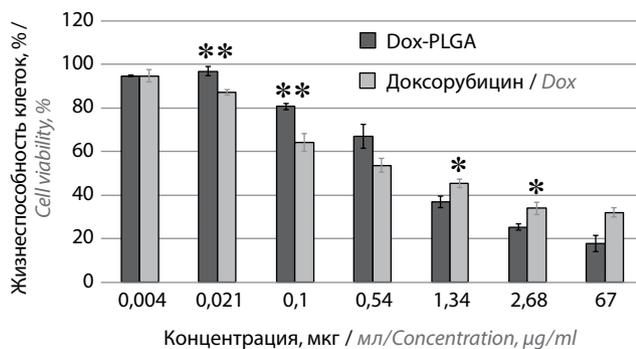
#### Определение гемосовместимости

Оценка влияния НЧ на свертывающую систему крови. Характер и особенность взаимодействия НЧ



**Рис. 2.** Анализ жизнеспособности клеток U87MG, HepG2 и LLC-PC после 24 ч инкубации с PLGA-плацебо наночастиц (MTS-тест; среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

**Fig. 2.** Viability of U87MG, u LLC-PC cells after 24 h of incubation with PLGA-Placebo NPs (MTS assay; mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ )



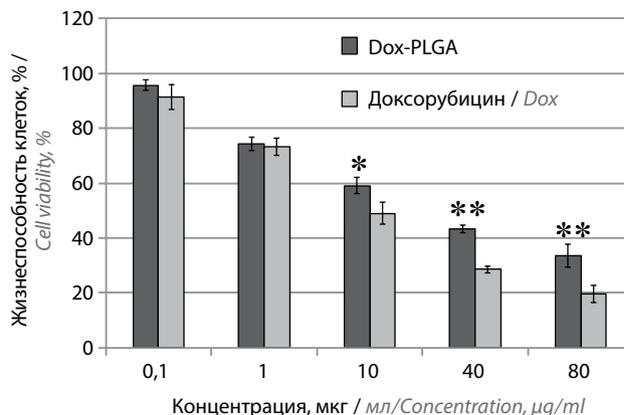
**Рис. 3.** Анализ жизнеспособности клеток U87MG после 24 ч инкубации с PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, и свободным доксорубицином. Концентрация в пересчете на доксорубин (среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 4$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$

**Fig. 3.** Cell viability assay (MTS-assay) for U87MG cells after 24 h of incubation with different concentrations of Dox-PLGA NPs and doxorubicin in solution (mean  $\pm$  SD;  $n = 4$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Concentrations are indicated corresponding to free doxorubicin

с компонентами крови определяется их составом и физико-химическими параметрами (размером, зарядом, формой, поверхностной модификацией) [26, 34–37]. В настоящем исследовании тромбогенные свойства НЧ оценивали по их влиянию на уровень активации тромбоцитов и время свертывания крови после ее инкубации с НЧ.

**Определение ПВ.** Для оценки возможного влияния наносомальной формы доксорубина на время коагуляции плазмы крови человека использовали стандартный тест определения ПВ.

Как видно из табл. 2, НЧ в исследуемом диапазоне концентраций не оказывают влияния на время коагуляции плазмы. Показатель ПВ находится в пределах стандартных значений и статистически не отличается от значения для контрольных образцов. В норме показатель ПВ составляет 11–15 с (100 % активность всех факторов протромбинового комплек-



**Рис. 4.** Анализ жизнеспособности клеток HepG2 после 24 ч инкубации с PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, и свободным доксорубицином (среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 3$ ); \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Концентрация в пересчете на доксорубин

**Fig. 4.** Cell viability assay (MTS-assay) for HepG2 cells after 24 h of incubation with Dox-PLGA NPs and doxorubicin in solution (mean  $\pm$  SD;  $n = 3$ ); \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Concentrations are indicated corresponding to free doxorubicin

са), при этом физиологически значимый показатель имеет увеличение ПВ в 2 раза по сравнению с контрольной плазмой [26]. Полученные данные совпадают с большинством исследований, подтверждающих безопасность PLGA НЧ [6, 19, 35, 38].

**Таблица 2.** Время коагуляции плазмы крови (протромбиновое время) после инкубации с наночастицами. Контроли 1 и 2 – время коагуляции плазмы крови сразу и через 30 мин после забора (среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

**Table 2.** Prothrombin time after plasma incubation with nanoparticles. Controls 1 and 2 – PT of blood samples immediately and 30 min after withdrawal, respectively (mean value  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

Образец Sample	Концентрация наночастиц, мкг/мл Nanoparticles concentration, µg/ml	Протромбиновое время, с Protrombin time, sec
Контроль 1 Control 1	—	14,85
Контроль 2 Control 2	—	14,95
PLGA-пла- цебо PLGA-Placebo	1	14,15
	10	14,55
	100	14,90
PLGA-доксо- рубин PLGA-Dox	1	14,65
	10	14,20
	100	15,20

**Определение активации тромбоцитов.** Определение активации тромбоцитов после контакта плазмы крови с НЧ является еще одним параметром оценки

гемосовместимости НЧ [35]. Тромбоциты представляют собой клеточные компоненты коагуляционной системы, их активация является важнейшим фактором в запуске и регуляции гемостаза [39, 40].

В табл. 3 показана доля (%) активированных тромбоцитов для PLGA-плацебо НЧ и Дох-PLGA НЧ. Добавление индуктора активации тромбоцитов (аденозиндифосфат) значительно увеличило экспрессию Р-селектина – основного компонента, обеспечивающего агрегацию [41, 42], и, соответственно, активацию тромбоцитов (положительный контроль). Количество клеток, экспрессирующих Р-селектин в отсутствие активации, составило не более 10 %, в то время как в положительном контроле данный показатель составлял 65–70 %, что подтверждает избирательную экспрессию Р-селектина только активированными тромбоцитами. Дох-PLGA НЧ в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл не оказывали значитель-

**Таблица 3.** Уровень активации тромбоцитов (уровень экспрессии Р-селектина) после инкубации плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (PRP) с PLGA наночастиц, обогащенных доксорубицином, и PLGA-плацебо наночастиц. В качестве отрицательного контроля использовали PRP; в качестве положительного контроля использовали PRP + аденозиндифосфат (среднее значение  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

Table 3. Level of platelet activation (P-selectin expression) after platelet-rich plasma incubation with Dox-PLGA and PLGA-Placebo nanoparticles. Platelet-rich plasma was used as negative control; Platelet-rich plasma + ADP was used as positive control (mean value  $\pm$  SD;  $n = 3$ )

Образец Sample	Концентрация наночастиц, мкг/мл Nanoparticles concentration, $\mu$ g/ml	Уровень экспрессии Р-селектина, % Level of P-selectin expression, %
Отрицательный контроль (PRP) Negative control (PRP)	–	8,90
Положительный контроль (PRP + ADP) Positive control (PRP + ADP)	–	65,83
PLGA-плацебо PLGA-Placebo	0,1	11,32
	1	4,23
	10	8,24
	100	12,75
Доксорубицин-PLGA Dox-PLGA	0,1	8,80
	1	5,60
	10	11,91
	100	14,81

**Примечание.** PRP – плазма, обогащенная тромбоцитами.  
Note. PRP – platelet-rich plasma.

ного влияния на уровень экспрессии Р-селектина относительно отрицательного контроля (PRP). При концентрации НЧ 100 мкг/мл наблюдалась незначительная активация тромбоцитов (~7 % относительно контроля). Интересно, что такая же тенденция отмечалась и для пустых PLGA-плацебо НЧ. Полученные результаты коррелируют с данными других авторов, изучавших биосовместимость полилактидных наночастиц [19, 39, 41].

**Оценка гемолиза.** Тест определения гемолиза – это один из наиболее часто применяемых тестов для определения биосовместимости внутривенно введенных материалов с компонентами крови, характеризующийся наибольшей корреляцией с результатами экспериментов *in vivo* [40]. Параметром, определяющим гемолитическую активность НЧ, является их способность взаимодействовать с мембраной эритроцитов, изменять ее проницаемость и вызывать гемолиз. Повреждение мембраны эритроцитов может спровоцировать тяжелые физиологические последствия, такие как гемолитическая анемия, кроме того, высвободившийся гемоглобин является токсическим соединением для крови [43].

Из данных, представленных в табл. 4, видно, что пустые PLGA-плацебо НЧ не оказывали гемолитического воздействия после инкубации с образцами крови в течение 3 ч во всем диапазоне концентраций. Незначительное цитотоксическое воздействие Дох-PLGA НЧ на эритроциты было отмечено лишь для максимальной исследованной концентрации 100 мкг/мл, превышающей прогнозируемые концентрации при клиническом применении препарата. Полученные данные подтверждают результаты С. Fornaguera и соавт., показавших гемосовместимость PLGA НЧ различного состава [19].

**Таблица 4.** Процент гемолиза после инкубации крови с PLGA наночастиц, обогащенных доксорубицином, и PLGA-плацебо наночастиц в различных концентрациях

Table 4. Percentage of hemolysis after incubation of blood samples with Dox-PLGA NP and PLGA-placebo NP in different concentration

Образец Sample	Концентрация НЧ, мкг/мл Nanoparticles concentration, $\mu$ g/ml	Гемолиз, % Hemolysis, %
PLGA-плацебо PLGA-Placebo	1	0,17
	10	0,41
	100	0,98
Доксорубицин-PLGA Dox-PLGA	1	0,55
	10	1,25
	100	6,98

### Изучение интернализации наночастиц

Было выявлено, что Dox-PLGA-Cy5.5 и PLGA-DiI НЧ активно захватываются клетками глиобластомы U87MG, при этом PLGA-Cy5.5 НЧ, нагруженные доксорубицином (Dox-PLGA-Cy5.5), более эффективно интернализуются клетками по сравнению с PLGA НЧ, мечеными DiI. Так, через 1 ч инкубации было обнаружено 50 % PLGA-DiI-положительных клеток, тогда как при инкубации клеток с Dox-PLGA-Cy5.5 НЧ в той же концентрации количество Cy5.5-положительных клеток достигало 90 %. То есть PLGA-DiI НЧ с большим отрицательным зарядом (-30,8 мВ) менее эффективно захватываются клетками, чем более нейтральные Dox-PLGA-Cy5.5 НЧ (-14,9 мВ), в которых доксорубин частично компенсирует отрицательный заряд полимера. Действительно, согласно данным литературы положительно заряженные частицы более эффективно связываются с отрицательно заряженной клеточной мембраной [27, 44, 45]. В свою очередь, интенсивность флуоресценции и концентрация Cy5.5/DiI-положительных клеток увеличивалась со временем (рис. 5).

### Заключение

В настоящей работе продемонстрировано отсутствие цитотоксического действия PLGA-плацебо НЧ на клеточные линии LLC-PK и HEPG2. При инкубации клеток глиобластомы человека U87MG и гепатоцеллюлярной карциномы HEPG2 как с субстанцией, так и с наносомальной формой доксорубина, наблюдалось достоверное снижение жизнеспособности клеток; при этом цитотоксический эффект

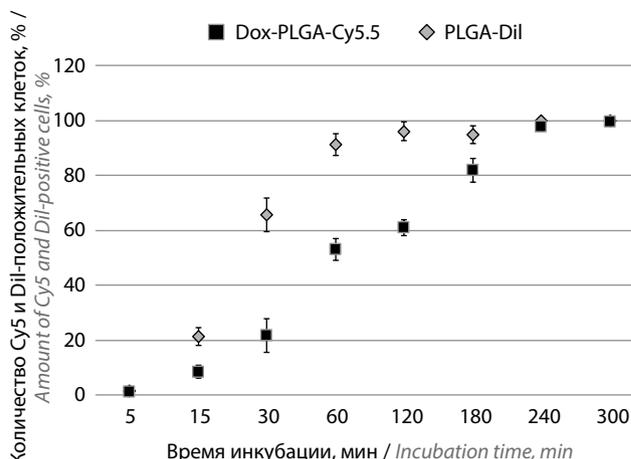


Рис. 5. Относительное содержание Cy5.5 и DiI-положительных клеток U87MG (%) в зависимости от времени их инкубации с наночастицами; концентрация наночастиц — 40 мкг/мл (среднее значение  $\pm$  SD; n = 3)

Fig. 5. Percentage of Cy5.5 and DiI-positive U87MG (%) cells depending on cell incubation time with NP; NP concentration 40 mcg/ml (mean  $\pm$  SD; n = 3)

доксорубина, высвободившегося из НЧ, был сравним с действием субстанции доксорубина. Результаты проточной цитометрии показали, что наносомальная форма доксорубина активно захватывается клетками глиобластомы человека.

Исследования гемосовместимости подтвердили безопасность применения Dox-PLGA НЧ: НЧ не оказывали влияния на свертывающую систему крови (не изменяли время свертывания плазмы крови, не индуцировали активацию тромбоцитов) и не оказывали цитотоксического воздействия на эритроциты.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербakov А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины. Иммунология 2014;35(6):317–21. [Afanasyeva D.A., Baryshnikova M.A., Shcherbakov A.I. et al. The development of anticancer liposomal vaccine model. Immunologiya = Immunology 2014;35(6):317–21 (In Russ.)].
- Weissig V., Pettinger T.K., Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. Int J Nanomedicine 2014;9:4357–73. DOI: 10.2147/IJN.S46900.
- Pathak Y., Thassu D. Drug delivery nanoparticles formulation and characterization. Boca Raton, USA, CRC Press, 2009, 416 p.
- Wang A.Z., Langer R., Farokhzad O.C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. Annu Rev Med 2012;63(1):185–98. DOI: 10.1146/annurev-med-040210-162544.
- Makadia H.K., Siegel S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. Polymers (Basel) 2011;3(3):1377–97. DOI: 10.3390/polym3031377.
- Lü J.M., Wang X., Marin-Muller C. et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. Expert Rev Mol Diagn 2009;9(4):325–41. DOI: 10.1586/erm.09.15.
- Mundargi R.C., Babu V.R., Rangaswamy V. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Control Release 2008;125(3):193–209. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.09.013.
- Shive M.S., Anderson J.M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Adv Drug Deliv Rev 1997;28(1):5–24. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00048-3.
- Szymonowicz M., Rybak Z., Witkiewicz W. et al. *In vitro* hemocompatibility studies of poly-(L-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide) as materials for bioresorbable stents manufacture. Acta Bioeng Biomech 2014;16(4):131–9. DOI: 10.5277/ABB-00055-2014-03.
- Landes C.A., Ballon A., Roth C. Maxillary and mandibular osteosyntheses with PLGA and P(L/DL)LA implants: a 5-year inpatient biocompatibility and degradation experience. Plast Reconstr Surg 2006;117(7):2347–60. DOI: 10.1097/01.prs.0000218787.49887.73.

11. Mau L.P., Cheng C.W., Hsieh P.Y., Jones A.A. Biological complication in guided bone regeneration with a poly-lactic acid membrane: a case report. *Implant Dent* 2012;21(3):171–4. DOI: 10.1097/ID.0b013e31824eece1.
12. Майбородин И.В., Кузнецова И.В., Береговой Е.А и др. Отсутствие полной резорбции полилактидного материала в организме. *Новости хирургии* 2014;22(1):26–32. [Maiborodin I.V., Kuznetsova I.V., Beregovoy E.A. et al. Absence of complete resorption of polylactide material in the organism. *Novosti khirurgii = Surgery News* 2014;22(1):26–32. (In Russ.)].
13. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P.V. An overview of poly(lactic-co-glycolic)acid(PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2014;15(3):3640–59. DOI: 10.3390/ijms15033640.
14. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;93:52–79. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
15. Tariq M., Alam M.A., Singh A.T. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for oral delivery of epirubicin: *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* investigations. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;128:448–56. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.043.
16. Derakhshandeh K., Soheili M., Dadashzadeh S., Saghiri R. Preparation and *in vitro* characterization of 9-nitrocamptothecin-loaded long circulating nanoparticles for delivery in cancer patients. *Int J Nanomedicine* 2010;5:463–71. DOI: 10.2147/IJN.S11586.
17. Derakhshandeh K., Hosseinalizadeh A., Nikmohammadi M. The effects of PLGA microparticles on intestinal absorption of p-glycoprotein substrate using the everted rat intestinal sac model. *Arch Pharm Res* 2011;34(11):1989–97. DOI: 10.1007/s12272-011-1120-1.
18. Sobot D., Mura S., Couvreur P. Nanoparticles: Blood Components interaction. *Encyclopedia of polymeric nanomaterials*, 2015, 1352 p. DOI: 10.1007/978-3-642-29648-2\_227.
19. Fornaguera C., Caldero G., Mitjans M. et al. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale* 2015;7(14):6045–58. DOI: 10.1039/c5nr00733j.
20. Kim D., El-Shall H., Dennis D., Morey T. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;40(2):83–91. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.007.
21. Fornaguera C., Solans C. Methods for the *in vitro* characterization of nanomedicines – biological component interaction. *J Pers Med* 2017;7(1):2. DOI: 10.3390/jpm7010002.
22. Rahimian S., Fransen M.F., Kleinvink J.W. et al. Particulate systems based on poly(lactic-co-glycolic)acid(PLGA) for immunotherapy of cancer. *Curr Pharm Des* 2015;21(29):4201–16. DOI: 10.2174/1381612821666150901100247.
23. Desai N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J* 2012;14(2):282–95. DOI: 10.1208/s12248-012-9339-4.
24. Gelperina S., Maksimenko O., Khalansky A. et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74(2):157–63. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003.
25. Wohlfart S., Khalansky A.S., Gelperina S. et al. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PLoS one* 2011;6(5):e19121. DOI: 10.1371/journal.pone.0019121.
26. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004;377(1):159–69. DOI: 10.1042/BJ20031253.
27. Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(17):2873–96. DOI: 10.1007/s00018-009-0053-z.
28. Fehrenbacher N., Jäättelä M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2005;65(8):2993–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0476.
29. Ilyinskaya A.N., Dobrovolskaia M.A. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomedicine* 2013;8(6):969–81. DOI: 10.2217/nmm.13.49.
30. Gunness P., Aleksa K., Kosuge K. et al. Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88(4):448–55. DOI: 10.1139/y10-023.
31. Ramirez T., Strigun A., Verlohner A. et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics *in vitro* in HepG2 cells. *Arch Toxicol* 2018;92(2):893–906. DOI: 10.1007/s00204-017-2079-6.
32. Wolff J.E., Trilling T., Mölenkamp G. et al. Chemosensitivity of glioma cells *in vitro*: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125(8–9):481–6. DOI: 10.1007/s004320050305.
33. Clark M.J., Homer N., O'Connor B.D. et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet* 2010;6(1):e1000832. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000832.
34. Chittasupho C., Xie S.X., Baoum A. et al. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. *Eur J Pharm* 2009;37(2):141–50. DOI: 10.1016/j.ejps.2009.02.008.
35. Lundqvist M., Stigler J., Elia G. et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(38):14265–70. DOI: 10.1073/pnas.0805135105.
36. Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(6):428–37. DOI: 10.1016/j.addr.2009.03.009.
37. Oslakovic C., Cedervall T., Linse S., Dahlbäck B. Polystyrene nanoparticles affecting blood coagulation. *Nanomedicine* 2012;8(6):981–6. DOI: 10.1016/j.nano.2011.12.001.
38. Neun B.W., Dobrovolskaia M.A. Method for *in vitro* analysis of nanoparticle thrombogenic properties. *Methods Mol Biol* 2011;697:225–35. DOI: 10.1007/978-1-60327-198-1\_24.
39. Li X., Radomski A., Corrigan O.I. et al. Platelet compatibility of PLGA, chitosan and PLGA-chitosan nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 2009;4(7):735–46. DOI: 10.2217/nmm.09.65.
40. Jackson S.P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007;109(12):5087–95. DOI: 10.1182/blood-2006-12-027698.
41. Cenni E., Granchi D., Avnet S. et al. Biocompatibility of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials* 2008;29(10):1400–11. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.022.
42. Merten M., Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000;102(16):1931–6. DOI: 10.1161/01.CIR.102.16.1931.
43. Bosi S., Feruglio L., da Ros T. et al. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *J Med Chem* 2004;47(27):6711–5. DOI: 10.1021/jm0497489.

44. Bannunah A.M., Vlasaliu D., Lord J., Stolnik S. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol Pharm* 2014;11(12):4363–73. DOI: 10.1021/mp500439c.
45. Kumar R., Kulkarni A., Nabulsi J. et al. Facile synthesis of PEGylated PLGA nanoparticles encapsulating doxorubicin and its *in vitro* evaluation as potent drug delivery vehicle. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3(4):299–308. DOI: 10.1007/s13346-012-0124-9.

**Вклад авторов**

Ю.А. Малиновская: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;  
 Е.И. Коваленко: разработка дизайна исследования по изучению гемосовместимости, анализ полученных данных;  
 Т.С. Ковшова: физико-химический анализ наночастиц, изучение профиля высвобождения лекарственного вещества;  
 Н.С. Осипова: получение наночастиц с доксорубицином, разработка синтеза флуоресцентно-меченных наночастиц;  
 О.О. Максименко: разработка метода получения наночастиц-плацебо и наночастиц, нагруженных доксорубицином, оптимизация параметров наночастиц;  
 В.Ю. Балабаньян: анализ полученных данных;  
 В.А. Разживина: руководство доклиническими исследованиями наносомального доксорубицина, разработка и утверждение дизайна исследования;  
 М.В. Гречихина: разработка методики определения цитотоксичности наночастиц;  
 А.А. Бойко: разработка методики оценки влияния наночастиц на свертывающую систему крови, активацию тромбоцитов и оценку токсического действия наночастиц на эритроциты;  
 С.Э. Гельперина: общее руководство проектом, анализ полученных данных.

**Authors' contributions**

Yu.A. Malinovskaya: data collection and analysis, writing the manuscript;  
 E.I. Kovalenko: designing the study of hemocompatibility, data analysis;  
 T.S. Kovshova: physicochemical analysis of nanoparticles, studying a profile of drug release;  
 N.S. Osipova: obtaining nanoparticles with doxorubicin, developing synthesis of fluorescently-labeled nanoparticles;  
 O.O. Maksimenko: developing a method to obtain placebo nanoparticles and doxorubicin loaded nanoparticles, optimizing nanoparticle parameters  
 V.Yu. Balabanyan: data analysis;  
 V.A. Razzhivina: head of preclinical studies of nanosomal form of doxorubicin, developing and approving the study design;  
 M.V. Grechikhina: developing a method to determine nanoparticles cytotoxicity;  
 A.A. Boyko: developing a method to assess nanoparticles effect on blood coagulation system, platelet activation, and assessment of nanoparticles toxic effect on red blood cells;  
 S.E. Gelperina: head of the project, data analysis.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Ю.А. Малиновская/Yu.A. Malinovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9771-3992>  
 Е.И. Коваленко/E.I. Kovalenko: <https://orcid.org/0000-0001-8119-8247>  
 Т.С. Ковшова/T.S. Kovshova: <https://orcid.org/0000-0002-0398-4645>  
 Н.С. Осипова/N.S. Osipova: <https://orcid.org/0000-0002-2814-9064>  
 О.О. Максименко/O.O. Maksimenko: <https://orcid.org/0000-0002-1230-4680>  
 В.Ю. Балабаньян/V.Yu. Balabanyan: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>  
 С.Э. Гельперина/S.E. Gelperina: <https://orcid.org/0000-0003-1113-6715>  
 А.А. Бойко/A.A. Boiko: <https://orcid.org/0000-0002-8996-2905>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование проведено при поддержке Федеральной целевой программы «Фарма 2020» (Госконтракт № 13411.1008799.13.144).

**Financing.** This study was supported by the Federal target program “Pharma 2020” (Contract No 13411.1008799.13.144).

Статья поступила: 17.08.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 17.08.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.

# ВОЗРАСТНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СИСТЕМНОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНО-ОПЕРАБЕЛЬНЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И РАКОМ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА

А. И. Черткова, Т. Н. Заботина, В. Т. Циклаури, Е. Н. Захарова, Д. В. Табаков, А. А. Борунова, Э. К. Шоуа, И. А. Задеренко, И. К. Воротников, А. М. Мудунов, З. Г. Кадагидзе

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

Контакты: Татьяна Николаевна Заботина [tatzabotina@yandex.ru](mailto:tatzabotina@yandex.ru)

**Введение.** Возраст — это важный клинико-патологический фактор у онкологических пациентов. Злокачественные опухоли чаще развиваются у лиц старшего возраста, но заболевание у них протекает менее агрессивно, чем у молодых пациентов. По мнению различных авторов, влияние возраста на развитие опухолей в значительной степени обусловлено возрастными особенностями иммунной системы.

**Цель исследования** — определение взаимосвязи показателей системного противоопухолевого иммунного ответа и возраста больных первично-операбельным раком молочной железы (ПО РМЖ) и раком слизистой оболочки полости рта (РСОПР).

**Материалы и методы.** В исследование были включены больные со всеми подтипами ПО РМЖ ( $n = 145$ ) и больные РСОПР ( $n = 29$ ). Проводилось иммунофенотипирование лимфоцитов периферической крови с использованием широкой панели моноклональных антител к маркерам клеток адаптивного и врожденного иммунитета.

**Результаты.** У больных ПО РМЖ 40 лет и старше до лечения процент активированных  $CD25^+$ -лимфоцитов,  $CD4^+CD25^+$ - и  $CD3^+CD4^+$ -Т-клеток, NKT-клеток, активированных  $HLA-DR^+$ -лимфоцитов, включая активированные  $CD3^+HLA-DR^+$ -Т-клетки, был статистически значимо выше, чем у больных моложе 40 лет. У пациенток этой группы наблюдалось повышение по сравнению с контрольной группой процента цитотоксических Т-лимфоцитов  $CD8^+CD11b^+CD28^-$ , снижение числа «наивных» лимфоцитов ( $CD4^+CD62L^+$  и  $CD8^+CD11b^-CD28^+$ ), а также тенденция к снижению  $CD4^+CD25^+CD127^-$ -Т<sub>рег</sub> на фоне увеличения числа  $CD4^+CD25^+$ -Т-клеток. У больных РСОПР выявлены увеличение с возрастом количества клеток некоторых популяций эффекторного звена иммунитета и снижение числа лимфоцитов-супрессоров.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют предположить, что возрастные различия в состоянии системного противоопухолевого иммунного ответа вносят свой вклад в более благоприятное течение РМЖ и некоторых других злокачественных новообразований у лиц старшего возраста. Очевидно, что особенности возрастных различий в иммунном ответе на опухоль необходимо учитывать при назначении системной терапии, включая иммунотерапию.

**Ключевые слова:** первично-операбельный рак молочной железы, рак слизистой оболочки полости рта, возраст, субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-81-88



## AGE-RELATED FEATURES OF SYSTEMIC ANTITUMOR IMMUNE RESPONSE IN PATIENTS WITH PRIMARY OPERABLE BREAST CANCER AND CANCER OF THE ORAL MUCOSA

A. I. Chertkova, T. N. Zabolina, V. T. Tsiklauri, E. N. Zakharova, D. V. Tabakov, A. A. Borunova, E. K. Shoua, I. A. Zaderenko, I. K. Vorotnikov, A. M. Mudunov, Z. G. Kadagidze

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

**Introduction.** Age is considered as an important clinical and pathological factor in cancer patients. Malignant tumors are more likely to develop in older people, but the disease is less aggressive than in young patients. According to various authors, the influence of age on the development of tumors largely depends on the age-related features of the immune system.

**The aim** of the present study was to determine the relationship of indicators of systemic antitumor immune response with the age of patients with primary operable breast cancer and cancer of the oral mucosa.

**Materials and methods.** The study included patients with all subtypes of primary-operable breast cancer ( $n = 145$ ) and patients with cancer of the oral mucosa ( $n = 29$ ). Immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes was performed using a wide panel of monoclonal antibodies to markers of adaptive and innate immunity cells.

**Results.** In elder patients (40 years and older) with primary-operable breast cancer, the percentage of activated CD25<sup>+</sup> lymphocytes and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, NKT cells, activated HLA-DR<sup>+</sup> lymphocytes, including activated CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T cells before treatment, was statistically significantly higher than in patients younger than 40 years. Patients of this group showed increase of CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> CTLs and a decrease in the number of naive lymphocytes (CD4<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup>) in comparison with control percentage, and the downward trend in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> T<sub>reg</sub>, with increased numbers of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. In patients with cancer of the oral mucosa, an increase in the number of cells of some populations of the immune effector link and a decrease in the number of suppressor lymphocytes were revealed with age.

**Conclusion.** The results suggest that age-related differences in the state of systemic antitumor immune response contribute to a more favorable course of breast cancer and some other malignancies in older persons. It is obvious that the features of age differences in the immune response to the tumor should be taken into account when prescribing systemic therapy, including immunotherapy.

**Key words:** primary operable breast cancer, cancer of the oral mucosa, age, subpopulation of peripheral blood lymphocytes

## Введение

Возраст человека влияет на частоту возникновения злокачественных опухолей, а также на характер течения заболевания и переносимость системной противоопухолевой терапии, поэтому рассматривается как важный клинико-патологический фактор у онкологических больных. Известно, что с увеличением возраста растет частота заболеваний. Так, рак молочной железы (РМЖ) у женщин старше 40 лет возникает гораздо чаще, чем у более молодых [1]. Раком полости рта, по данным многоцентрового исследования, также чаще всего болеют люди в возрасте 50–80 лет (81,26 %), хотя нередко опухоли возникают и у тех, кто моложе [2]. В то же время у лиц старшего возраста отмечается менее агрессивное течение опухолевого процесса, чем у молодых пациентов. По мнению многих авторов, влияние возраста на развитие опухолей в значительной степени зависит от возрастных особенностей иммунной системы — одного из важнейших факторов, контролирующих опухолевый рост и влияющих на клиническую эффективность различных видов противоопухолевой терапии [3–7]. Иммунная система реагирует на опухолевый рост как на локальном, так и на системном уровне, и циркулирующие иммунные клетки наряду с лимфоцитами, инфильтрирующими опухоль, имеют прогностическое значение [8, 9]. Безусловно, опухолевый рост модулирует иммунный ответ на чужеродные и аутоантигены, это касается как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Однако возрастные различия иммунного ответа, по-видимому, сохраняются. В настоящее время взаимосвязь между исходным состоянием (до лечения) системного иммунитета и возрастом пациентов при РМЖ и раке слизистой оболочки полости рта (РСОПР) остается недостаточно изученной. По этой причине изучение субпопуляционного состава периферической крови (ПК) у больных первично-операбельным РМЖ (ПО РМЖ) и РСОПР разных возрастных групп до лечения является актуальным, а полученные результаты могут послужить основой для дифференцированного подхода к назначению системного противоопухолевого

лечения с учетом различий в иммунном ответе на опухоль у больных разного возраста.

**Цель исследования** — определение взаимосвязи показателей системного иммунного ответа на опухолевый рост и возраста больных ПО РМЖ и РСОПР.

**Задачи исследования** — проведение сравнительного исследования субпопуляционного состава лимфоцитов ПК больных ПО РМЖ и здоровых доноров 2 возрастных групп (моложе 40 лет и 40 лет и старше); определение характера взаимосвязи субпопуляционного состава лимфоцитов ПК с возрастом у больных РСОПР.

## Материалы и методы

В исследование были включены больные со всеми подтипами ПО РМЖ ( $n = 145$ ). Медиана возраста составила 54 года (от 18 лет до 81 года): моложе 40 лет — 10 пациенток (1-я группа), 40 лет и старше — 135 пациенток (2-я группа). В группы контроля вошли практически здоровые женщины ( $n = 39$ ) до 40 лет (группа А) и 40 лет и старше (группа Б).

**Рак слизистой оболочки полости рта.** В исследование были включены 29 человек (14 женщин и 15 мужчин). У 18 пациентов был диагностирован рак языка, у 9 — РСОПР и у 2 — первично-множественное злокачественное образование. Медиана возраста пациентов составила 43,5 года (от 15 до 84 лет). В контрольной группе были здоровые доноры соответствующего пола и возраста ( $n = 77$ ; от 18 до 71 года). Все пациенты дали информированное согласие на проведение иммунологического обследования. Все исследования проводили до начала лечения. Для определения состояния системного иммунитета проводилось иммунофенотипирование лимфоцитов ПК на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur (BD Biosciences, США). Лимфоциты выделяли по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Определяли процентное содержание клеток адаптивного и врожденного иммунитета в составе лимфоцитов ПК путем 2-, 3- и 4-цветного окрашивания клеток с использованием панели моноклональных антител (BD Biosciences, Becton

Coulter) к поверхностным маркерам лимфоцитов CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD28, CD11b, HLA-DR, CD19, CD25, CD127 и внутриклеточному антигену перфорину (Perforin). Цитотоксический потенциал (ЦТП) CD16<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов оценивали как процент Perforin-положительных клеток в составе соответствующей популяции. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 7,0. Характер распределения показателей определяли с помощью критериев Шапиро–Уилка или Колмогорова–Смирнова. Результаты представлены в виде медианы (Me) и квартилей (25-й и 75-й процентиля). Для оценки статистической значимости различия показателей использовали непараметрический двусторонний U-критерий Манна–Уитни. Связь между показателями устанавливали с помощью корреляционного анализа Спирмена: результаты представлены в виде коэффициента корреляции ( $\rho$ ) и 95 % доверительного интервала (95 % ДИ). 95 % ДИ для коэффициентов корреляции рассчитывали с помощью программы Excel в соответствии с рекомендациями А. Бююля и П. Цёфеля [10]. Уровень статистической значимости учитывали при  $p = 0,05$ .

### Результаты исследования

В табл. 1 представлены результаты, полученные при сравнении субпопуляционного состава лимфоцитов ПК пациенток с ПО РМЖ 2 возрастных групп между собой и с женщинами соответствующего возраста из контрольной группы (в таблицу включены только субпопуляции лимфоцитов, в которых наблюдались статистически значимые различия). Изменения субпопуляционного состава лимфоцитов ПК, связанные с возрастом, были обнаружены и у пациенток с ПО РМЖ, и у лиц контрольной группы, однако они были в большинстве случаев различны и касались не всех популяций лимфоцитов. Совпадение наблюдалось только для 2 популяций: клеток, экспрессирующих активационный маркер CD25, и активированных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Т-клеток. Процент активированных CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов, включая CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-популяцию, был статистически значимо выше у больных 2-й группы. Подобное возрастное различие этих показателей было обнаружено и в контрольной группе, в которой повышение возраста сопровождалось также статистически значимым увеличением ЦТП как CD16<sup>+</sup>-, так и CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. У пациентов эти различия отсутствовали. Возрастные различия у больных ПО РМЖ были обнаружены для следующих популяций лимфоцитов: процент CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- и активированных CD3<sup>+</sup>HLA-DR-Т-клеток, общее число активированных лимфоцитов HLA-DR<sup>+</sup>, процент НКТ-клеток и величина соотношения CD4/CD8 были статистически значимо выше у больных старшего возраста, а процент «наивных» и клеток памя-

ти CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> – у более молодых женщин. При изучении отклонений иммунологических показателей больных ПО РМЖ от контрольных значений отмечено как их сходство, так и различие между группами пациенток разного возраста. Статистически значимое снижение общего числа CD3<sup>+</sup>-Т-клеток и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Т-клеток наблюдалось у больных обеих групп, однако в случае CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов снижение было более выраженным в 1-й группе ( $p_{1,2} = 0,000$ ). Статистически значимое снижение числа CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой наблюдалось у пациенток 2-й группы. Количество CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-лимфоцитов было выше нормы у пациенток обеих возрастных групп. Кроме того, отмечено некоторое различие в отклонении от контрольных показателей в процентном содержании CD8<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>-лимфоцитов у больных моложе 40 лет и 40 лет и старше. У лиц младше 40 лет процент этих клеток статистически значимо превышал контрольные значения, однако различия между 2 возрастными группами пациенток отсутствовали. Что касается клеток врожденного иммунитета, то процент НК-клеток, экспрессирующих CD8 (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>), был статистически значимо выше в обеих группах по сравнению с контрольной. Процент НКТ-клеток у пациенток 40 лет и старше был статистически значимо выше не только по сравнению с более молодыми женщинами, но и превышал контрольные значения. У пациенток моложе 40 лет процент CD16<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>-клеток и их ЦТП были выше контрольных показателей, но различий со значениями 2-й группы не было. Следует отметить, что, хотя процент активированных HLA-DR<sup>+</sup>-лимфоцитов в обеих группах не отличался от данных контрольной группы, в 1-й, как было указано ранее, их количество было статистически значимо ниже, чем во 2-й. Такого различия между возрастными показателями в контрольной группе не наблюдалось. Количество регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Т-клеток было ниже, чем у здоровых, только у лиц старшей группы, хотя различия между группами отсутствовали.

Результаты, полученные при определении характера взаимосвязи субпопуляционного состава лимфоцитов ПК и возраста у больных РСОР, представлены в табл. 2.

В контрольной группе с увеличением возраста незначительно повышался процент CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>-лимфоцитов и ЦТП CD8<sup>+</sup>-клеток и снижалось количество НК-клеток. В то же время у пациентов с возрастом изменялось значительно большее число показателей. Отмечена средняя положительная корреляция с ЦТП CD8<sup>+</sup>-клеток и процентом CD16<sup>+</sup>Perforin<sup>+</sup>-НК-клеток, а также слабая положительная корреляция с CD16<sup>+</sup>-, CD11b<sup>+</sup>-лимфоцитами и цитотоксическими Т-лимфоцитами CD8<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>.

**Таблица 1.** Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови больных первично-операбельным раком молочной железы 2 возрастных групп

**Table 1.** Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in patients primary operable breast cancer of two age groups

Субпопуляции лимфоцитов периферической крови Subpopulation of peripheral blood lymphocytes	Пациенты с ПО РМЖ Patients primary operable breast cancer		$p_{1-2}$	Контрольная группа Control group		$p_{3-4}$	$p_{1-A}$	$p_{2-B}$
	1-я группа ( $<40$ лет; $n = 10$ ) Group 1 ( $<40$ years old; $n = 10$ )	2-я группа ( $\geq 40$ лет; $n = 135$ ) Group 2 ( $\geq 40$ years old; $n = 135$ )		Группа А ( $<40$ лет; $n = 16$ ) Group A ( $<40$ years old; $n = 16$ )	Группа Б ( $\geq 40$ лет; $n = 21$ ) Group B ( $\geq 40$ years old; $n = 21$ )			
	Ме (квартили) Me (quartiles)			Ме (квартили) Me (quartiles)				
CD3 <sup>+</sup>	62,6 (48,6; 65,3)	70,5 (58,0; 77,0)		73,4 (66,0; 81,2)	75,0 (71,4; 80,0)		0,023	0,015
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	22,9 (17,5; 26,5)	35,3 (29,5; 43,7)	0,000	41,0 (34,2; 44,0)	40,9 (38,7; 51,8)		0,001	0,002
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	23,3 (19,4; 31,9)	23,4 (16,0; 30,5)		29,7 (26,5; 31,6)	28,7 (24,6; 31,9)		0,097	0,036
CD3 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	16,8 (13,2; 18,3)	11,0 (6,8; 15,5)		6,8 (5,0; 11,0)	8,0 (5,9; 9,0)		0,002	0,009
CD3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup>	3,6 (1,0; 4,9)	5,4 (3,3; 9,9)	0,016	4,7 (3,6; 5,6)	7,2 (5,0; 9,2)		0,097	0,359
HLA-DR	9,6 (8,3; 12,4)	14,4 (10,6; 19,9)	0,006	12,6 (9,9; 16,7)	15,4 (12,1; 18,6)		0,135	0,901
CD3 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	9,2 (4,9; 11,0)	13,1 (8,3; 19,2)	0,045	9,0 (5,2; 14,3)	6,4 (5,0; 13,0)		0,979	0,003
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	21,8 (11,3; 26,6)	18,3 (12,6; 23,3)		9,7 (6,4; 12,5)	12,8 (8,0; 19,5)		0,003	0,036
CD4 <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup>	27,9 (26,0; 32,2)	22,9 (17,2; 28,0)	0,022	30,9 (25,4; 43,5)	28,1 (16,7; 40,0)		0,421	0,151
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	4,7 (2,2; 8,8)	9,2 (5,9; 13,8)	0,007	7,4 (5,3; 10,3)	10,2 (7,8; 16,7)	0,029	0,149	0,321
CD25 <sup>+</sup>	9,6 (7,7; 12,8)	15,6 (10,7; 21,5)	0,032	10,1 (5,3; 13,4)	14,6 (10,8; 19,6)	0,015	0,816	0,992
CD8 <sup>+</sup> CD16 <sup>+</sup>	13,3 (8,1; 19,8)	11,1 (6,8; 15,2)		5,9 (3,7; 8,5)	7,9 (4,9; 10,4)		0,002	0,040
CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	24,3 (15,1; 27,3)	17,7 (14,2; 23,9)		14,0 (11,8; 18,4)	18,7 (12,9; 22,2)		0,021	0,634
ЦТП CD16 СТР CD16	91,5 (89,5; 93,7)	91,7 (84,3; 96,0)		82,5 (77,5; 88,7)	93,8 (88,4; 96,6)	0,015	0,018	0,436
CD8 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup>	17,7 (15,8; 22,4)	17,5 (12,6; 22,1)		10,7 (8,4; 16,6)	13,9 (9,3; 18,4)		0,009	0,126
ЦТП CD8 СТР CD8	48,1 (36,7; 55,3)	53,2 (43,4; 63,9)		32,1 (25,7; 44,8)	42,2 (38,3; 53,3)	0,029	0,013	0,007
CD4/CD8	0,56 (0,38; 0,76)	0,98 (0,71; 1,37)	0,001	1,2 (0,87; 1,39)	1,2 (0,95; 1,59)		0,001	0,082
CD11b <sup>+</sup>	29,5 (19,0; 40,3)	34,8 (25,8; 45,9)		30,2 (27,3; 35,2)	24,2 (17,5; 34,6)		0,738	0,001
CD50 <sup>+</sup>	95,8 (92,4; 97,2)	97,0 (95,1; 98,4)		98,6 (98,0; 99,0)	95,4 (93,6; 98,5)	0,000	0,005	0,366
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	7,7 (6,8; 8,9)	7,2 (5,9; 8,8)		9,0 (7,7; 10,6)	9,6 (7,1; 10,1)		0,079	0,021
CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	60,9 (51,3; 73,0)	67,1 (52,3; 74,9)		60,2 (48,8; 86,0)	54,9 (48,4; 63,1)		1,000	0,035
CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup> CD28 <sup>+</sup>	22,9 (17,1; 25,2)	19,7 (13,4; 30,0)		28,5 (7,3; 32,5)	30,1 (27,1; 35,4)		0,905	0,021

**Примечание.** ПО РМЖ – первично-операбельный рак молочной железы; ЦТП – цитотоксический потенциал.  
Note. СТР – cytotoxic potential.

В то же время с увеличением возраста снижался (отрицательная корреляция) процент CD8<sup>+</sup>CD-11b<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-лимфоцитов.

### Обсуждение

Возраст человека – это важный клинико-патологический фактор, влияющий на частоту возникнове-

ния злокачественных опухолей, а также на характер течения заболевания и переносимость системной противоопухолевой терапии. Так, РМЖ у женщин старше 40 лет возникает значительно чаще, чем у более молодых женщин [11]. Раком полости рта, по данным многоцентрового исследования, также чаще всего болеют люди в возрасте 50–80 лет (81,26 %),

Таблица 2. Связь показателей системного иммунитета с возрастом у больных раком слизистой оболочки полости рта

Table 2. The relationship of systemic immunity with age in patients with cancer of the oral mucosa

Субпопуляции лимфоцитов периферической крови, % Subpopulation of peripheral blood lymphocytes, %	Пациенты с РСОРП (n = 29) Patients with cancer of the oral mucosa (n = 29)			Контрольная группа (n = 77) Control group (n = 77)		
	$\rho$	95 % ДИ 95 % CI	$p$	$\rho$	95 % ДИ 95 % CI	$p$
CD3-CD16 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,236	-0,160; 0,567	0,216	-0,233	-0,437; -0,006	0,043
CD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	-0,333	-0,634; -0,056	0,077	0,233	0,006; 0,437	0,044
ЦТП CD8 <sup>+</sup> СТР CD8 <sup>+</sup>	0,507	0,309; 0,663	0,005	0,281	0,063; 0,484	0,019
CD16 <sup>+</sup> -Perforin <sup>+</sup>	0,508	0,306; 0,666	0,004	-0,234	-0,438; -0,074	0,053
CD16 <sup>+</sup>	0,467	0,256; 0,635	0,011	-0,228	-0,433; -0,000	0,059
CD11b <sup>+</sup>	0,399	0,177; 0,582	0,032	-0,103	-0,323; 0,127	0,387
CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD28 <sup>-</sup>	0,397	0,134; 0,608	0,033	-0,094	-0,315; 0,136	0,512
CD8 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>	-0,536	-0,708; -0,303	0,003	-0,011	-0,238; 0,217	0,936
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	-0,397	-0,581; -0,175	0,033	-0,061	-0,284; 0,169	0,615

**Примечание.** РСОРП – рак слизистой оболочки полости рта; ЦТП – цитотоксический потенциал;  $\rho$  – коэффициент корреляции Спирмена; ДИ – доверительный интервал.

Note. СТР – cytotoxic potential;  $\rho$  – Spearman correlation coefficient; CI – confidence interval.

значительно реже случаи заболевания наблюдаются в более молодом возрасте [2]. С другой стороны, у лиц старшего возраста заболевание протекает менее агрессивно. В связи с этим оценка возрастных факторов у онкологических пациентов в настоящее время приобретает все большее значение. По мнению ряда авторов, различия в характере течения опухолевого процесса у лиц разного возраста в значительной степени зависят от возрастных особенностей иммунной системы [3, 4, 12]. Доказано, что иммунная система способна контролировать все этапы опухолевого роста: возникновение, рост и развитие, кроме того, она оказывает влияние на клиническую эффективность различных видов противоопухолевой терапии [5–7]. В ответ на опухолевый рост генерируется как системный, так и локальный иммунный ответ, и прогностическое значение имеют лимфоциты, инфильтрирующие опухоль, и циркулирующие иммунные клетки [8, 9, 13–17]. В настоящее время взаимосвязь между исходным состоянием системного иммунитета (субпопуляционный состав лимфоцитов ПК) и возрастом больных при злокачественных новообразованиях остается недостаточно изученной. В связи с этим исследование особенностей системного иммунного ответа на опухоль у больных ПО РМЖ и РСОРП разных возрастных групп, проведенное в настоящей работе, является актуальным, и очень важно его учитывать при назначении системного, в том числе иммунотерапевтического, противоопухолевого лечения больным разного возраста.

Безусловно, опухолевый рост модулирует системный иммунный ответ и может вызывать значительные изменения субпопуляционного состава лимфоцитов. Однако возрастные различия сохраняются, причем они могут существенно отличаться от изменений, характерных для здоровых лиц. Полученные в данной работе результаты показали, что субпопуляционный состав лимфоцитов ПК в определенной степени зависит от возраста и у здоровых женщин, и у больных ПО РМЖ. Но возрастные особенности системного иммунного ответа у онкологических больных отличаются от таковых у здоровых доноров (см. табл. 1 и 2). Основные совпадения с контрольной группой касались 3 клеточных популяций. При увеличении возраста и у здоровых доноров, и у больных ПО РМЖ повышалось количество CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Т-клеток, а число регуляторных CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>-Т-клеток (T<sub>рег</sub>) в составе CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-популяции оставалось на одном уровне. Таким образом, процент CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов с возрастом и в контрольной группе, и у больных пациенток повышался, скорее всего, за счет эффекторных активированных CD4<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов.

Повышение процента активированных CD25<sup>+</sup>-лимфоцитов и CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Т-клеток, обнаруженное у больных во 2-й группе, по-видимому, является благоприятным фактором при РМЖ. Известно, что молекула CD25 –  $\alpha$ -цепь рецептора интерлейкина 2 – играет ключевую роль в запуске пролиферативного ответа и дифференцировки Т-лимфоцитов [18]. Ранее

мы обнаружили, что исходное снижение количества  $CD25^+$ - и  $CD4^+CD25^+$ -Т-клеток ассоциировалось с увеличением вероятности прогрессирования заболевания у больных трижды негативным РМЖ [17]. У больных 40 лет и старше количество  $CD3^+CD4^+$ -Т- и  $NKT$ -клеток также было статистически значимо выше, чем у более молодых пациенток.  $CD4^+$ -Т-клетки играют важнейшую роль в противоопухолевом иммунном ответе. По данным ряда авторов, исходное количество  $CD4^+$ -клеток в ПК при различных злокачественных опухолях ассоциируется с благоприятным прогнозом заболевания [19, 20]. Было выявлено, что повышенное до лечения количество  $CD3^+CD4^+$ -Т-клеток ПК ассоциировалось с увеличением общей и безрецидивной выживаемости больных трижды негативным РМЖ [21].  $NKT$ -клетки могут оказывать как отрицательное, так и положительное влияние на противоопухолевый иммунный ответ [22]. В наших исследованиях у больных трижды негативным РМЖ повышение количества  $NKT$ -клеток в ПК до лечения ассоциировалось со снижением вероятности прогрессирования заболевания [17]. На увеличение активности системного иммунитета у больных 40 лет и старше указывает и обнаруженное только у них повышение по сравнению с показателями контрольной группы процента цитотоксических Т-лимфоцитов  $CD8^+CD11b^+CD28^-$ , а также снижение числа «наивных» лимфоцитов ( $CD4^+CD62L^+$  и  $CD8^+CD11b^-CD28^+$ ). Благоприятными факторами у больных 2-й группы оказались тенденция к снижению  $CD4^+CD25^+CD127^-T_{per}$  на фоне увеличения числа  $CD4^+CD25^+$ -Т-клеток и повышение количества активированных  $CD3^+HLA-DR^+$ -Т-лимфоцитов и других  $HLA-DR^+$ -клеток.  $HLA-DR^+$  является маркером поздней активации лимфоцитов, в частности Т-клеток, а увеличение в ПК числа лимфоцитов, экспрессирующих этот маркер, может являться одним из показателей продолжительной активации системного противоопухолевого иммунного ответа [11]. В то же время у более молодых пациенток отмечалось только повышение по сравнению с контрольной группой процента  $CD16^+Perforin^+$ - $NK$ -клеток, их ЦТП, а также процента  $CD8^+Perforin^+$ -лимфоцитов. Таким образом, обнаруженные различия в субпопуляционном составе лимфоцитов ПК у больных разных возрастных групп позволили предположить, что системный иммунный ответ у пациенток 40 лет и старше (2-я группа) значительно более выражен, чем у больных моложе 40 лет.

Это предположение в определенной степени подтверждается результатами, полученными у больных РСОР (см. табл. 2). У обследованной группы пациентов повышение возраста ассоциировалось с увеличением количества клеток эффекторных популяций лимфоцитов ПК:  $CD16^+$  и  $CD16^+Perforin^+$ - $NK$ -клеток,  $CD11b$ -экспрессирующих лимфоцитов (эта молекула экспрессируется на клетках-эффекторах с высокой цитотоксической активностью) и цитотоксических  $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -Т-клеток, а также с увеличением ЦТП  $CD8^+$ -лимфоцитов [23, 24]. С другой стороны, возраст пациентов отрицательно коррелировал с количеством  $CD8^+CD11b^+CD28^+$ -Т-клеток («наивные»/клетки памяти) и супрессорных  $CD4^+CD25^+CD127^-$ -Т-клеток (см. табл. 2). Можно предположить, что повышение значимости эффекторного звена иммунитета у больных старшего возраста в определенной степени связано со снижением активности клеток-супрессоров. В настоящее время причины возрастных различий в состоянии системного противоопухолевого иммунного ответа до конца не ясны, однако можно предположить, что они вносят свой вклад в более благоприятное течение РМЖ и некоторых других злокачественных новообразований у лиц старшего возраста.

#### Заключение

Оценка биологического возраста онкологических пациентов приобретает все большее значение, поскольку с годами иммунная система человека претерпевает определенные изменения. Опухолевый рост модулирует иммунный ответ на чужеродные и аутоантигены, и хотя возрастные различия в состоянии иммунной системы сохраняются, они могут существенно отходить от нормы. Это касается как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Безусловно, проблема взаимосвязи возраста и противоопухолевого иммунного ответа, а также характера течения опухолевого процесса требует дальнейших исследований как системного, так и местного иммунитета у лиц разного возраста. Очевидно, что особенности возрастных различий в иммунном ответе на опухоль следует учитывать при назначении системной терапии, в том числе иммунотерапии. В связи с этим проведенное в настоящем исследовании изучение особенностей системного иммунного ответа на опухоль у больных РМЖ и РСОР разных возрастных групп может внести определенный вклад в повышение эффективности и безопасности системного лечения онкологических пациентов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kataoka A., Iwamoto T., Tokunaga E. et al. Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. *Breast Cancer Res Treat* 2016;160(1):163–72. DOI: 10.1007/s10549-016-3984-8.
- Dhanuthai K., Rojanawatsirivej S., Thosaporn W. et al. Oral cancer: a multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2018;23(1):23–9. DOI: 10.4317/medoral.21999.
- Stervbo U., Meier S., Mälzer J.N. et al. Effects of aging on human leukocytes (part I): immunophenotyping of innate immune cells. *Age (Dordr)* 2015;37(5):92. DOI: 10.1007/s11357-015-9828-3.
- Stervbo U., Bozzetti C., Baron U. et al. Effects of aging on human leukocytes (part II): immunophenotyping of adaptive immune B and T cell subsets. *Age (Dordr)* 2015;37(5):93. DOI: 10.1007/s11357-015-9829-2.
- Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39(1):1–10. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.
- Kepp O., Senovilla L., Kroemer G. Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. *Oncotarget* 2014;5(14):5190–1. DOI: 10.18632/oncotarget.2266.
- Muraro E., Furlan C., Avanzo M. et al. Local high-dose radiotherapy induces systemic immunomodulating effects of potential therapeutic relevance in oligometastatic breast cancer. *Front Immunol* 2017;8:1476. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01476.
- Standish L.J., Sweet E.S., Novack J. et al. Breast cancer and the immune system. *J Soc Integr Oncol* 2008;6(4):158–68.
- Péguillet I., Milder M., Louis D. et al. High numbers of differentiated effector CD4 T cells are found in patients with cancer and correlate with clinical response after neoadjuvant therapy of breast cancer. *Cancer Res* 2014;74(8):2204–16. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-2269.
- Бююль А., Цёфель П. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей. СПб.: ДиаСофтЮП, 2005. 608 с. [Buul A., Cefel P. SPSS: art of information processing. Analysis of statistical data and recovery of hidden patterns. St. Petersburg: Diasoftyup, 2005. 608 p. (In Russ.)].
- Melichar B., Toušková M., Dvořák J. et al. The peripheral blood leukocyte phenotype in patients with breast cancer: effect of doxorubicin/paclitaxel combination chemotherapy. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001;23(2):163–73. DOI: 10.1081/IPH-100103857.
- Gravekamp C., Chandra D. Aging and cancer vaccines. *Crit Rev Oncog* 2013;18(6):585–95. DOI: 10.1615/critrevoncog.2013010588.
- Schnell A., Schmid C., Herr W., Siska P.J. The peripheral and intratumoral immune cell landscape in cancer patients: a proxy for tumor biology and a tool for outcome prediction. *Biomedicines* 2018;6(1):25. DOI: 10.3390/biomedicines6010025.
- He Q., Li G., Ji X. et al. Impact of the immune cell population in peripheral blood on response and survival in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer. *Tumour Biol* 2017;39(5):1010428317697571. DOI: 10.1177/1010428317697571.
- Spitzer M.H., Carmi Y., Reticker-Flynn N.E. et al. Systemic immunity is required for effective cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168(3):487–502.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.022.
- Cheng H., Luo G., Lu Y. et al. The combination of systemic inflammation-based marker NLR and circulating regulatory T cells predicts the prognosis of resectable pancreatic cancer patients. *Pancreatol* 2016;16(6):1080–4. DOI: 10.1016/j.pan.2016.09.007.
- Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К. и др. Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом: связь с эффективностью химиотерапии. *Медицинская иммунология* 2018;20(5):667–80. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680. [Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K. et al. The main parameters of cellular immunity in patients with breast cancer with triple negative phenotype: relationship with the effectiveness of chemotherapy. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology* 2018;20(5):667–80. (In Russ.)].
- Benczik M., Gaffen S.L. The interleukin (IL)-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes. *Immunol Invest* 2004;33(2):109–42. DOI: 10.1081/IMM-120030732.
- Trédan O., Manuel M., Clapissin G. et al. Patients with metastatic breast cancer leading to CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia have poor outcome. *Eur J Cancer* 2013;49(7):1673–82. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.028.
- Péron J., Cropet C., Trédan O. et al. CD4 lymphopenia to identify end-of-life metastatic cancer patients. *Eur J Cancer* 2013;49(5):1080–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.003.
- Черткова А.И., Славина Е.Г., Окружная М.А. и др. Эффекторные и регуляторные Т-лимфоциты периферической крови больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом: связь с клиническим эффектом химиотерапии. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина* 2016;27(2):89–97. [Chertkova A.I., Slavina E.G., Okruzhnova M.A. et al. Effector and regulatory T-lymphocytes of peripheral blood of breast cancer patients with triple negative phenotype: relationship with the clinical effect of chemotherapy. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin RCRC* 2016;27(2):89–97. (In Russ.)].
- Terabe M., Berzofsky J.A. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res* 2008;101:277–348. DOI: 10.1016/S0065-230X(08)00408-9.
- McFarland H.I., Nahill S.R., Maciaszek J.W., Welsh R.M. CD11b (Mac-1): a marker for CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol* 1992;149(4):1326–33.
- Fu B., Tian Z., Wei H. Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* 2014;141(4):483–9. DOI: 10.1111/imm.12224.

**Вклад авторов**

А.И. Черткова: научная интерпретация данных, написание текста рукописи;  
Т.Н. Заботина: написание текста рукописи, научное редактирование статьи;  
В.Т. Циклаури, И.А. Задеренко: получение клинических данных и участие в их анализе, предоставление материалов исследования;  
Е.Н. Захарова, А.А. Борунова: анализ полученных данных;  
Д.В. Табаков: анализ полученных данных, перевод;  
Э.К. Шоуа: получение данных для анализа;  
И.К. Воротников, А.М. Мудунов: разработка дизайна исследования, утверждение окончательного варианта статьи, участие в анализе клинических данных и обсуждении рукописи;  
З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение рукописи, редактирование статьи.

**Author's contributions**

A.I. Chertkova: scientific interpretation of data, writing the manuscript;  
T.N. Zabolina: writing the manuscript, scientific editing of an article;  
V.T. Tsiklauri, I.A. Zaderenko: obtaining clinical data and participating in their analysis, providing research materials;  
E.N. Zakharova, A.A. Borunova: analysis of the obtained data;  
D.V. Tabakov: analysis of the obtained data, translation;  
E.K. Shoua: obtaining data for analysis;  
I.K. Vornikov, A.M. Mudunov: developing the research design, approving final version of the article, analyzing clinical data, article discussion and editing;  
Z.G. Kadagidze: reviewing of publications of the article's theme, article discussion and editing.

**ORCID авторов/ ORCID of authors**

А.И. Черткова/A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>  
Т.Н. Заботина/T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>  
В.Т. Циклаури/V.T. Tsiklauri: <https://orcid.org/0000-0002-3090-695X>  
Е.Н. Захарова/E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>  
Д.В. Табаков/D.V. Tabakov: <https://orcid.org/0000-0002-1509-2206>  
А.А. Борунова/A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>  
Э.К. Шоуа/E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>  
И.А. Задеренко/I.A. Zaderenko: <https://orcid.org/0000-0003-0183-4827>  
А.М. Мудунов/A.M. Mudunov: <https://orcid.org/0000-0002-0918-3857>  
З.Г. Кадагидзе/Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-098>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Исследование выполняется в рамках НИР по теме «Оптимизация панели молекулярных маркеров иммунокомпетентных клеток системного и локального иммунитета как средства выявления надежных прогностических и предиктивных факторов эффективности противоопухолевой терапии для персонализации лечения онкологических больных» (сроки исполнения: 01.01.2019–31.12.2021, руководитель – Т.Н. Заботина). АААА-А19-119022090028-6.

**Financing.** The study is carried out within the framework of research on the topic “Optimization of the panel of molecular markers of immunocompetent cells (ICCS) of systemic and local immunity as a means of identifying reliable prognostic and predictive factors of the effectiveness of anti-cancer therapy for personalization of treatment of cancer patients” (deadlines: 01.01.2019–31.12.2021, head – T.N. Zabolina). АААА-А19-119022090028-6.

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

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

Статья поступила: 22.11.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 22.11.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.

# ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *HOX* В ЛЕЙКОЗНЫХ ЛИНИЯХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ В-КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ОНКОГЕН *E2A-PBX1*

Е.А. Шестакова

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

**Контакты:** Елена Анатольевна Шестакова [elenaanshestakova@mail.ru](mailto:elenaanshestakova@mail.ru)

**Введение.** Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) диагностируется в основном у детей и подростков (2/3 заболевших), что делает его одним из самых распространенных детских онкологических заболеваний. В развитии ОЛЛ участвуют онкогены, в частности продукт транслокации хромосом 1 и 19 онкоген *E2A-PBX1*, кодирующий химерный белок *E2A-PBX1*, являющийся сильным транскрипционным активатором, а также онкогены семейства *HOX*, в основном кластеры генов *HOXA* и *HOXB*. Химерный белок *E2A-PBX1* и белки *HOXA*, относящиеся к семейству белков, содержащих гомеодомен, образуют *in vivo* комплексы с факторами, эпигенетически регулирующими экспрессию генов и включающими в себя модифицирующие и ремоделирующие хроматин ферменты, что в значительной мере обуславливает их онкогенные свойства. В предыдущих исследованиях нами были получены данные о генетических взаимодействиях генов *E2A-PBX1* и *HOX*, участвующих в развитии лейкозов.

**Цель исследования** – подтвердить роль онкогена *E2A-PBX1* в активации экспрессии кластера генов *HOXA*, белковые продукты которых также обладают высоким онкогенным потенциалом.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 4 лейкозные линии предшественников В-клеток (пре-В) человека: *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 и *NALM-6*. Для идентификации продукта транслокации хромосом 1 и 19 онкогена *E2A-PBX1* и его экспрессии использовали метод стандартной полимеразной цепной реакции. Для определения экспрессии 11 генов *HOX* кластера А (генов *HOXA*) применяли метод обратной транскрипции, сопряженной с количественной полимеразной цепной реакцией в реальном времени.

**Результаты.** Продемонстрировано, что онкоген *E2A-PBX1* содержится и экспрессируется в 3 исследованных лейкозных линиях пре-В-клеток человека (*RCH-ACV*, *KASUMI-2* и 697) и отсутствует в линии клеток *NALM-6*. Показано, что в клеточных линиях *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697, которые содержат в своем геноме онкоген *E2A-PBX1*, 7 из 11 генов кластера *HOXA* экспрессируются на высоком уровне. В отличие от этих 3 клеточных линий, экспрессирующих большинство генов кластера *HOXA*, в линии клеток *NALM-6*, не экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1*, используемой в качестве контроля, экспрессия генов *HOXA* не наблюдается, за исключением малой экспрессии 2 генов этого кластера.

**Выводы.** В данном исследовании продемонстрировано, что лейкозные линии пре-В-клеток человека *RCH-ACV*, *KASUMI-2* и 697, содержащие и экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, экспрессируют также большинство (7 из 11) генов *HOXA* на высоком уровне, в отличие от контрольной клеточной линии *NALM-6*, не содержащей онкогена *E2A-PBX1* и почти не экспрессирующей гены *HOXA*. Таким образом, полученные результаты предполагают участие сильного транскрипционного активатора – химерного белка *E2A-PBX1*, ассоциированного с факторами, модифицирующими и ремоделирующими хроматин, в активации экспрессии кластера генов *HOXA*, также имеющих высокий онкогенный потенциал.

**Ключевые слова:** онкоген *E2A-PBX1*, кластер генов *HOXA*, лейкозные клеточные линии *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 и *NALM-6*, количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени, ассоциированная с обратной транскрипцией

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-89-95



## HOX GENE EXPRESSION IN HUMAN B-CELL PROGENITOR LEUKEMIA CELL LINES EXPRESSING *E2A-PBX1* ONCOGENE

E.A. Shestakova

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.** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is diagnosed mainly in children (2/3 of diseases) making this type of leukemia one of the most common oncological diseases among children. Oncogenes are involved in the development of ALL, in particular the product of chromosomes 1 and 19 translocation, the oncogene *E2A-PBX1* that codes for *E2A-PBX1* chimeric oncoprotein with strong transcription activation properties as well as oncogenes of *HOX* family, mainly *HOXA* and *HOXB* cluster genes. *E2A-PBX1* chimeric oncoprotein and *HOXA* proteins are associated *in vivo* with factors participating in epigenetic regulation of gene expression such as chromatin modifying and remodeling enzymes that partially determines their oncogenic properties. In previous studies we obtained data indicating genetic interactions of *E2A-PBX1* and *HOX* genes participating in leukemia development.

**The aim** of this research was to confirm the role of *E2A – PBX1* oncogene in the activation of the expression of *HOXA* cluster genes coding for the proteins with high oncogenic potential.

**Materials and methods.** The objects of the study were four B cell progenitor (pre-B) leukemia cell lines: *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 and *NALM-6*. Standard polymerase chain reaction (PCR) was used for the identification of chromosome 1 and 19 translocation product, *E2A-PBX1* oncogene and its expression. Method of reverse transcription coupled with quantitative polymerase chain reaction (Q-RT-PCR) was used for the analysis of 11 *HOXA* cluster genes expression.

**Results.** It is demonstrated that *E2A-PBX1* oncogene is present and expressed in three studied human pre-B leukemia cell lines, *RCH-ACV*, *KASUMI-2* and 697, while its expression is absent in *NALM-6* cell line. High expression of 7 from 11 *HOXA* cluster genes is revealed in *RCH-ACV*, *KASUMI-2* and 697 cell lines expressing *E2A-PBX1* oncogene, whereas *NALM-6* cell line, that does not express *E2A-PBX1* oncogene, also does not express *HOXA* genes except low expression of two genes from this cluster.

**Conclusions.** The data obtained in this study demonstrate that *RCH-ACV*, *KASUMI-2* and 697 human leukemia pre-B cell lines, containing and expressing *E2A-PBX1* oncogene, also express most of *HOXA* genes (7 genes of 11 genes) at high level in contrast to control *NALM-6* cell line that does not comprise *E2A-PBX1* oncogene and almost does not express *HOXA* genes. Therefore, the results of this study suggest the participation of strong transcriptional activator, chimeric oncoprotein *E2A-PBX1*, associated with chromatin modifying and remodeling enzymes, in the expression activation of *HOXA* cluster genes that also possess high oncogenic potential.

**Key words:** *E2A-PBX1* oncogene, *HOXA* gene cluster, *RCH-ACV*, *KASUMI-2*, 697 and *NALM-6* leukemia cell lines, reverse transcription – quantitative polymerase chain reaction

## Введение

Острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ) диагностируется в основном у детей и подростков (2/3 заболевших), что делает его одним из самых распространенных детских онкологических заболеваний. ОЛЛ характеризуется накоплением раковых предшественников лимфоидных клеток В- и Т-линий в костном мозге и крови. Генетические изменения в этих незрелых лимфоидных клетках нарушают их способность к самовозобновлению и вызывают остановку в дифференциации, что приводит к их злокачественной трансформации. В развитии ОЛЛ участвуют онкогены, являющиеся продуктами транслокации хромосом, в частности продукт транслокации хромосом 1 и 19 (t(1;19)) *E2A-PBX1*, кодирующий химерный белок *E2A-PBX1*, а также *BCR-ABL*, *TEL-AML1* [1, 2]. Большую роль в развитии ОЛЛ играют и онкогены семейства *HOX*, в основном кластеры генов *HOXA*, *HOXB*, и в меньшей степени – *HOXC* и *HOXD* [3, 4], сверхэкспрессия которых приводит к нарушению регуляции экспрессии генов, участвующих в гематопоезе, и в результате – к развитию лейкозов.

Транслокация между хромосомами 1 и 19 приводит к образованию онкогена *E2A-PBX1*. Это сильный онкоген, обуславливающий 25 % детских пре-В-клеточных ОЛЛ [2]. Следует отметить, что помимо индукции лейкозов химерный белок *E2A-PBX1* имеет свойство трансформировать несколько видов клеток, среди которых – фибробласты, лимфоидные и миелоидные клетки. На N-конце химерного белка *E2A-PBX1* находятся 2 домена активации (activation domain, AD), происходящие из фактора транскрипции *E2A*, а на C-конце – кооперативный домен *HOX* (Hox cooperative domain, HCD) и ДНК-связывающий гомеодомен фактора транскрипции *PBX* [2]. Свойства сильного конститутивного транскрипционного ак-

тиватора *E2A-PBX1* обусловлены наличием в его составе этих 3 доменов, и в особенности AD, взаимодействующего с гистонацетилтрансферазами *SAGA* и *CBP/p300* [5, 6].

Белки *HOX* играют важную роль в эмбриональном развитии, а во взрослом организме – в кроветворении. Белки *HOX* кодируются 39 *HOX*-генами, представленными 4 кластерами генов-паралогов: *HOXA*, *HOXB*, *HOXC*, *HOXD*. Белки *HOX* – это факторы транскрипции, гомеодомен которых связывается с ДНК. Экспрессия генов *HOX* эпигенетически регулируется комплексами группы Polycomb и лейкоза смешанных линий (Mixed Lineage Leukemia (MLL)). С использованием клеток костного мозга в культуре и мышинных моделей было показано, что гены *HOXA* (кроме *HOXA2* и *HOXA5*) способны трансформировать клетки и индуцировать лейкоз соответственно [3, 4]. Гены *HOXA* также имеют свойство активировать ряд протоонкогенов, включая *Erg*, *Flt3*, *Lmo2*, *Myb* и *Sox4* [7]. Таким образом, в приведенных исследованиях было подтверждено, что гены *HOXA* имеют онкогенный потенциал.

В предыдущих исследованиях с использованием мышинных моделей мы получили данные о генетических взаимодействиях онкогенов *E2A-PBX1* и *HOX*, участвующих в развитии В- и Т-клеточных лейкозов [8–13]. Химерные мыши, экспрессирующие в крови 2 онкогена *E2A-PBX1* и *HOXA9*, развивали лейкоз в 2 раза быстрее по сравнению с мышами, экспрессирующими только онкоген *E2A-PBX1* [9–12]. В продолжение данных исследований с использованием метода тандемной аффинной очистки мы получили из клеток HeLa и 697 нативные комплексы, содержащие, соответственно, *HOXA9* или *E2A-PBX1* с ковалентно связанными FLAG/HA-пептидами, и показали присутствие в каждом из выделенных комплексов ряда взаимодействующих белков, многие из которых также

обладали онкогенным потенциалом [12, 14]. В обоих комплексах содержались факторы, участвующие в эпигенетической регуляции экспрессии генов. В частности, комплекс *HOXA9* содержал ферменты, эпигенетически модифицирующие хроматин: аргинин-N-метилтрансферазу-5 (Protein R methyl-transferase 5, PRMT5), E3-убиквитинлигазу (UBR5), а комплекс *E2A-PBX1* – несколько факторов ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF (SMARCA4 и SMARCC2). Интересно отметить, что, с одной стороны, в комплексе, содержащем *HOXA9*, не был идентифицирован *E2A-PBX1*, с другой стороны, в комплексе, содержащем *E2A-PBX1*, не был идентифицирован *HOXA9*. Эти данные свидетельствуют о том, что *HOXA9* и *E2A-PBX1* взаимодействуют с большей вероятностью не на уровне белок – белковых взаимодействий, а на уровне белок – ген. Идентификация факторов ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF, SMARCA4 и SMARCC2, в комплексе, содержащем *E2A-PBX1*, в дополнение к уже известной ассоциации с *E2A-PBX1* гистонацетилтрансферазы CBP/p300, еще раз указывает на то, что химерный белок *E2A-PBX1* является сильным транскрипционным активатором и, скорее всего, участвует в активации экспрессии гена *HOXA9*. Для подтверждения этой гипотезы мы изучили экспрессию всех генов кластера *HOXA* в 4 лейкозных линиях предшественников В-клеток (пре-В) человека: RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6. Оказалось, что 3 лейкозные клеточные линии – RCH-ACV, KASUMI-2 и 697, содержащие и экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, экспрессируют 7 из 11 генов *HOXA* на высоком уровне, в отличие от контрольной клеточной линии NALM-6, не содержащей гена *E2A-PBX1* и не экспрессирующей генов *HOXA*.

**Цель исследования** – подтверждение роли онкогена *E2A-PBX1* в активации экспрессии кластера генов *HOXA*, белковые продукты которых также обладают высоким онкогенным потенциалом.

## Материалы и методы

### Культуры клеток

В работе были использованы 4 лейкозные линии пре-В-клеток человека: RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6 [15–17].

Культивирование линии лейкозных пре-В-клеток человека 697 проводили в среде Opti-MEM (Gibco, США), содержащей 10 нг/мл интерлейкина-7, 10 % эмбриональной сыворотки телят (которая была протестирована для использования в среде для В-клеток, Stem Cell Technologies, Канада),  $5 \times 10^{-5}$  М  $\beta$ -меркаптоэтанола, L-глутамин и пенициллин/стрептомицин.

Линии лейкозных пре-В-клеток человека RCH-ACV и KASUMI-2 культивировали в среде RPMI, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки телят (тести-

рованной для В-клеток), L-глутамин, пенициллин/стрептомицин.

Линию лейкозных пре-В-клеток человека NALM-6 культивировали в среде RPMI, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки телят (тестированной для В-клеток), L-глутамин, пенициллин/стрептомицин.

### Метод стандартной полимеразной цепной реакции

Стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) использовали для анализа наличия/отсутствия в исследуемых клеточных линиях (RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6) транслокации хромосом 1 и 19, приводящей к образованию онкогена *E2A-PBX1*, а также для анализа экспрессии указанного онкогена.

Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием комплементарной ДНК (кДНК), полученной реакцией обратной транскрипции (ОТ) с РНК, выделенной из 4 исследуемых линий с использованием реагента Trizol (Invitrogen). Для выделения РНК с помощью Trizol использовали в среднем  $3 \times 10^6$ – $10^7$  клеток каждой из 4 линий.

Для синтеза кДНК использовали следующие реагенты и условия.

4 мкг РНК обрабатывали ДНКазой I в течение 15 мин при комнатной температуре в реакционной смеси общего объема 10 мкл, содержащей 8 мкл раствора РНК, 1 мкл 10-кратного буфера для ДНКазы I, 1 мкл ДНКазы I. Далее добавляли 1 мкл 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и инактивировали ДНКазу I при высокой температуре (65 °С) в течение 10 мин. Затем реакционную смесь охлаждали при 4 °С, перемешивали на вортексе и добавляли 10 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции, содержащей 4 мкл 5-кратного буфера для 1-й нити ДНК (First-Strand-Buffer), 2 мкл 0,1 М ДТТ, 1 мкл смеси праймеров (в концентрации 200 мМ), 1 мкл дезокси-нуклеотидтрифосфатов (дНТФ, deoxynucleotide triphosphates, dNTP) в концентрации 10 мМ, 1 мкл обратной транскриптазы мышиного вируса лейкоза Малонея (Mouse Maloney Leukemia Virus reverse transcriptase, M-MLV RT). Далее реакционную смесь общим объемом 20 мкл нагревали при 37 °С в течение 90 мин, затем при 70 °С в течение 15 мин и охлаждали при 4 °С. кДНК, полученную в результате реакции ОТ, хранили при –80 °С до использования для ПЦР.

Далее для ПЦР использовали олигонуклеотиды-праймеры *E2A-PBX1* прямой: GCACAACCACGCGGCC и *E2A-PBX1* обратный: CCACGCCTTCGCTAA. Реакционная смесь в общем объеме 50 мкл содержала 5 мкл 10-кратного буфера для полимеразы Taq (Taq polymerase), 3 мкл 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub> (конечная концентрация в реакционной смеси 1,5 мМ), 0,4 мкл смеси 4 дезокси-нуклеотидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), каждый в концентрации 25 мМ (конечная концентрация каждого из нуклеотидов

в реакционной смеси 200 мкМ), 1 мкл раствора кДНК, 2 мкл прямого и 2 мкл обратного праймера, 0,5 мкл полимеразы Taq (Sigma) и 36,1 мкл H<sub>2</sub>O.

Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: 1 цикл при 94 °С в течение 1 мин, 30 циклов при 94 °С в течение 30 с, далее при 60 °С в течение 30 с и затем при 72 °С в течение 1 мин 30 с; 1 цикл при 72 °С в течение 10 мин и охлаждали при 4 °С.

Продукты стандартной ПЦР разделяли в 2 % агарозном геле, который окрашивали бромидом этидия. В результате ПЦР синтезировался фрагмент размером 161 пара оснований, соответствующий области транслокации хромосом 1 и 19 и онкогену *E2A-PBX1*, а также мРНК *E2A-PBX1*. В качестве маркеров длин фрагментов ДНК использовали рКС.

#### Метод обратной транскрипции, сопряженной с количественной полимеразной цепной реакцией в реальном времени

РНК выделяли из культивируемых клеток с использованием реагента Trizol (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя. Для синтеза кДНК с РНК использовали те же реагенты и условия, которые описаны в предыдущей части статьи.

В качестве праймеров для количественной ПЦР в реальном времени использовали следующие олигонуклеотиды:

HOXA1 прямой: ACAGAACTTCAGTGC GCC; HOXA1 обратный: GGGAGCGACAGGCTTCTT; HOXA2 прямой: CACAAGAATCCCTGGAA; HOXA2 обратный: AAATGAAATCTTTTCCSA; HOXA3 прямой: CCTGGATGAAAGAGTCTC; HOXA3 обратный: GCCAGCGCAGCTTTCG; HOXA4 прямой: TGGTGTA-CCCCTGGATGA; HOXA4 обратный: CTTAGGC-TCCCCTCCGTT; HOXA5 прямой: TCCCATCGCTTCC-СТАСС; HOXA5 обратный: GCTTTGGAACAGCCTACA; HOXA6 прямой: AGTACACGAGCCCGGTTT; HOXA6 обратный: CCCATGGCTCCCАТАСАС; HOXA7 прямой: AGCTTGGAATTTCTGCTC; HOXA7 обратный: TCTGATGTCATGGCCAAA; HOXA9 прямой: GCCG-GCCTTATGGCATTА; HOXA9 обратный: CAGGGA-CAAAGTGTGAGT; HOXA10 прямой: AAAGCCTCGCCG-GAGAA; HOXA10 обратный: CTCAGTGTCTGGTGCTT; HOXA11 прямой: TTGAGCATGCGGGACAGT; HOXA11 обратный: GTACCAGATCCGAGAGCT; HOXA13 прямой: TGCCCAACGGCTGGAA; HOXA13 обратный: TAAGGCACGCGCTTCTTT.

В качестве контрольных олигонуклеотидов использовали праймеры к актину и к глицеральдегид-фосфатдегидрогеназе (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase).

Реакцию количественной ПЦР в реальном времени проводили в объеме 15 мкл. Реакционная смесь содержала 7,5 мкл буферного раствора с Syber Green; 1 мкл кДНК; 5,5 мкл H<sub>2</sub>O и 1 мкл смеси прямого

и обратного праймеров в концентрации 15 мкМ (конечная концентрация в 15 мкл – 1 мкМ).

Для реакции количественной ПЦР в реальном времени использовали прибор Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System и следующие условия реакции: 1 цикл при 50 °С в течение 2 мин; 1 цикл при 95 °С в течение 10 мин (денатурация); 40 циклов при 95 °С в течение 15 с и затем при 60 °С в течение 1 мин (полимеризация); 1 цикл при 95 °С в течение 15 с, при 60 °С в течение 20 с, при 95 °С в течение 15 с, при 60 °С в течение 15 с (диссоциация).

Для анализа результатов количественной ПЦР в реальном времени использовали программу SDS (Applied Biosystems Real-Time PCR system SDS software).

#### Результаты

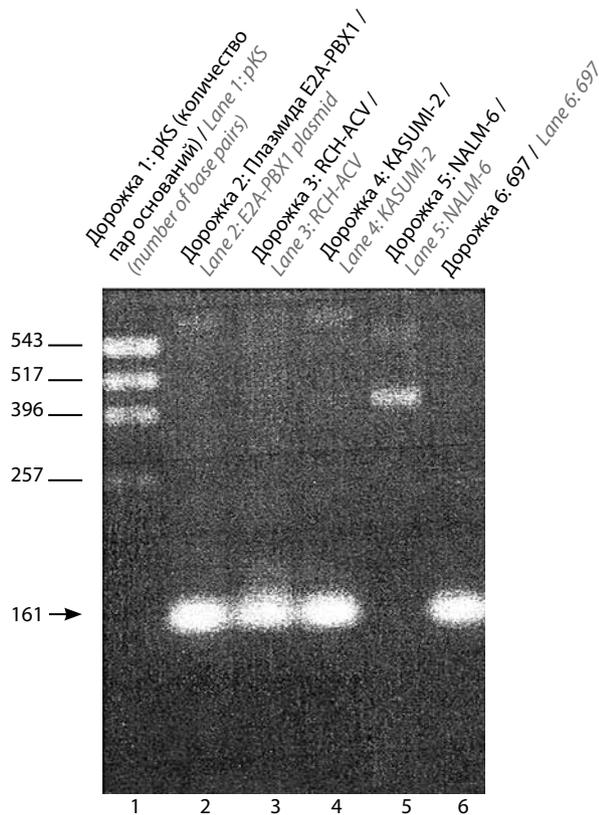
##### Присутствие и экспрессия онкогена *E2A-PBX1* в линиях клеток RCH-ACV, KASUMI-2 и 697 и отсутствие в линии клеток NALM-6

В начале представленного исследования мы проанализировали 4 лейкозные линии пре-В-клеток человека (RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6) на наличие в них транслокации хромосом 1 и 19 и, следовательно, онкогена *E2A-PBX1*. В этой части исследования мы использовали стандартную ПЦР с праймерами *E2A-PBX1* прямой и *E2A-PBX1* обратный, приводящими к синтезу фрагмента ДНК размером 161 пара оснований, соответствующего области транслокации хромосом 1 и 19 и, следовательно, онкогену *E2A-PBX1*, а также мРНК *E2A-PBX1*.

На рисунке представлены результаты стандартной ПЦР, проведенной с использованием праймеров *E2A-PBX1* и кДНК, синтезированной с РНК, выделенной из 4 лейкозных линий пре-В-клеток человека: RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и NALM-6. Показано, что после выделения РНК из клеточных линий RCH-ACV, KASUMI-2, 697 и последующего синтеза кДНК размер фрагмента ДНК составляет 161 пару оснований. Такой же фрагмент синтезируется с плазмиды, содержащей онкоген *E2A-PBX1*. В отличие от результатов ПЦР, полученных с линиями клеток RCH-ACV, KASUMI-2 и 697, с кДНК, полученной из РНК, выделенной из клеточной линии NALM-6, не наблюдается синтеза фрагмента ДНК размером 161 пара оснований. Таким образом, в 3 линиях клеток RCH-ACV, KASUMI-2 и 697 имеется и экспрессируется онкоген *E2A-PBX1*, в то время как в линии клеток NALM-6 этот онкоген не присутствует.

##### Высокая экспрессия генов *HOXA* в лейкозных линиях пре-В-клеток человека RCH-ACV, KASUMI-2, 697, экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1*

С учетом определения статуса онкогена *E2A-PBX1* в 4 лейкозных линиях пре-В-клеток человека RCH-ACV,



Онкоген *E2A-PBX1* содержится в геноме и экспрессируется в лейкозных пре-В-клеточных линиях человека RCH-ACV, KASUMI-2 и 697 и отсутствует в линии клеток NALM-6. 2 % агарозный гель, окрашенный бромидом этидия, с фрагментами ДНК, полученными в результате стандартной ПЦР. Фрагмент ДНК размером 161 пара оснований, полученный в результате ПЦР, соответствует онкогену *E2A-PBX1*.

*E2A-PBX1* oncogene is contained in the genome and is expressed in pre-B cell leukemia lines RCH-ACV, KASUMI-2 and 697 and is absent in NALM-6 cell line. 2 % agarose gel stained with ethidium bromide and containing DNA fragments obtained in standard PCR is presented on the figure. 161 bp fragment obtained in PCR corresponds to *E2A-PBX1* oncogene.

KASUMI-2, 697 и NALM-6 был проведен анализ экспрессии всех 11 генов *HOXA* в 3 лейкозных линиях пре-В-клеток человека, содержащих и экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1* (*E2A-PBX1*<sup>+</sup>) (RCH-ACV, KASUMI-2 и 697), и в контрольной линии (NALM-6), в которой отсутствует онкоген *E2A-PBX1* (*E2A-PBX1*<sup>-</sup>). Для анализа экспрессии генов *HOXA* был применен метод количественной ПЦР в реальном времени с использованием в качестве I стадии обратной транскрипции (см. таблицу). Все линии, экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, также экспрессировали большинство генов *HOXA*, но уровни экспрессии индивидуальных генов были очень различными. Самый высокий уровень экспрессии наблюдался у гена *HOXA7* (20 897 транскриптов на 50 нг РНК). Экспрессия этого гена наблюдалась на самом высоком уровне в клеточных линиях KASUMI-2 и 697, а также, хотя и в немного меньших количествах, в клеточной линии RCH-ACV. Следующим по уровню высокой экс-

Экспрессия генов *HOXA* в лейкозных линиях пре-В клеток человека  
*HOXA* gene expression in human pre-B leukemia cell lines

Гены <i>HOXA</i> <i>HOXA</i> genes	Линии клеток <i>E2A-PBX1</i> <sup>+</sup> <i>E2A-PBX1</i> <sup>+</sup> cell lines			Линия клеток <i>E2A-PBX1</i> <sup>-</sup> <i>E2A-PBX1</i> <sup>-</sup> cell line
	RCH-ACV	KASUMI-2	697	NALM-6
<i>HOXA1</i>	20	20	20	20
<i>HOXA2</i>	72	20	20	20
<i>HOXA3</i>	232	461	136	20
<i>HOXA4</i>	20	20	20	20
<i>HOXA5</i>	34	53	20	20
<i>HOXA6</i>	1059	1844	203	20
<i>HOXA7</i>	7404	14224	20897	4804
<i>HOXA9</i>	20	20	20	20
<i>HOXA10</i>	20	20	20	20
<i>HOXA11</i>	20	28	37	33
<i>HOXA13</i>	20	20	216	23

**Примечание.** Цифрами представлены количества транскриптов соответствующих генов *HOXA* на 50 нг РНК.  
Note: Numbers indicate *HOXA* gene transcript quantities per 50 ng of RNA

Низкая —————> Высокая экспрессия генов (копии)  
Low —————> High gene expression (copies)

прессии в 3 исследованных лейкозных линиях клеток *E2A-PBX1*<sup>+</sup> был идентифицирован ген *HOXA6* (1844 транскрипта на 50 нг РНК). Ген *HOXA3* также экспрессировался на высоком уровне в этих 3 линиях клеток (461 транскрипт на 50 нг РНК), хотя и в немного меньшей степени, чем гены *HOXA7* и *HOXA6*.

Другие гены *HOX* кластера А не экспрессировались в этих клеточных линиях или экспрессировались в отдельных клеточных линиях на низком уровне. Так, ген *HOXA2* немного экспрессировался в клеточной линии RCH-ACV и не экспрессировался в клеточных линиях KASUMI-2 и 697. Напротив, гены *HOXA11* и *HOXA13* экспрессировались в небольшом количестве в клеточной линии 697 и не экспрессировались в клеточных линиях RCH-ACV и KASUMI-2. Таким образом, полученные результаты продемонстрировали, что 3 лейкозные линии пре-В-клеток человека, содержащие онкоген *E2A-PBX1* (RCH-ACV, KASUMI-2 и 697), экспрессируют 7 из 11 генов *HOXA*, т. е. большинство генов кластера *HOXA*.

Экспрессия генов *HOXA* в контрольной линии NALM-6, в которых отсутствовал онкоген *E2A-PBX1* (*E2A-PBX1*<sup>-</sup>), не наблюдалась или была на низком уровне. В этой линии клеток была отмечена экспрессия

гена *HOXA7*, а также очень небольшая экспрессия гена *HOXA11* (см. таблицу).

Интересно отметить, что в мышинных моделях наибольший онкогенный потенциал наблюдался в химерных мышах, трансплантированных В-клетками, экспрессирующими онкогены *E2A-PBX1* и *Hoxa9* [9–12]. Ни в одной из исследованных нами лейкозных линий пре-В-клеток человека, содержащих и экспрессирующих онкоген *E2A-PBX1* (RCH-ACV, KASUMI-2 и 697), не наблюдалось экспрессии онкогена *HOXA9*. Полученные результаты можно объяснить различиями В-клеточных лейкозов у мышей и у человека, а также возможными изменениями экспрессии генов при переводе первичных опухолевых клеток в культивируемые клеточные линии [18].

Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что химерный онкобелок E2A-PBX1 в комплексе с гистонацетилтрансферазой CBP/p300 и факторами ремоделирования хроматина семейства SWI/SNF (SMARCA4 и SMARCC2) играет роль силь-

ного транскрипционного активатора, участвующего в повышении экспрессии генов *HOXA*, белковые продукты которых обладают мощными канцерогенными свойствами.

### Выводы

В данном исследовании продемонстрировано, что 3 лейкозные клеточные линии RCH-ACV, KASUMI-2 и 697, содержащие и экспрессирующие онкоген *E2A-PBX1*, экспрессируют большинство (7 из 11) генов *HOXA* на высоком уровне, в отличие от контрольной клеточной линии NALM-6, не содержащей онкогена *E2A-PBX1* и почти не экспрессирующей гены *HOXA*. Таким образом, полученные результаты предполагают участие сильного транскрипционного активатора, химерного белка E2A-PBX1, ассоциированного с факторами, модифицирующими и ремоделирующими хроматин, в повышении экспрессии кластера генов *HOXA*, также имеющих высокий онкогенный потенциал, что в целом усиливает развитие лейкоза.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Korsmeyer S.J. Chromosomal translocations in lymphoid malignancies reveal novel proto-oncogenes. *Annu Rev Immunol* 1992;10:785–807. DOI: 10.1146/annurev.ij.10.040192.004033.
- Aspland S.E., Bendall H.H., Murre C. The role of *E2A-PBX1* in leukemogenesis. *Oncogene* 2001;20(40):5708–17. DOI: 10.1038/sj.onc.1204592.
- Bach C., Buhl S., Mueller D. et al. Leukemogenic transformation by *HOXA* cluster genes. *Blood* 2010;115(14):2910–8. DOI: 10.1182/blood-2009-04-216606.
- Kroon E., Kros J., Thorsteinsdottir U. et al. *HOXA9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *EMBO J* 1998;17(13):3714–25. DOI: 10.1093/emboj/17.13.3714.
- Massari M.E., Grant P.A., Pray-Grant M.G. et al. A conserved motif present in a class of helix-loop-helix proteins activates transcription by direct recruitment of the SAGA complex. *Mol Cell* 1999;4(1):63–73. DOI: 10.1016/s1097-2765(00)80188-4.
- Bayly R., Chuen L., Currie R.A. et al. *E2A-PBX1* interacts directly with the KIX domain of CBP/p300 in the induction of proliferation in primary hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2004;279(53):55362–71. DOI: 10.1074/jbc.M408654200.
- Huang Y., Sitwala K., Bronstein J. et al. Identification and characterization of *Hoxa9* binding sites in hematopoietic cells. *Blood* 2012;119(2):388–98. DOI: 10.1182/blood-2011-03-341081.
- Bijl J., Sauvageau M., Thompson A. et al. High incidence of proviral integrations in the *HOXA* locus in a new model of *E2A-PBX1*-induced B-cell leukemia. *Genes Dev* 2005;19(2):224–33. DOI: 10.1101/gad.1268505.
- Hassawi M., Shestakova E.A., Fournier M. et al. *Hoxa9* collaborates with *E2A-PBX1* in mouse B cell leukemia in association with *Flt3* activation and decrease of B cell gene expression. *Dev Dyn* 2014;243(1):145–58. DOI: 10.1002/dvdy.24056.
- Shestakova E.A., Hassawi M., Fournier M. et al. Analysis of *E2A-PBX1* and *HOXA* collaboration in leukemia. 17<sup>th</sup> Annual Research Conference of HMR Research Center of the University of Montreal. 2010. Montreal, Canada. Abstract book. P. 28. Abstract 28.
- Shestakova E., Hassawi M., Fournier M. et al. Analysis of *E2A-PBX1* and *HOXA* collaboration in leukemia using *ex vivo* B cell culture and mouse models. 18<sup>th</sup> Annual Research Conference of HMR Research Center of the University of Montreal. 2011. Montreal, Canada. Abstract book. P. 55. Abstract 55.
- Shestakova E.A., Hassawi M., Fournier M. et al. Identification of new *E2A-PBX1* interacting proteins and analysis of *E2A-PBX1* and *HOXA* collaboration in leukemia. 5<sup>th</sup> Annual Canadian Cancer Immune Therapy Symposium. 2012. Montreal, Canada. Abstract book. P. 6. Abstract 6.
- Bijl J., Kros J., Lebert-Ghali C.E. et al. Evidence for *HOXA* and *E2A-PBX1* collaboration in mouse T-cell leukemia. *Oncogene* 2008;27(49):6356–64. DOI: 10.1038/onc.2008.233.
- Шестакова Е.А., Boutin M., Bourassa S. и др. Идентификация белков, ассоциированных с факторами транскрипции *HOXA9* и *E2A-PBX1*, методом тандемной аффинной очистки. *Молекулярная биология* 2017;51(3):490–501. DOI: 10.7868/S0026898417030132. [Shestakova E.A., Boutin M., Bourassa S. et al. Identification of proteins associated with transcription factors *HOXA9* and *E2A-PBX1* by tandem affinity purification. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology* 2017;51(3):432–44. (In English)].
- Kim D.H., Moldwin R.L., Vignon C. et al. *TEL-AML1* translocations with *TEL* and *CDKN2* inactivation in acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Blood* 1996;88(3):785–94.
- Findley H.W.Jr., Cooper M.D., Kim T.H. et al. Two new acute lymphoblastic leukemia cell lines with early B-cell phenotypes. *Blood* 1982;60(6):1305–9.
- Hurwitz R., Hozier J., LeBien T. et al. Characterization of a leukemic cell line of the pre-B phenotype. *Int J Cancer* 1979;23(2):174–80. DOI: 10.1002/ijc.2910230206.

18. Богущ Т.А., Калюжный С.А.,  
Четыркина М.Р. и др. Экспрессия  
виментина в культурах клеток  
эпителиальных опухолей человека.

Успехи молекулярной онкологии  
2018;5(2):24–30. DOI: 10.17650/2313-  
805X-2018-5-2-24-30. [Bogush T.A.,  
Kaliuzhny S.A., Chetyrkina M.R. et al.

Vimentin expression in human cell lines  
of epithelial tumors. *Uspеhi Molekulâr-  
noj Onkologii = Advances in Molecular  
Oncology* 2018;5(2):24–30. (In Russ.).

**Благодарность.** Автор выражает благодарность профессору Жаннетте Байл за финансирование и общее руководство данным исследованием, выполненным в Научно-исследовательском центре Университета Монреаля (Монреаль, Канада).

**Acknowledgment.** The author is very grateful to Professor Jannetta J. Bijl for financial support and general guidance during this study performed at the Research Center of Montreal University (Montreal, Canada).

**ORCID автора/ORCID of author**

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

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Представленное исследование поддержано грантом Канадского общества исследований в области лейкозов и лимфом и грантом № 20399 Национального онкологического общества Канады, выданными профессору Жаннетте Байл.

**Financing.** This study was supported by grants from Leukemia and Lymphoma Society of Canada and National Cancer Institute of Canada (grant №20399) issued to Professor Jannetta J. Bijl.

Статья поступила: 16.10.2018. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 16.10.2018. Accepted for publication: 19.12.2019.

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ АЛЬФА В СОСТАВЕ ИСКУССТВЕННОЙ ВИРУСОПОДОБНОЙ ЧАСТИЦЫ

Г.М. Сысоева<sup>1</sup>, Е.И. Рябчикова<sup>2</sup>, О.В. Симакова<sup>1</sup>, Е.А. Волосникова<sup>1</sup>, Л.Р. Лебедев<sup>1</sup>, Е.Д. Даниленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт медицинской биотехнологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; Россия, 633010 Бердск, ул. Химзаводская, 9;

<sup>2</sup>ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; Россия, 630090 Новосибирск, проспект Акад. Лаврентьева, 8

**Контакты:** Галина Михайловна Сысоева sysoeva\_gm@vector.nsc.ru

**Введение.** Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) – природный цитокин, обладающий выраженными противоопухолевыми свойствами. Широкий спектр побочных эффектов служит препятствием для применения ФНО- $\alpha$  в клинической практике. Одним из способов улучшения его терапевтических свойств является повышение тропности белка к ткани опухоли за счет включения в средства адресной доставки.

**Цель исследования** – изучение противоопухолевого действия препарата ФНО- $\alpha$  в составе искусственной вирусоподобной частицы (ВПЧ-ФНО- $\alpha$ ), разработанной в ГНЦ ВБ «Вектор» для транспортировки белков к клеткам-мишеням.

**Материалы и методы.** Противоопухолевый эффект ВПЧ-ФНО- $\alpha$  исследовали на экспериментальной модели меланомы мышей B16F10 по изменению динамики роста опухоли (объем, масса) и ее морфологической структуры (наличие некротических процессов, деструкции сосудов). Содержание эффекторных клеток иммунной системы (CD3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) в ткани опухоли определяли иммуногистохимическим методом.

**Результаты.** ВПЧ-ФНО- $\alpha$  при внутривенном введении в дозах  $5 \times 10^4$  и  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь замедлял рост первичной опухоли. Наиболее выраженный и стабильный эффект был отмечен при 5-кратном введении препарата в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ с интервалом 1 день: торможение роста опухоли составляло 40 и 47 % через 1 и 7 сут после окончания введения соответственно. Инъекции препарата вызывали увеличение степени деструкции опухолевой ткани и нарастание некротических изменений, повреждение и разрушение кровеносных сосудов опухоли, ее инфильтрацию иммунокомпетентными клетками.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют о противоопухолевой активности препарата ФНО- $\alpha$  в средстве доставки, что позволяет предполагать возможность его применения в дальнейшем для лечения злокачественных новообразований, в частности меланомы.

**Ключевые слова:** фактор некроза опухоли  $\alpha$ , вирусоподобная частица, меланома, торможение роста опухоли

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-96-103



## EVALUATION OF ANTITUMOR ACTIVITY OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA WITHIN THE ARTIFICIAL VIRUS-LIKE PARTICLE

G.M. Sysoeva<sup>1</sup>, E.I. Ryabchikova<sup>2</sup>, O.V. Simakova<sup>1</sup>, E.A. Volosnikova<sup>1</sup>, L.R. Lebedev<sup>1</sup>, E.D. Danilenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Biotechnology of the State Research Center of Virology and Biotechnology Vector of the Rosпотребнадзор; 9 Khimzavodskaya St., Berdsk 633010, Russia;

<sup>2</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 8 Lavrentjev Prospekt, Novosibirsk 630090, Russia

**Introduction.** Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) is a natural cytokine, characterized by pronounced antitumor properties. A wide range of side effects serves as an obstacle for the use of TNF- $\alpha$  in clinical practice. One of the ways to improve its therapeutic properties is to increase the tropism of the cytokine to the tumor tissue by incorporating it into the targeted delivery system.

**The aim** of the study was to evaluate the antitumor activity of the preparation containing TNF- $\alpha$  as part of the artificial “virus-like particle” (VLP-TNF- $\alpha$ ), developed in SRC VB “Vector” as a transport system for delivering proteins to target cells.

**Materials and methods.** The antitumor effect of VLP-TNF- $\alpha$  preparation was evaluated in experimental B16F10 melanoma model by the change of dynamics of tumor growth (volume, mass) and its morphological structure (presence of necrotic processes, blood vessel destruction). The number of the effector immune cells (CD3<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>) in the tumor tissue was determined by immunohistochemical method.

**Results.** It has been shown that VLP-TNF- $\alpha$  administered intravenously at the doses of  $5 \times 10^4$  and  $1 \times 10^5$  IU/mouse inhibits the growth of the primary tumor. The most pronounced and stable effect was observed with a five-fold administration at the dose of  $1 \times 10^5$  IU/mouse every other day: tumor growth inhibition was 40 % on the 1<sup>st</sup> day, and 47 % on the 7<sup>th</sup> day upon the treatment. Injections of the preparation

resulted in the increase of necrosis number, destruction level of the tumor tissue, development of damage and destruction of the tumor blood vessels and its infiltration with immunocompetent cells.

**Conclusion.** The obtained data indicates that TNF- $\alpha$  within the delivery system exerts antitumor activity, which suggests the possibility of its further use for the treatment of malignant neoplasms, in particular, melanoma.

**Key words:** tumor necrosis factor  $\alpha$ , virus-like particle, melanoma, tumor growth inhibition

## Введение

Среди современных методов лечения онкологических заболеваний особое внимание в последние годы уделяется разработке и совершенствованию методов иммунотерапии, в частности цитокинотерапии [1]. Фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО- $\alpha$ ) – природный белок-цитокин, обладающий способностью тормозить рост и вызывать геморрагический некроз опухолей благодаря индукции апоптоза опухолевых клеток, повреждающему действию на сосуды опухоли, активации иммунных противоопухолевых реакций [2, 3]. Однако выраженные токсические эффекты ФНО- $\alpha$  при его системном введении служат серьезным препятствием для применения препарата в онкологической практике. В связи с этим предпринимаются многочисленные попытки улучшить терапевтические характеристики ФНО- $\alpha$ , среди которых особый интерес представляет разработка дизайна средств адресной доставки белка к клеткам-мишеням [4–6]. В опубликованных источниках есть сведения о создании препаратов ФНО- $\alpha$  в средствах доставки на основе наночастиц, полимеров, липосом [7–9]. Показано, что использование этих систем позволяет повысить накопление белка в ткани опухоли и, как следствие, его противоопухолевую активность. К их недостаткам можно отнести отсутствие в организме систем деградации компонентов транспортеров и возможность их кумуляции (средства доставки на основе неорганических частиц либо полученные с использованием синтетических полимеров), быструю элиминацию из организма клетками-фагоцитами (липосомы), нестабильность в биологических средах.

Сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор» была разработана и запатентована оригинальная молекулярная конструкция, названная вирусоподобной частицей (ВПЧ), для транспортировки белков с целью их защиты от протеаз и увеличения накопления в ткани опухоли [10]. Конструкция представляет собой частицу, ядро которой состоит из двуспиральной РНК дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, покрытой слоем конъюгата декстрана (полиглюкина) со спермидином, удерживаемого за счет ионного взаимодействия между отрицательно заряженным полинуклеотидным комплексом и положительно заряженным спермидином, а ФНО- $\alpha$  ковалентно связан с активированным полиглюкином. Было показано, что введение

ФНО- $\alpha$  в составе ВПЧ интактным мышам и мышам с трансплантированной карциномой Эрлиха приводило к удлинению периода его циркуляции в кровеносном русле и повышению противоопухолевой активности [11]. Препарат обладал тропностью к ткани опухоли и коже, что позволяет предполагать возможность его применения для лечения злокачественных новообразований, в частности меланомы [12].

**Цель исследования** – изучение противоопухолевого действия препарата ФНО- $\alpha$  в составе средства доставки на экспериментальной модели меланомы мышей В16F10.

## Материалы и методы

В экспериментах использовали препарат рекомбинантного ФНО- $\alpha$  человека в составе искусственной ВПЧ (ВПЧ-ФНО- $\alpha$ ), лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения, полученный в соответствии с Патентом РФ № 2386447, с концентрацией белка 0,1 мг/мл и цитолитической активностью  $1,55 \times 10^7$  МЕ/мг. Опухолевый штамм меланомы мышей В16F10 получен из коллекции опухолевых штаммов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Москва).

Для моделирования опухолевого процесса использовали мышей линии С57BL/6 обоего пола с массой тела 20–23 г, полученных из отдела экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии и регенеративной медицины им. Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ. Животные содержались группами по 8–10 особей в пластиковых клетках в условиях естественного освещения на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Работа выполнена с соблюдением СП 2.2.1.3218–14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» и международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986). Протокол-заявка № ИМБТ/03–09.2016 на использование лабораторных животных утвержден Bio-этической комиссией ГНЦ ВБ «Вектор» (протокол № 4 от 12.09.2016).

Клетки меланомы В16F10 трансплантировали мышам внутримышечно в дозе  $1 \times 10^6$  кл/мышь в объеме 0,1 мл. Внутримышечный способ перевивки

опухолевых клеток был выбран, исходя из особенностей противоопухолевого действия препарата ФНО- $\alpha$ . Поскольку одним из основных механизмов является деструктивное влияние ФНО- $\alpha$  на сосуды опухоли, максимальный эффект препарата следовало ожидать в отношении экспериментальных опухолей с развитой сосудистой системой, что в большей степени обеспечивается внутримышечной перевивкой опухоли по сравнению с классическим подкожным введением [1, 13].

Препарат ВПЧ-ФНО- $\alpha$  вводили внутривенно в дозах  $5 \times 10^4$  или  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь (3 и 6 мкг соответственно) в объеме 0,5 мл трех- либо пятикратно, через день, начиная инъекции с 11-х суток после перевивки опухоли. Контрольным мышам в те же сроки вводили внутривенно физиологический раствор. Основанием для выбора доз и сроков начала введения препаратов ФНО- $\alpha$  послужили данные исследований J.M. Farma и соавт., а также результаты собственных экспериментов по изучению противоопухолевой активности препаратов ФНО- $\alpha$  и ВПЧ-ФНО- $\alpha$  [8, 10, 11, 13, 14].

На 11, 14, 16, 18 и 21-е сутки после перевивки опухоли проводили замер линейных размеров опухоли, рассчитывали объем опухолевого узла и процент торможения роста опухоли (ТРО). Объем опухоли вычисляли по формуле:

$$V (\text{мм}^3) = a \times b^2 / 2,$$

где  $a$ ,  $b$  – длина, ширина опухоли соответственно (мм).

Для расчета процента ТРО использовали формулу:

$$\text{ТРО} (\%) = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

где  $V_k$  – средний показатель объема опухоли в контрольной группе;  $V_o$  – средний показатель опытной группы.

Эвтаназию животных методом мгновенной дислокации шейных позвонков и взятие образцов опухоли для гистологического исследования проводили через 1 сут после окончания курса инъекций.

Гистологические препараты опухолей после 24-часовой фиксации в 4 % растворе параформальдегида готовили по общепринятой методике; срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали гематоксилин-эозином и по методу пикро-Маллори. Для проведения иммуногистохимического анализа парафиновые срезы монтировали на стекла, покрытые полилизинном (Thermo Scientific, США). Для выявления маркеров CD11b и CD3 использовали кроличьи моноклональные антитела (Abscam, Великобритания). Срезы докрашивали гематоксилином Эрлиха и заключали в глицерин-желатин. Полученные препараты исследовали с помощью светового микроскопа Leica DM

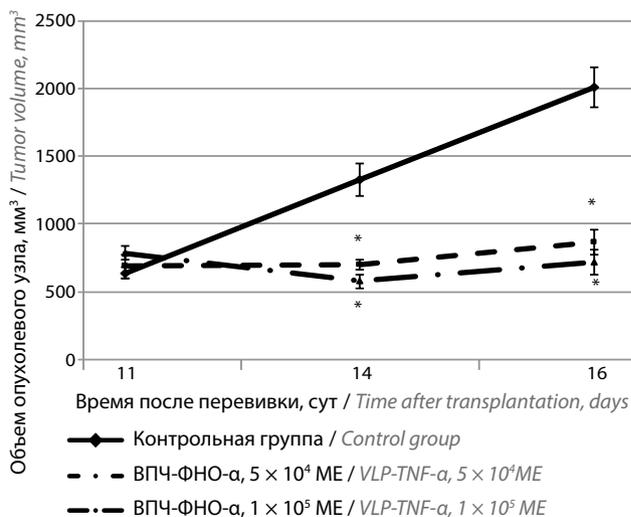
2500 (Германия), фотосъемку осуществляли с помощью цифровой камеры Leica DFC420 S.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statgraphics PLUS Version 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA) либо Statistica 8. Рассчитывали групповые показатели суммарной статистики: среднюю арифметическую и ошибку средней. Нормальность распределения признаков (показателей) оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки значимости межгрупповых различий нормально распределенных признаков применяли t-критерий Стьюдента, в противном случае использовали U-критерий Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез ( $p$ ) принимали равным 0,05.

## Результаты и обсуждение

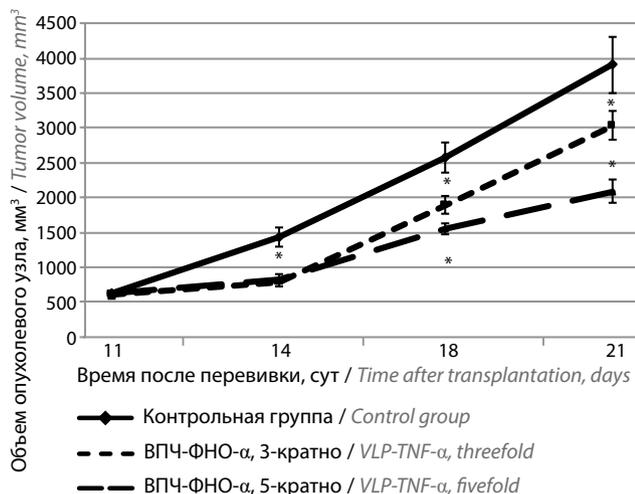
### Исследование влияния препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$ на рост первичной опухоли

На рис. 1 представлена динамика изменения размеров экспериментальных опухолей на фоне введения препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$  в течение 16 сут после перевивки опухоли. Как видно из приведенных данных, 3-кратное внутривенное введение препарата в дозах  $5 \times 10^4$  и  $1 \times 10^5$  МЕ оказывало достоверное ингибирующее действие на рост меланомы B16F10. Максимально выраженный эффект наблюдался через 1 сут после 3-й инъекции препарата: ТРО в группе мышей, которым препарат вводили в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ, составляло 57 %, в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ – 64 %. Объем



**Рис. 1.** Влияние 3-кратного введения препарата фактора некроза опухоли  $\alpha$  в составе искусственной вирусоподобной частицы (ВПЧ-ФНО- $\alpha$ ) в дозах  $5 \times 10^4$  или  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь на скорость роста меланомы B16F10 у мышей C57Bl/6; \*различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с показателем контроля

**Fig. 1.** Effect of threefold administration of tumor necrosis factor  $\alpha$  within artificial virus-like particle (VLP-TNF- $\alpha$ ) at the doses of  $5 \times 10^4$  or  $1 \times 10^5$  IU/mouse on the growth rate of B16F10 melanoma in C57Bl/6 mice; \*significant difference from control,  $p \leq 0.05$



**Рис. 2.** Влияние внутривенного введения препарата фактора некроза опухоли  $\alpha$  в составе искусственной вирусоподобной частицы (ВПЧ-ФНО- $\alpha$ ) в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь, трех- или пятикратно, на скорость роста меланомы B16F10; \*различия статистически значимы ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с показателем контроля

**Fig. 2.** Effect of threefold and fivefold administration of tumor necrosis factor  $\alpha$  within artificial virus-like particle (VLP-TNF- $\alpha$ ) at the dose of  $1 \times 10^5$  IU/mouse on the growth rate of B16F10 melanoma; \* significant difference from control,  $p \leq 0.05$

опухоли в этот срок был равен  $866 \pm 90$  и  $716 \pm 90$  мм<sup>3</sup> соответственно при контрольном уровне показателя  $2011 \pm 150$  мм<sup>3</sup>.

Однако дальнейшее наблюдение показало ускорение роста опухоли в опытных группах по окончании курса введения препарата. Так, в группе мышей, которым препарат вводили в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ, через 7 сут после окончания введения объем опухоли достигал  $3038 \pm 208$  мм<sup>3</sup> при контрольном уровне показателя  $3910 \pm 406$  мм<sup>3</sup> (ТРО 22 %). Аналогичная тенденция наблюдалась в группе мышей, которым препарат вводили в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ. То есть использование этой схемы лечения не обеспечивало длительного ингибирования роста опухоли.

Более продолжительный эффект наблюдали в случае курсового 5-кратного, с интервалом в 1 день, введения препарата в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ (рис. 2). Эффект ингибирования был отмечен после 2-й инъекции препарата и сохранялся в течение всего периода наблюдения. Средний объем опухоли у мышей этой группы на 21-е сутки после перевивки (2-е сутки после окончания введения) составлял  $2090 \pm 171$  мм<sup>3</sup>, на 25-е сутки –  $3981 \pm 410$  мм<sup>3</sup>, что ниже соответствующих контрольных показателей в 1,9 и 1,5 раза ( $3910 \pm 406$  мм<sup>3</sup> на 21-е сутки,  $6062 \pm 2425$  мм<sup>3</sup> на 25-е сутки). В группе мышей, которым препарат вводили в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь 5-кратно, было отмечено увеличение средней продолжительности жизни животных до  $30,8 \pm 0,6$  дня, что на 21 % больше, чем в контрольной группе ( $24,3 \pm 0,6$  дня) (различия достоверны,  $p \leq 0,05$ ).

Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат ВПЧ-ФНО- $\alpha$  обладает способностью тормозить рост экспериментальной опухоли меланомы B16F10 и увеличивать продолжительность жизни мышей-опухоленосителей. Наиболее выраженный и стабильный противоопухолевый эффект был отмечен при 5-кратном внутривенном введении препарата в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь с интервалом в 1 день.

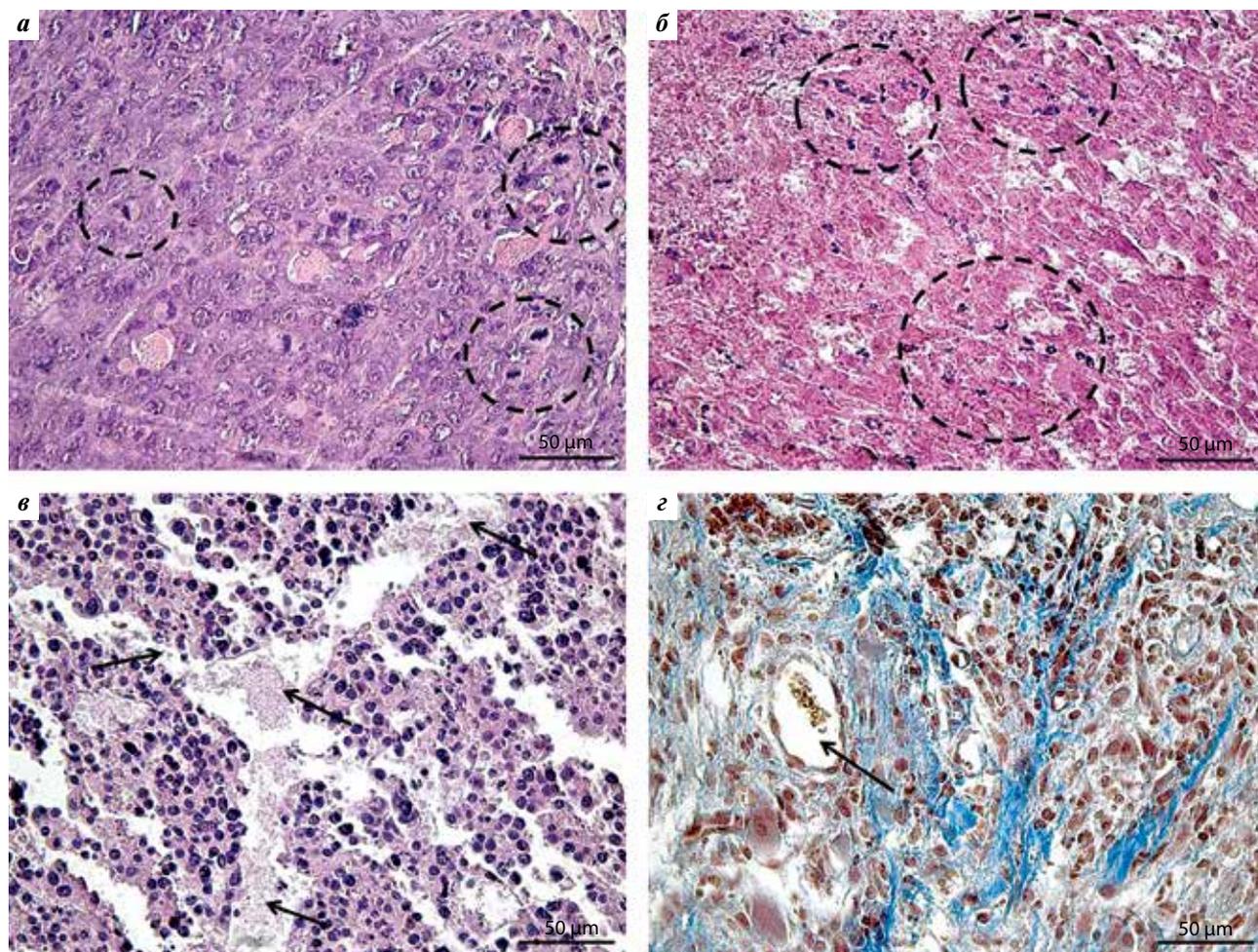
### Исследование влияния фактора некроза опухоли $\alpha$ в составе искусственной вирусоподобной частицы на морфологию экспериментальной опухоли

Как известно, противоопухолевый эффект ФНО- $\alpha$  реализуется, помимо цитотоксического воздействия на клетки опухоли, посредством 2 основных механизмов: через повреждение кровеносных сосудов опухоли и индукцию противоопухолевого иммунного ответа [15, 16]. В связи с этим для уточнения механизмов действия ФНО- $\alpha$  в средстве доставки было проведено исследование морфологии первичной опухоли, состояния кровеносных сосудов и присутствия эффекторных клеток иммунной системы в ткани опухоли после внутривенного введения препарата в сравнении с показателями контрольных животных.

На гистологических срезах опухолевых узлов меланомы B16F10, трансплантированной мышам C57Bl/6 контрольной группы, наблюдали участки некроза и зоны деструктивных изменений клеток, занимающих около 50 % площади среза через 1 сут после последнего введения физиологического раствора (16-е сутки после перевивки) и 45 % – через 7 сут после окончания инъекций (21-е сутки после перевивки). Деструктивные изменения меланомы сопровождалась отеком ткани. Визуально неизменные опухолевые клетки были плотно расположены, их границы плохо различались. Эти клетки занимали около 30–40 % (у 3 из 5 мышей) и 50–70 % (у 2 из 5 мышей) площади среза опухолевого узла. В участках некроза и зонах деструкции целостность кровеносных сосудов была нарушена, наблюдались выход эритроцитов в поврежденную ткань опухоли и разрушение некоторых сосудов.

Площадь участков некроза и зон деструкции (43 %) на гистологических срезах меланомы B16F10 через 1 сут после последнего введения ВПЧ-ФНО- $\alpha$  в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ достоверно не отличалась от параметров контрольной группы. Однако отек ткани в зонах деструкции был более выраженным.

На срезах опухолевых узлов, взятых через 1 сут после окончания инъекций ВПЧ-ФНО- $\alpha$  в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь, выявлено более обширное повреждение опухолевой ткани по сравнению с контрольной группой и группой мышей, получавших препарат в меньшей дозе. Участки некроза и зоны деструкции



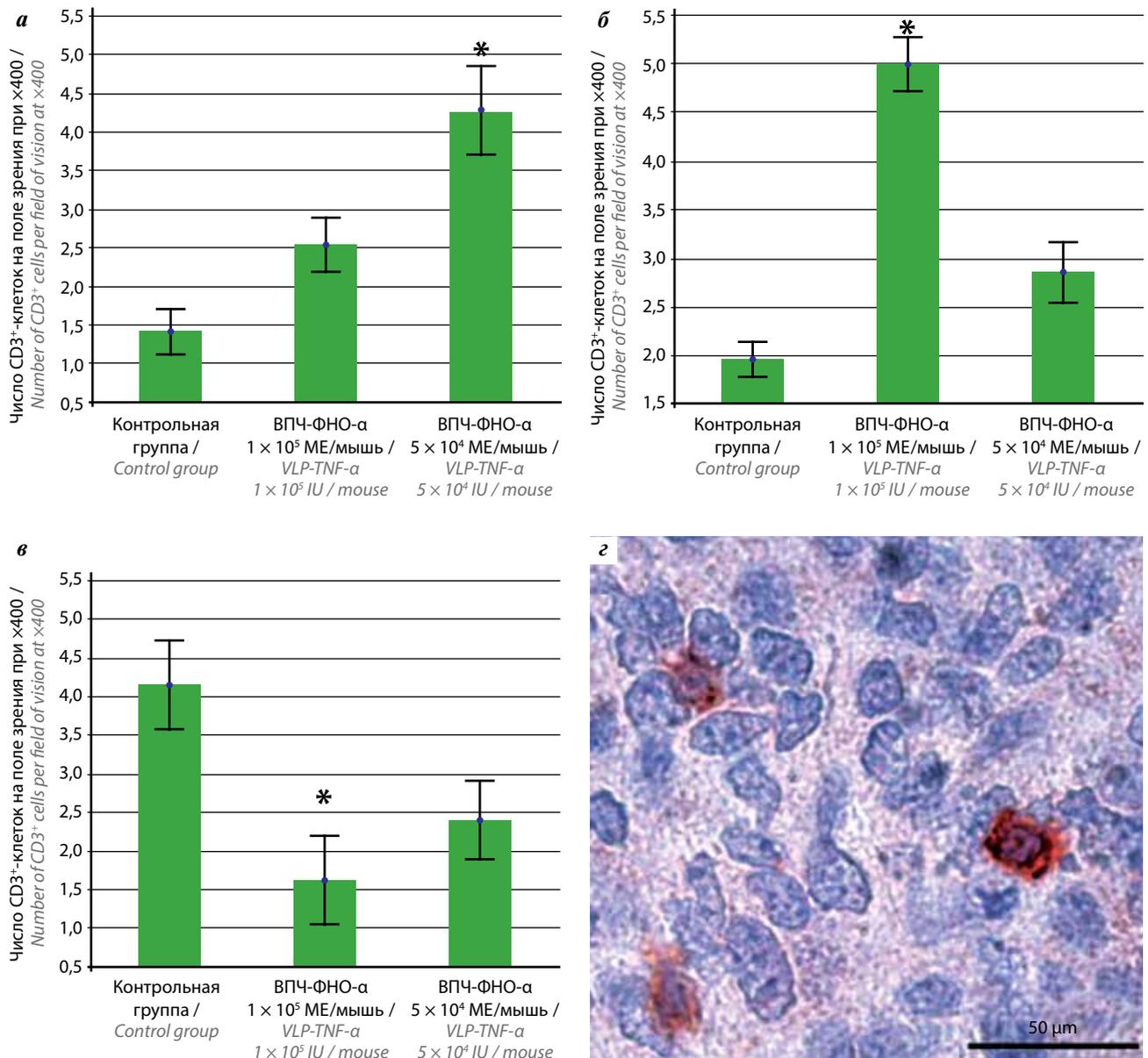
**Рис. 3.** Гистологические срезы меланомы B16F10, привитой мышам C57Bl/6, через 1 сут после последнего введения фактора некроза опухоли  $\alpha$  в составе искусственной вирусоподобной частицы ( $1 \times 10^6$  ME/мышь): а – митозы в ткани опухоли (выделены пунктирной линией); б – внеклеточные структуры, сходные с хромосомами, окрашенные базофильно (выделены пунктирной линией); в – кровеносные сосуды с поврежденными стенками, агрегацией и лизисом эритроцитов (стрелки) в окружении поврежденных клеток опухоли (зона деструкции); г – коллагеновые волокна в опухоли (синего цвета), показан кровеносный сосуд с агрегировавшими эритроцитами (стрелка). Световая микроскопия, окраска гематоксилин-эозином (а–в) и пикро-Маллори (г)

**Fig. 3.** Histological sections of B16F10 melanoma inoculated into C57Bl/6 mice, a day after the last administration of tumor necrosis factor  $\alpha$  ( $1 \times 10^6$  IU/mouse): а – mitoses in the tumor tissue (marked with circles); б – extracellular structures similar to chromosomes, basophilic staining (marked with circles); в – blood vessels with damaged walls, aggregation and lysis of erythrocytes (arrows) surrounded by damaged tumor cells (destruction zone); г – collagen fibers in the tumor (blue), a blood vessel with aggregated erythrocytes (arrow). Light microscopy, hematoxylin-eosin (а–в) and picro-Mallory (г) staining

занимали около 80–90 % площади среза опухоли. В зонах деструкции опухолевых узлов наблюдались отек, клеточный детрит, измененные клетки меланомы, поврежденные сосуды. В то же время в ткани опухоли нередко встречались опухолевые клетки в состоянии митоза (рис. 3а). В зонах некроза и деструкции обнаружены структуры, по морфологии и размеру сходные с метафазными хромосомами опухолевых клеток, окрашенными базофильно (рис. 3б). По-видимому, введение препарата оказывает деструктивное действие на делящиеся клетки меланомы, в результате разрушения которых метафазные хромосомы оказываются в межклеточном пространстве. В ткани опухоли чаще, чем в других группах, наблю-

дались коллагеновые волокна (рис. 3г), указывающие на «оголение» соединительнотканной стромы вследствие разрушения опухолевых клеток. У 2 из 5 мышей отмечено замещение участка некроза соединительной тканью на ~5–7 % площади среза опухоли. Неизмененные опухолевые клетки занимали ~10–15 % площади среза. В опухолевых узлах отмечено повреждение ~70 % всех кровеносных сосудов, преимущественно в участках некроза и зонах деструкции опухолевой ткани (рис. 3з). У 1 из 5 мышей повреждены все кровеносные сосуды опухоли.

Таким образом, введение препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$  приводит к выраженным деструктивным изменениям клеток меланомы B16F10 и кровеносных сосудов,



**Рис. 4.** Число CD3<sup>+</sup>-клеток в разных участках меланомы B16F10 у мышей: а – в визуально неповрежденной ткани; б – в разрушенной ткани опухоли; в – в соединительной ткани, окружающей опухоль; \* – достоверные отличия;  $p \leq 0,05$  по сравнению с контрольной группой; г – CD3<sup>+</sup>-клетки в ткани меланомы (окрашены в красный цвет), хромоген АЕС, докраска гематоксилином

**Fig. 4.** Number of CD3<sup>+</sup>-cells in different parts of B16F10 melanoma in mice: а – in the visually intact tissue; б – in the damaged tumor tissue; в – in the connective tissue surrounding the tumor; \* – significant differences;  $p \leq 0.05$ , compared to the control group; г – CD3<sup>+</sup>-cells in melanoma tissue (stained red), AEC chromogen, additional staining with hematoxylin

степень которых несколько варьирует у разных животных, что может быть обусловлено их индивидуальными особенностями. Очевидно, наблюдаемое уменьшение размера опухоли обусловлено данными изменениями.

Чтобы проверить предположение об активации под действием ВПЧ-ФНО-α противоопухолевой иммунной реакции, был проведен иммуногистохимический анализ эффекторных клеток иммунной системы (Т-лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов), которые выявляли по наличию маркеров CD3 и CD11b.

На срезах узлов меланомы B16F10 мышей контрольной группы немногочисленные CD3<sup>+</sup>-клетки (Т-лимфоциты) встречались в соединительной ткани, прилегающей к опухоли, в визуально неповрежденной и разрушающейся ткани меланомы (рис. 4). В опытных группах мышей отмечено снижение числа CD3<sup>+</sup>-клеток в соединительной ткани и увеличение в опухоли. Количество CD3<sup>+</sup>-клеток при введении препарата в дозе 5 × 10<sup>4</sup> МЕ/мышь возрастало в неповрежденной опухолевой ткани, тогда как введение препарата в дозе 1 × 10<sup>5</sup> МЕ/мышь приводило к увеличению числа

меченых клеток в разрушенной или разрушающейся ткани опухоли. Это наблюдение указывает на влияние препарата на миграцию в опухоль эффекторных клеток иммунной системы, механизмы которого нуждаются в дополнительном исследовании.

Введение ВПЧ-ФНО- $\alpha$  в дозе  $5 \times 10^4$  МЕ/мышь животным с трансплантированной меланомой V16F10 сопровождалось повышением в опухоли числа клеток, экспрессирующих рецептор адгезии CD11b (гранулоциты, моноциты). CD11b<sup>+</sup>-клетки локализовались поодиночке и в виде небольших скоплений исключительно в разрушенной и разрушающейся ткани меланомы, а их количество в 2,5 раза превышало контрольный уровень ( $110 \pm 15$  клеток в поле зрения при  $\times 400$ , в контрольной группе –  $44 \pm 6$ ,  $p \leq 0,05$ ).

Как известно, инфильтрация опухолевых узлов лимфоцитами указывает на активацию противоопухолевых иммунных реакций, приводящих к деструкции опухолевой ткани [17, 18]. Способность цитокинов индуцировать миграцию (рекрутирование) лейкоцитов, особенно Т-клеток, в опухоль является одним из наиболее привлекательных свойств этих белков с точки зрения иммунотерапии рака [19, 20]. Можно предположить, что наблюдаемый рост числа CD3<sup>+</sup>- и CD11b<sup>+</sup>-лимфоцитов при введении ВПЧ-ФНО- $\alpha$  является одним из факторов, определяющих эффективность его противоопухолевого действия.

Таким образом, данные гистологического и иммуногистохимического исследования меланомы V16F10, привитой мышам C57Bl/6 и подвергнутой воздействию препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$ , подтверждают, что наиболее выраженным разрушительным влиянием на опухоль обладает препарат в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь. Деструктивное воздействие затрагивает как опухолевые клетки, так и кровеносные сосуды. Препарат способствует увеличению количества CD3<sup>+</sup>- и CD11b<sup>+</sup>-лимфоцитов в ткани меланомы, что подтверждает наличие у него иммуномодулирующего действия.

### Заключение

Проведенное исследование показало, что внутривенное введение препарата ФНО- $\alpha$  в составе средства доставки ВПЧ оказывает противоопухолевый эффект на меланому V16F10, который выражается в замедлении роста и деструктивных изменениях первичного опухолевого узла. Наиболее выраженным и стабильным эффектом препарата был при его 5-кратном введении в дозе  $1 \times 10^5$  МЕ/мышь. Деструкция опухолевой ткани под действием ВПЧ-ФНО- $\alpha$  сопровождалась разрушением кровеносных сосудов опухоли и повышением в опухолевой ткани содержания эффекторных клеток иммунной системы. Полученные данные позволяют предполагать возможность успешного применения препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$  в дальнейшем для лечения злокачественных новообразований, в частности меланомы.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee S., Margolin K. Cytokines in cancer immunotherapy. *Cancers* 2011;3(4): 3856–93. DOI: 10.3390/cancers3043856.
- Lejeune F.J., Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment. *Bull Cancer* 2006;93(8):90–100.
- Roberts N.J., Zhou S., Diaz L.A.Jr., Holdhoff M. Systemic use of tumor necrosis factor alpha as an anticancer agent. *Oncotarget* 2011;2(10):739–51. DOI: 10.18632/oncotarget.344.
- Dai Y.C., Yang S.M., Wang X. et al. Antitumor effect and mechanism of action of a tumor-targeting recombinant human tumor necrosis factor- $\alpha$  fusion protein mediated by urokinase. *Mol Med Rep* 2015;11(6):4333–40. DOI: 10.3892/mmr.2015.3313.
- Gong J., Tan G., Sheng N. et al. Targeted treatment of liver metastasis from gastric cancer using specific binding peptide. *Am J Transl Res* 2016;8(5):1945–56.
- Волосникова Е.А., Демин И.Ф., Левагина Г.М. и др. Синтез конъюгатов фактора некроза опухоли альфа с алендроновой кислотой. *Биоорганическая химия* 2016;42(6):704–11. [Volosnikova E.A., Demin I.F., Levagina G.M. et al. The synthesis of TNF- $\alpha$  conjugates with alendronic acid. *Biorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2016;42(6):704–11. (In Russ.)].
- Xu G., Gu H., Hu B. et al. PEG-b-(PELG-g-PLL) nanoparticles as TNF- $\alpha$  nanocarriers: potential cerebral ischemia/reperfusion injury therapeutic applications. *Int J Nanomedicine* 2017;12:2243–54. DOI: 10.2147/IJN.S130842.
- Farma J.M., Puhlmann M., Soriano P.A. et al. Direct evidence for rapid and selective induction of tumor neovascular permeability by tumor necrosis factor and a novel derivative, colloidal gold bound tumor necrosis factor. *Int J Cancer* 2007;120(11):2474–80. DOI: 10.1002/ijc.22270.
- Messerschmidt S.K., Musyanovych A., Altwater M. et al. Targeted lipid-coated nanoparticles: delivery of tumor necrosis factor-functionalized particles to tumor cells. *J Control Release* 2009;137(1):69–77.
- Масычева В.И., Лебедев Л.Р., Даниленко Е.Д. и др. Противоопухолевое средство на основе наночастиц, несущих рекомбинантный фактор некроза опухоли альфа человека. Патент РФ № 2386447, опубли. 20.04.2010, заявка № 2008140246/15 от 13.10.2008. [Masycheva V.I., Lebedev L.R., Danilenko E.D. et al. Anticancer drug based on nanoparticles bearing recombinant human tumor necrosis factor alpha. Patent № 2386447 RU C1. N 2008140246/15. Priority from 13.10.2008; date of publ. 20.04.2010. (In Russ.)].
- Гамалей С.Г., Батенева А.В., Сысоева Г.М. и др. Фармакокинетика и противоопухолевые свойства препарата ФНО- $\alpha$  в составе наночастиц. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2010;149(3):320–3. Доступно по: <https://doi.org/10.1007/s10517-010-0937-9>. [Gamaley S.G., Bateneva A.V., Sysoeva G.M. et al. Pharmacokinetics and antitumor effects

- of the drug containing TNF- $\alpha$  in nanoparticles. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bull Exp Biol Med* 2010;149(3):320–3. (In Russ.).
12. Гамалей С.Г., Даниленко Е.Д., Батенева А.В. и др. Фармакокинетика молекулярной конструкции для депонирования и транспортировки к клеткам-мишеням биологически активных веществ. *Сибирский медицинский журнал = The Siberian Medical Journal* 2008;23(3):92–5. [Gamaley S.G., Danilenko E.D., Bateneva A.V. et al. Pharmacokinetics of molecular construction for deposition and transportation of biologically active substances to target cells. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal* 2008;23(3):92–5. (In Russ.)].
  13. Tandle A., Hanna E., Lorang D. et al. Tumor vasculature-targeted delivery of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cancer* 2009;115(1):128–39. DOI: 10.1002/cncr.24001.
  14. Jiang J., Bischof J. Effect of timing, dose and interstitial versus nanoparticle delivery of tumor necrosis factor alpha in combinatorial adjuvant cryosurgery treatment of ELT-3 uterine fibroid tumor. *Cryo Letters* 2010;31(1):50–62.
  15. Manzo T., Sturmheit T., Basso V. et al. T-cells redirected to a minor histocompatibility antigen instruct intratumoral TNF $\alpha$  expression and empower adoptive cell therapy for solid tumors. *Cancer Res* 2017;77(3):658–71. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0725.
  16. Porcellini S., Asperti C., Valentini B. et al. The tumor vessel targeting agent NGR-TNF controls the different stages of the tumorigenic process in transgenic mice by distinct mechanisms. *Onco-immunology* 2015;4(10):1041700. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1041700.
  17. Tang H., Qiao J., Fu Y.X. Immunotherapy and tumor microenvironment. *Cancer Lett* 2016;370(1):85–90. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.009.
  18. Tähtinen S., Kaikkonen S., Merisalo-Soikkeli M. et al. Favorable alteration of tumor microenvironment by immunomodulatory. Cytokines for efficient T-cell therapy in solid tumors. *PLoS One* 2015;10(6):0131242. DOI: 10.1371/journal.pone.0131242.
  19. Fisher T.S., Hooper A.T., Lucas J. et al. A CD3-bispecific molecule targeting P-cadherin demonstrates T cell-mediated regression of established solid tumors in mice. *Cancer Immunol Immunother* 2018;67(2):247–59. DOI: 10.1007/s00262-017-2081-0.
  20. Gooden M.J., de Bock G.H., Leffers N. et al. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer* 2011;105(1):93–103. DOI: 10.1038/bjc.2011.189.

**Вклад авторов**

Г.М. Сысоева: разработка дизайна исследования, получение и анализ экспериментальных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи;

Е.И. Рябчикова: получение и анализ данных, редактирование текста статьи;

О.В. Симакова: получение и анализ экспериментальных данных;

Е.А. Волосникова: характеристика экспериментальных образцов препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$ ;

Л.Р. Лебедев: получение экспериментальных образцов препарата ВПЧ-ФНО- $\alpha$ ;

Е.Д. Даниленко: разработка дизайна исследования, анализ экспериментальных данных, редактирование текста статьи.

**Author's contributions**

G.M. Sysoeva: developing the research design, obtaining and analysis of experimental data, reviewing publications on the topic, article writing;

E.I. Ryabchikova: obtaining and analysis of data, editing article text;

O.V. Simakova: obtaining and analysis of experimental data;

E.A. Volosnikova: characterization of experimental samples of the drug VLP-TNF- $\alpha$ ;

L.R. Lebedev: obtaining experimental samples of the drug VLP-TNF- $\alpha$ ;

E.D. Danilenko: analysis of experimental data, editing article text.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Г.М. Сысоева/G.M. Sysoeva: <https://orcid.org/0000-0001-7064-4117>

Е.И. Рябчикова/E.I. Ryabchikova: <https://orcid.org/0000-0003-4714-1524>

О.В. Симакова/O.V. Simakova: <https://orcid.org/0000-0002-1222-7574>

Е.А. Волосникова/E.A. Volosnikova: <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Л.Р. Лебедев / L.R. Lebedev: <https://orcid.org/0000-0001-9886-4939>

Е.Д. Даниленко / E.D. Danilenko: <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнюю перспективу», Государственный контракт № 14.N08.12.0089 от 29.08.2016 г.

**Financing.** The work was carried out with the financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation in the framework of the Federal target program “Development of the pharmaceutical and medical industry of the Russian Federation for the period up to 2020 and beyond”, State contract No. 14.N08. 12. 0089 from 29.08.2016.

**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:** 12.07.2019. **Принята к публикации:** 19.12.2019.

**Article submitted:** 12.07.2019. **Accepted for publication:** 19.12.2019.





