

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

2

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. Щубина**, 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

2 ^{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: bioterapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Адрес издательства:
115478, Москва,
Каширское шоссе, 24,
стр. 15, НИИ канцерогенеза, 3-й этаж.

Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Редактор Т.Н. Николаенко
Корректор Т.Н. Помилуйко
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.
Регистрационный номер:
№ 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.

При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Российский биотерапевтический
журнал. 2020. Том 19. № 2. 1–76.
© 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/
usefull/journals/138/](http://www.ronc.ru/specialists/usefull/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

2^{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
rbjournal@ronc.ru

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

Editor T.N. Nikolaenko
Proofreaders T.N. Pomiluyko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИИ № 77-11695 dated 21.01.2002; ПИИ № ФЦ77-53039 dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2020. Volume 19. No 2. 1–76.
© PH "ABV-Press", 2020
Rospechat' catalogue index: 81679
Printed at the Mediacolor LLC 1,000 copies
<https://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>
<https://bioterapevt.elpub.ru>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Д.Л. Ротин, О.В. Паклина, И.О. Тинькова, Д.Н. Греков, Г.Р. Сетдикова</i> Современные представления о прогностической/предиктивной роли и оценке рецептора HER2 при раке желудка. Обзор литературы	6
<i>О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, М.В. Киселевский</i> Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 1)	13
<i>С.В. Чулкова, Н.Н. Субботина, Г.Д. Петрова, Н.В. Сидорова, О.П. Колбацкая, Н.Н. Тупицын, А.Ю. Нуртазина</i> Восстановление В-клеточного иммунитета после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток	22
<i>Г.М. Волгарева</i> Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 2. ВПЧ-ассоциированные формы рака в России. Профилактические ВПЧ-вакцины	31

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>А.С. Гриневич, И.В. Чинарева, О.С. Бурова, П.К. Иванов</i> Создание флуоресцентных зондов методом модификации олигосахаридов моноклональных антител флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом	39
<i>Н.Н. Тупицын, Т.М. Джуманазаров, А.Д. Палладина, А.К. Аллахвердиев, С.В. Чулкова, П.В. Кононец</i> Иммунологические показатели костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого	47
<i>А.А. Крашенинникова, В.В. Заварзина, Д.С. Панова, Н.В. Гукасова, С.Л. Кузнецов, И.А. Тубашева, В.Ю. Балабаньян, Ю.И. Полтавец</i> Оценка токсикологических свойств доцетаксела в составе фолатмодифицированных полимерных частиц в эксперименте <i>in vivo</i>	55
<i>Н.П. Ермакова, И.Б. Меркулова, О.И. Коняева, В.А. Чалей, Т.В. Абрамова, В.М. Бухман, С.В. Яроцкий, К.В. Лобанов, Н.Ю. Кульбачевская</i> Доклиническое изучение субхронической токсичности лекарственного средства на основе акадесина на крысах	65

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ	74
-------------------------------------	----

REVIEWS

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

Current point of view on prognostic and predictive roles and practical application of HER2 receptor's detection. Literature review 6

O.A. Bocharova, R.V. Karpova, E.V. Bocharov, A.A. Vershinskaya, M.A. Baryshnikova, I.V. Kazeev, V.G. Kucheryanu, M.V. Kiselevskiy

Phytoadaptogens in the tumours biotherapy and geriatrics (Part 1) 13

S.V. Chulkova, N.N. Subbotina, G.D. Petrova, N.V. Sidorova, O.P. Kolbatskaya, N.N. Tupitsyn, A.U. Nurtazina

Reconstitution of B-cells immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation 22

G.M. Volgareva

Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges.

Part 2. HPV-associated cancers in Russia. Preventive HPV vaccines 31

ORIGINAL REPORTS

A.S. Grinevich, I.V. Chinareva, O.S. Burova, P.K. Ivanov

Fluorescent modification of the monoclonal antibodies oligosaccharides by fluorescein-5-thiosemicarbazide 39

N.N. Tupitsyn, T.M. Dzgumanazarov, A.D. Palladina, A.K. Allahverdiev, S.V. Chulkova, P.V. Kononetz

Immunological parameters of bone marrow in non-small cell lung cancer 47

A.A. Krashenninnikova, V.V. Zavarzina, D.S. Panova, N.V. Gukasova, S.L. Kuznetsov, I.A. Tubasheva, V.Yu. Balabanyan, Yu.I. Poltavets

Assessment of the toxicological properties of docetaxel loaded folate-modified polymer particles *in vivo*. 55

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

Preclinical study of subchronic toxicity of the drug on the basis of acadesine in rats. 65

INFORMATION FOR AUTHORS 74

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРОГНОСТИЧЕСКОЙ/ПРЕДИКТИВНОЙ РОЛИ И ОЦЕНКЕ РЕЦЕПТОРА HER2 ПРИ РАКЕ ЖЕЛУДКА. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

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

ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»;
Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5, к. 33

Контакты: Ирина Олеговна Тинькова tinkovairen74@yandex.ru

Рецептор 2 эпидермального фактора роста человека (HER2) — протоонкоген, участвующий в передаче сигналов пролиферации и дифференцировки. Гиперэкспрессия и амплификация гена HER2 хорошо изучены при раке молочной железы. Данные о гиперэкспрессии HER2 при раке желудка (РЖ) широко варьируют, часто разрозненны. Интерпретация HER2 при РЖ и раке молочной железы отличается. Этот обзор суммирует сведения, касающиеся оценки HER2 при РЖ для подбора таргетной терапии. В базах данных медицинской литературы был проведен поиск, изучены и проанализированы более 100 современных источников по теме. Отобраны и изложены самые значимые — об оценке экспрессии HER2 при РЖ, его прогностическом/предиктивном значении. В результате выделены варианты оценки экспрессии рецептора HER2 в операционном и биопсийном материале РЖ. Приведены сравнительные данные о применении различных клонов антител для решения названной задачи. Разобраны наиболее частые и важные ошибки и возможные нарушения интерпретации в экспрессии HER2 при РЖ. Применение трастузумаба для таргетной терапии при РЖ делает обязательным тестирование операционного и биопсийного материала в отношении экспрессии HER2. Прогресс различных методов молекулярной биологии оставляет иммуногистохимию основную роль в решении данной задачи. Дальнейшее исследование РЖ нуждается в единой стандартизированной системе оценки экспрессии HER2, интерпретации результатов.

Ключевые слова: прогноз, предиктивные факторы, HER2, иммуногистохимия, рак желудка

Для цитирования: Ротин Д.Л., Паклина О.В., Тинькова И.О. и др. Современные представления о прогностической/предиктивной роли и оценке рецептора HER2 при раке желудка. Обзор литературы. Российский биотерапевтический журнал 2020; 19(2):6–12.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-6-12



CURRENT POINT OF VIEW ON PROGNOSTIC AND PREDICTIVE ROLES AND PRACTICAL APPLICATION OF HER2 RECEPTOR'S DETECTION. LITERATURE REVIEW

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

Botkin City clinical hospital; 5 2nd Botkinskiy proezd, Moscow 125284, Russia

Human epidermal growth factor receptor HER2, a proto-oncogene involved in the proliferation and differentiation signaling pathway. The overexpression and amplification of the HER2 gene and their significance have been studied in breast cancer. Data on HER2 overexpression in gastric cancer vary widely, and the value is presented by inconsistent disparate data. The interpretation of HER2 in gastric cancer differs from the evaluation in breast cancer. The purpose of this review is to summarize current data on the evaluation of HER2 in gastric cancer for the selection of targeted therapy. The search in modern databases of medical literature was carried out, more than 100 modern literary sources on the above-mentioned topic were studied and analyzed in detail and carefully. The most significant data on the evaluation of HER2 expression in gastric cancer and its prognostic and predictive value were selected and presented. Selected options evaluate the expression of HER2 receptor in operating and biopsy material of stomach cancer. Comparative data on the use of different antibody clones to solve the above problem are presented. The most frequent and important errors and possible interpretation disorders in the expression of HER2 in gastric cancer are analyzed. The use of trastuzumab for targeted therapy in gastric cancer makes it mandatory to test surgical and biopsy samples of gastric cancer to assess their expression of HER2. The development of various methods and the progress of molecular biology, however, the main role of the immunohistochemical method in solving this problem still left. Gastric cancer needs a single accessible standardized system for evaluating HER2 expression, and, most importantly, expert level interpretation of these results.

Key words: prognosis, predictive, HER2, immunohistochemistry, gastric cancer

For citation: Rotin D.L., Paklina O.V., Tin'kova I.O. et al. Current point of view on prognostic and predictive roles and practical application of HER2 receptor's detection. Literature review. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):6–12. (In Russ.).

Введение

Новые молекулярные классификации рака желудка (РЖ) открывают широкие горизонты для применения персонализированной медицины, а также требуют от современной патоморфологии максимально точного определения различных маркеров для таргетного лечения [1]. Рецептор 2 эпидермального фактора роста человека – HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2; синонимы: CerbB-2, ERBB2) – протоонкоген, локализующийся на длинном плече хромосомы 17 (17q21). HER2 кодирует трансмембранный белок с тирозинкиназной активностью, член семейства рецепторов HER, вовлеченный в пути передачи сигналов, ведущих к клеточному росту и дифференцировке [2]. Впервые гиперэкспрессию и амплификацию гена *HER2* открыли при раке молочной железы (РМЖ), когда они были достоверно связаны с плохим прогнозом заболевания [3]. Позже многочисленные исследования показали, что изменения *HER2* присутствуют в ряде других злокачественных новообразований, в том числе колоректальном раке, раке предстательной железы, яичников, легкого и особенно желудка [4].

Согласно данным литературы, частота встречаемости гиперэкспрессии HER2 при РЖ широко варьирует, а в отношении прогностического значения данного гена представлены непоследовательные разрозненные данные [5–13]. Широкое применение трастузумаба в лечении метастатического РЖ привело к тому, что существенно возросли требования к оценке HER2. Интерпретация изменения HER2 при РЖ кардинально отличается от его оценки при РМЖ. Характерная для РЖ внутриопухолевая гетерогенность белка-гена *HER2* проявляется в фокальности реакции, неполном мембранном окрашивании при иммуногистохимии (ИГХ) [14].

Частота гиперэкспрессии *HER2* при РЖ варьирует от 4,4 до 53,4 % со средним показателем 17,9 % [5–15]. При исследовании небольших серий нередко отрицается прогностическое значение амплификации *HER2* при РЖ [5–7, 10, 13], хотя большинство работ указывают на более агрессивное биологическое поведение и высокую частоту рецидивов при *HER2*-положительном РЖ [2, 7–9, 12, 15]. Анализ 42 исследований с общим числом 12 749 пациентов показал, что в большинстве публикаций (71 %) установлена связь между худшей выживаемостью, прогнозом заболевания и *HER2*-положительным статусом опухоли [15]. Таким образом, гиперэкспрессия и амплификация

HER2 являются негативными прогностическими факторами, связанными с развитием РЖ [8, 15].

Цель настоящего обзора – суммировать актуальные данные об изменениях HER2 при РЖ, чтобы представить современное состояние количественной оценки HER2 для таргетной терапии.

HER2 и молекулярная таргетная терапия

Трастузумаб – моноклональное антитело, направленное на *HER2*, полученное в качестве одного из первых молекулярно-таргетных препаратов и предложенное для лечения *HER2*-положительного РМЖ [3]. До сих пор нет единого мнения о механизме действия трастузумаба на клетки опухоли, однако имеются доказательства, что действие препарата предотвращает димеризацию *HER2* вместе с другими членами семейства *HER*, стимулирует эндоцитоз опухолевых клеток, а также ингибирует ангиогенез [16]. В клиническом исследовании ToGA пациенты с нерезектабельным *HER2*-положительным РЖ получали химиотерапию и трастузумаб или только химиотерапию. Статистически значимое увеличение общей выживаемости наблюдалось в группе получавших трастузумаб [17]. В том же исследовании отмечено увеличение медианы общей выживаемости (4,2 мес) у пациентов с *HER2*-положительными опухолями [15, 17–19]. Помимо трастузумаба тестировались и продолжают тестироваться другие молекулярные *HER2*-таргетные препараты: пертузумаб, лапатиниб, афатиниб и конъюгат антител трастузумаб эмтанзин (TDM-1) [20–24], но в сравнении с трастузумабом их эффективность ниже [23, 25]. Трастузумаб – первый молекулярный таргетный агент, одобренный для лечения РЖ. Определение *HER2*-статуса в метастатическом РЖ является обязательным для подбора таргетной терапии.

HER2: методы определения

HER2-статус оценивается при помощи ИГХ или гибридизации *in situ* (ISH). Для обоих методов пригоден и биопсийный, и операционный материал после рутинной гистологической обработки на срезах с обычных парафиновых блоков [26]. «Золотым стандартом» для определения *HER2*-статуса считается метод флуоресценции и гибридизации *in situ* (FISH), но он применяется лишь в спорных случаях при неясной ИГХ-реакции в связи с его высокой стоимостью и необходимостью использования флуоресцентного микроскопа. Большая конкордантность между FISH и ИГХ позволяет применять метод ИГХ как наиболее

простой и экономичный для большинства лабораторий [27–30]. Альтернативой методу FISH при исследовании случаев с сомнительной экспрессией является применение других, более доступных техник в методе гибридизации *in situ*, таких как «серебрение с гибридизацией *in situ*» (SISH) или «хромоген с гибридизацией *in situ*» (CISH). Эти методы требуют использования лишь обычного светового микроскопа, их результаты хорошо коррелируют с результатами FISH [31–33].

С учетом доступности и распространенности ИГХ в патологоанатомических лабораториях сфокусируемся именно на этом методе оценки HER2-статуса.

Различия в экспрессии *HER2* при раке молочной железы и раке желудка [17, 30]

Мембранная экспрессия антитела против *HER2* в опухолевых клетках при РМЖ, как правило, периферическая, в то время как при РЖ обычно неполная, преимущественно базолатеральная (подковообразная или в виде буквы U) или латеральная (параллельные линии) (рис. 1, 2). То есть округлый «замыкательный» тип окрашивания ИГХ не является критерием для оценки *HER2*, в отличие от РМЖ.

Внутриопухолевая гетерогенность — наличие областей с различной экспрессией *HER2* в пределах

одной и той же опухоли — частый тип экспрессии (он же «фокально положительный»), встречающийся при РЖ, но редко наблюдаемый при РМЖ. Данное обстоятельство может привести к ошибкам при исследовании случайно взятых участков опухоли. Причины внутриопухолевой гетерогенности *HER2* до сих пор неясны, однако ученые предполагают вероятное наследование опухолью генетической гетерогенности [34, 35]. С тех пор как *Helicobacter pylori* широко признана в качестве основного этиологического агента РЖ [36], существует версия, что связь с гетерогенностью *HER2* при РЖ обусловлена воздействием на опухолевые клетки различных бактериальных факторов или разных штаммов инфекции. N. Tegtmeyer и соавт. показали возможность некоторых штаммов *H. pylori* активировать *HER2* [37], другие — подавлять его активность. Тем не менее данная корреляция штаммов *H. pylori* с гетерогенностью *HER2* при РЖ все еще нуждается в дальнейших исследованиях.

Вариация выраженности экспрессии *HER2* в зависимости от анатомической локализации опухоли не встречается при РМЖ, в то время как в желудке она чаще наблюдается в проксимальном отделе, включая пищеводно-желудочное соединение, в отличие от дистальных отделов желудка. Некоторые «высокие» опухоли, ранее попадавшие в категорию РЖ, сегодня

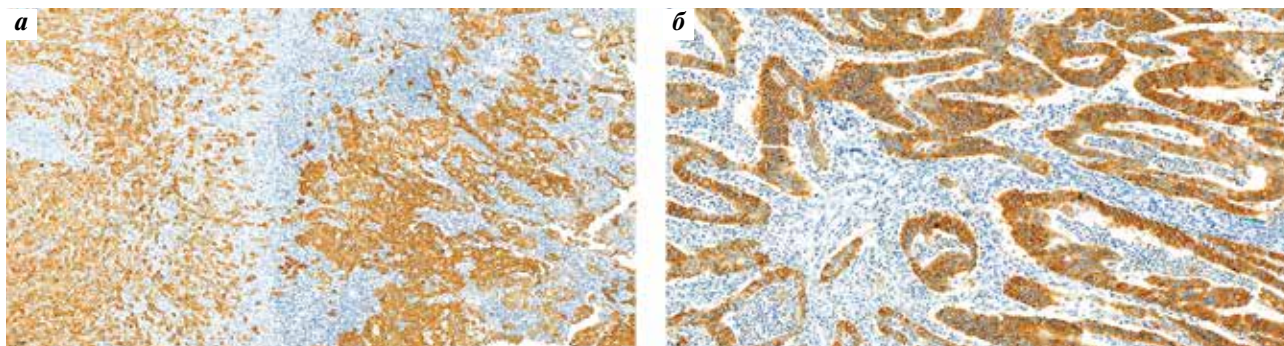


Рис. 1. Сильное полное мембранное окрашивание >10 % опухолевых клеток (3+): а — $\times 5$; б — $\times 10$

Fig. 1. Strong full membrane staining >10 % of the tumor cells (3+): а — $\times 5$; б — $\times 10$

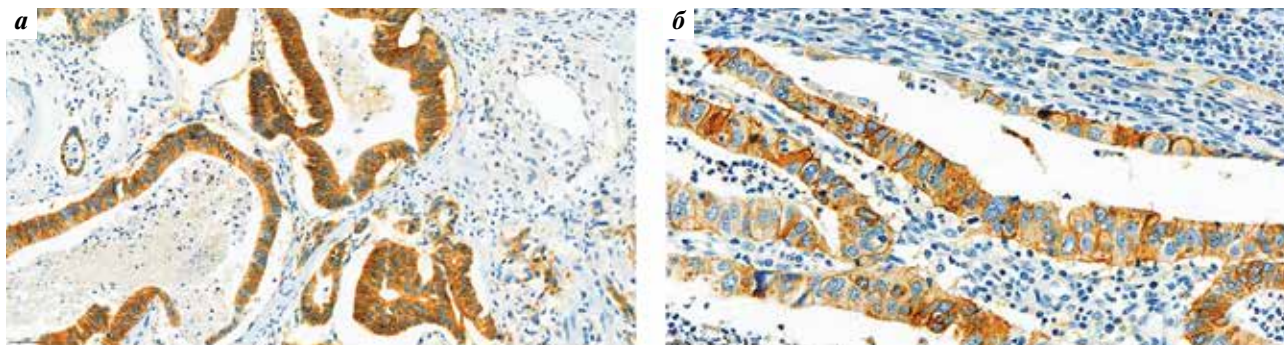


Рис. 2. Сильное базолатеральное окрашивание >10 % опухолевых клеток (3+): а — $\times 20$; б — $\times 40$

Fig. 2. Strong basolateral staining >10 % of the tumor cells (3+): а — $\times 20$; б — $\times 40$

Оценка иммуногистохимической экспрессии *HER2* при раке желудка и пищеводно-желудочного соединения [18]

Evaluation of HER2 IHC expression for gastric and gastro-esophageal carcinoma [18]

Баллы Score	Операционный материал Surgical sample	Биопсийный материал Biopsy sample	<i>HER2</i> -гиперэкспрессия <i>HER2</i> overexpression
0	Нет мембранного окрашивания или окрашено <10 % опухолевых клеток No membrane staining or stained <10 % of tumor cells	Нет мембранного окрашивания или окрашены лишь единичные клетки (менее 5 соединенных клеток) No membrane staining or only single cells stained (less than 5 connected cells)	Отрицательная Negative
1+	Окрашивание слабое или определяется только в 1 части мембраны в ≤10 % опухолевых клеток Staining is weak or determined only in 1 part of the membrane in ≤10 % of tumor cells	Окрашивание слабое или определяется только в 1 части мембраны в 5 соединенных клетках (как минимум) Staining is weak or determined only in 1 part of the membrane in 5 connected cells (at least)	Отрицательная Negative
2+	Умеренное/слабое полное или базолатеральное мембранное окрашивание в ≤10 % опухолевых клеток Moderate/weak complete or basolateral membrane staining in ≤10 % of tumor cells	Умеренное/слабое полное или базолатеральное мембранное окрашивание в 5 соединенных клетках (как минимум) Moderate/weak complete or basolateral membrane staining in 5 connected cells (at least)	Сомнительная Doubtful
3+	Сильное полное или базолатеральное мембранное окрашивание в ≤10 % опухолевых клеток Strong complete or basolateral membrane staining in ≤10 % of tumor cells	Сильное полное или базолатеральное мембранное окрашивание в 5 соединенных клетках (как минимум) Strong complete or basolateral membrane staining in 5 connected cells (at least)	Положительная Positive

считаются пищеводными или пищеводно-желудочного соединения. Эти карциномы часто имеют *HER2*-положительный статус [38].

Шкала оценки иммуногистохимии

На основании перечисленных отличий в экспрессии *HER2* при РМЖ и РЖ М. Hofmann и соавт. разработали систему оценки, предназначенную исключительно для опухолей желудка [39]. Авторы подчеркивают, что простой перенос системы оценки ИГХ-экспрессии *HER2* для РМЖ мог бы привести к сужению круга пациентов для таргетной терапии. Кроме того, в данной системе предусмотрены различные подходы в оценке *HER2*-статуса при РЖ между биопсийным и хирургическим операционным материалом [18]. Более подробно данные по оценке ИГХ-экспрессии *HER2* при РЖ приведены в таблице.

Различия между образцами

В результате внутриопухолевой гетерогенности, о чем сказано выше, размер исследуемого образца ткани может повлиять на результаты анализа *HER2*. Хотя первоначально система подсчета экспрессии *HER2* была сформулирована и предложена М. Hofmann для оценки и биопсии, и операционного материала, в небольшом количестве опухолей при сравнении пар образцов наблюдались не согласующиеся между собой результаты *HER2* [39, 40]. По-видимому, во внутриопухолевой гетерогенности заключается причина

разницы экспрессии *HER2* в первичной и в метастатической опухоли [34]. В одной из работ была показана значимая разница в экспрессии *HER2* на целом образце ткани при использовании теста microarray, множества различных образцов ткани при РЖ по 1 мм, собранных в единый парафиновый блок [14]. Исходя из ранее изложенного, рекомендуется исследовать несколько образцов опухоли от каждого пациента, по возможности исследовать и метастазы РЖ. Тестируя все доступные участки опухоли, можно максимально избежать ложных результатов. При этом, если имеется только материал диагностической гастробиопсии, необходимо исследовать как минимум 4 участка, содержащих опухолевые клетки [41]. Нужно перепроверять все образцы хирургического материала, особенно при отсутствии экспрессии *HER2* на биопсии, чтобы повысить шансы обнаружения *HER2*-положительного РЖ.

Антитела для иммуногистохимии

Результаты экспрессии *HER2* также могут различаться в зависимости от того, какие антитела используются для тестирования. Соответственно, выбор и использование антител могут повлиять на принятие решения об определении терапии. Оптимально антитело для ИГХ должно быть максимально адекватно чувствительным, чтобы отобрать наибольшее число возможных кандидатов на лечение, но также и высокоспецифичным, чтобы избежать ненужного лечения. В настоящее время доступны следующие коммерческие

антитела: HercepTest и A0485 (Dako; Glostrup, Дания), SP3 (Thermo Fisher Scientific, Lab Vision; Fremont, США), 4B5 (Ventana Medical Systems; Tucson, США) и CB11 (Novocastra; Newcastle upon Tyne, Великобритания). Отдельные исследования показали ощутимые различия в чувствительности и специфичности антител, используемых для определения *HER2* при РЖ [14, 30, 42]. Проводилось исследование сравнения HercepTest, SP3 и 4B5. Отмечено, что антитела 4B5 и SP3 показали схожее хорошее качество и высокую точность по сравнению с HercepTest [14]. Предполагается в качестве 1-й линии диагностики статуса *HER2* при РЖ использовать антитела 4B5 и SP3, но не HercepTest.

Заключение

Рекомендации по применению трастузумаба для лечения пациентов с запущенным РЖ делают обязательной оценку статуса *HER2* для отбора пациентов —

кандидатов для данных схем лечения. Развитие автоматизированных платформ и анализ изображений в перспективе расширит доступность гибридизации *in situ*, однако на сегодняшний день ИГХ остается основным методом тестирования и играет ведущую роль в оценке статуса *HER2*. Тем не менее общая надежность ИГХ-оценки *HER2* может испытывать влияние различных преаналитических, аналитических и постаналитических вариаций, о чем говорилось ранее. Таким образом, РЖ нуждается в стандартизированной единой системе оценки ИГХ-экспрессии *HER2*, а также экспертном уровне интерпретации этих данных. Необходимо продолжать поиск и разработку антител, которые позволили бы наиболее точно определять уровень экспрессии *HER2* при РЖ, что даст возможность оптимизировать и повысить эффективность лечения пациентов с этим грозным заболеванием.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ротин Д.Л., Паклина О.В., Тинькова И.О., Греков Д.Н. Микросателлитная нестабильность и карцинома желудка. Обзор литературы. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(4):17–24. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-17-24. [Rotin D.L., Paklina O.V., Tin'kova I.O., Grekov D.N. Microsatellite instability and gastric carcinoma. Review of the literature. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4):17–24. (In Russ.)].
2. Akiyama T., Sudo C., Ogawara H. et al. The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. Science 1986;232(4758):1644–6. DOI: 10.1126/science.3012781.
3. Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science 1987;235(4785):177–82. DOI: 10.1126/science.3798106.
4. Yan M., Schwaederle M., Arguella D. et al. HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. Cancer Met Rev 2015;34:157–64. DOI: 10.1007/s10555-015-9552-6.
5. Solomon B.I., Grrido-Laguna I. Upper gastrointestinal malignancies in 2017: current perspectives and future approaches. Future Oncol 2018;14(10):947–62. DOI: 10.2217/fon-2017-0597.
6. Oono Y., Kuwata T., Takashima K. et al. Clinicaopathological features and endoscopic findings of HER2-positive gastric cancer. Surg Endosc 2018;32(9):3964–71. DOI: 10.1007/s00464-018-6138-8.
7. Baykara M., Benekli M., Ekinici O. et al. Clinical significance of HER2 over-expression in gastric cancers. J Gastrointest Surg 2015;19:1565–71. DOI: 10.1007/s11605-015-2888-y.
8. Kurokawa Y., Matsuura N., Kimura Y. et al. Multicenter large-scale study of prognostic impact of HER2 expression in patients with resectable gastric cancer. Gastric Cancer 2015;18(4):691–7. DOI: 10.1007/s10120-014-0430-7.
9. Allgayer H., Babic R., Gruetznern K.U. et al. c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems. J Clin Oncol 2000;18(11):2201–9. DOI: 10.1200/jco.2000.18.11.2201.
10. Grabsch H., Sivakumar S., Gray S. et al. HER2 expression in gastric cancer: Rare, heterogeneous and of no prognostic value — conclusions from 924 cases of two independent series. Cell Oncol 2010;32(1–2):57–65. DOI: 10.3233/CLO-2009-0497.
11. Kim K.C., Koh Y.W., Chang H.M. et al. Evaluation of HER2 protein expression in gastric carcinomas: comparative analysis of 1,414 cases of whole-tissue sections and 595 cases of tissue microarrays. Ann Surg Oncol 2011;18(10):2833–40. DOI: 10.1245/s10434-011-1695-2.
12. Park D.I., Yun J.W., Park J.H. et al. HER-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. Dig Dis Sci 2006;51(8):1371–9. DOI: 10.1007/S10620-005-9057-1.
13. Wang S., Zheng G., Chen L., Xiong B. Effect of HER-2/neu over-expression on prognosis in gastric cancer: a meta-analysis. Asian Pac J Cancer Prev 2011;12(6):1417–23.
14. Cordero-García E., Baéz-Astúa A., Roa-Martínez Y. et al. Evaluation of the expression of the oncogene C-ERBB-2-HER2 in advanced gastric cancer cases from Costa Rica. Ecancer-medicalscience 2019;13:962. DOI: 10.3332/ecancer.2019.962.
15. Kin H., Seo S., Kim K. et al. Prognostic significance of the Human epidermal growth factor receptor-2 expression in patients with resectable gastric adenocarcinoma. World J Surg Oncol 2019;17(1):122. DOI: 10.1186/s12957-019-1652-2.
16. Hudis C.A. Trastuzumab — mechanism of action and use in clinical practice. N Engl J Med 2007;357(1):39–51. DOI: 10.1056/NEJMr043186.
17. Bang Y.J., van Cutsem E., Feyereislova A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet 2010;376(9742):687–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.
18. Rüschhoff J., Dietel M., Baretton G. et al. HER2 diagnostics in gastric cancer-guided

- define validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch* 2010;457(3):299–307. DOI: 10.1007/s00428-010-0952-2.
19. Van Cutsem E., Bang Y.J., Feng-Yi F. et al. HER2 screening data from ToGA: targeting HER2 in gastric and gastroesophageal junction cancer. *Gastric Cancer* 2015;18(3):476–84. DOI: 10.1007/s10120-014-0402-y.
 20. Kang Y.K., Rha S.Y., Tassone P. et al. A phase IIa dose-finding and safety study of first-line pertuzumab in combination with trastuzumab, capecitabine and cisplatin in patients with HER2-positive advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 2014;111(4):660–66. DOI: 10.1038/bjc.2014.356.
 21. Satoh T., Xu R.H., Chung H.C. et al. Lapatinib plus paclitaxel versus paclitaxel alone in the second-line treatment of HER2-amplified advanced gastric cancer in Asian populations: TyTAN – a randomized, phase III study. *J Clin Oncol* 2014;32(19):2039–49. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.6136.
 22. Barok M., Tanner M., Könink K., Isola J. Trastuzumab-DM1 is highly effective in preclinical models of HER2-positive gastric cancer. *Cancer Lett* 2011;306(2):171–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.03.002.
 23. Digkila A., Wagner A.D. Advanced gastric cancer: current treatment landscape and future perspectives. *World J Gastroenterol* 2016;22(8):2403–14. DOI: 10.3748/wjg.v22.i8.2403.
 24. Lordick F., Janjigian Y.Y. Clinical impact of tumour biology in the management of gastroesophageal cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13(6):348–60. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.15.
 25. Matsuoka T., Yashiro M. Recent advances in the HER2 targeted therapy of gastric cancer. *World J Clin Cases* 2015;3(1): 42–51. DOI: 10.12998/wjcc.v3.i1.42.
 26. Wong D.D., de Boer W.B., Platten M.A. et al. HER2 testing in malignant effusions of metastatic gastric carcinoma: is it feasible? *Diagn Cytopathol* 2015;43(1): 80–5. DOI: 10.1002/dc.23212.
 27. Manion E., Hornick J.L., Lester S.C., Brock J.E. A comparison of equivocal immunohistochemical results with anti-HER2/neu antibodies A0485 and SP3 with corresponding FISH results in routine clinical practice. *Am J Clin Pathol* 2011;135(6):845–51. DOI: 10.1309/AJCP15LOO3NGDJG.
 28. Yano T., Doi T., Ohtsu A. et al. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence *in situ* hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep* 2006;15(1):65–71. DOI: 10.3892/or.15.1.65.
 29. Hoang M.P., Sahin A.A., Ordóñez N.G., Sneige N. HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2000;113(6):852–9. DOI: 10.1309/VACP-VLQA-G9DX-VUDEF.
 30. Boers J.E., Meeuwissen H., Methorst N. HER2 status in gastro-oesophageal adenocarcinomas assessed by two rabbit monoclonal antibodies (SP3 and 4B5) and two *in situ* hybridization methods (FISH and SISH). *Histopathology* 2011;58(3):383–94. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2011.03760.x.
 31. Arienti C., Pignatta S., Tesi A. Epidermal growth factor receptor family and its role in gastric cancer. *Front Oncol* 2019;9:1308. DOI: 10.3389/fonc.2019.01308.
 32. Dietel M., Ellis I.O., Höfler H. et al. Comparison of automated silver enhanced *in situ* hybridisation (SISH) and fluorescence ISH (FISH) for the validation of HER2 gene status in breast carcinoma according to the guidelines of the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists. *Virchows Arch* 2007;451(1):19–25. DOI: 10.1007/s00428-007-0424-5.
 33. Jorgensen J.T., Nielsen K.B., Kjarsgaard G. et al. Gene signal distribution and HER2 amplification in gastroesophageal cancer. *J Cancer* 2017;8(9):1517–24. DOI: 10.7150/jca.17878.
 34. Oono Y., Kuwata T., Takashima K. et al. Human epidermal growth factor receptor-2, epidermal growth factor receptor and mesenchymal epithelial transition factor-positive sites in gastric cancer using surgical samples. *Gastric Cancer* 2019;22(2):333–43. DOI: 10.1007/s10120-018-0853-7.
 35. Kim H., Son S.M., Woo S.M. et al. Discordance in HER2 status between primary gastric adenocarcinoma tumors and cells from corresponding malignant effusions. *BMC Cancer* 2019;19(1):834. DOI: 10.1186/s12885-019-6035-0.
 36. Sitas F. Twenty five years since the first prospective study by Forman et al. (1991) on *Helicobacter pylori* and stomach cancer risk. *Cancer Epidemiol* 2016;41:159–64. DOI: 10.1016/j.canep.2016.02.002.
 37. Tegtmeyer N., Zabler D., Schmidt D. et al. Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signalling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol* 2009;11(3):488–505. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2008.01269.x.
 38. Koopman T., Smits M.M., Louwen M. et al. HER2 positivity in gastric and esophageal adenocarcinoma: clinicopathological analysis and comparison. *J Cancer Res Clin Oncol* 2015;141(8):1343–51. DOI: 10.1007/s00432-014-1900-3.
 39. Hofmann M., Stoss O., Shi D. et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008;52(7):797–805. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2008.03028.x.
 40. Huang S.C., Ng K.F., Lee S.E. et al. HER2 testing in paired biopsy and excision specimens of gastric cancer: the reliability of the scoring system and the clinicopathological factors relevant to discordance. *Gastric Cancer* 2016;19:176–82. DOI: 10.1007/s10120-014-0453-0.
 41. Ahn S., Ahn S., van Vrancken M. et al. Ideal number of biopsy tumor fragments for predicting HER2 status in gastric carcinoma resection specimens. *Oncotarget* 2015;6(35):38372–80. DOI: 10.18632/oncotarget.5368.
 42. Cho E.Y., Srivastava A., Park K. et al. Comparison of four immunohistochemical tests and FISH for measuring HER2 expression in gastric carcinomas. *Pathology* 2012;44(3):216–20. DOI: 10.1097/PAT.0b013e3283513e8b.
 43. Abrahao-Machado L.F., Scapulatempo-Neto C. HER2 testing in gastric cancer: an update. *World J Gastroenterol* 2016;22(19):4619–25. DOI: 10.3748/wjg.v22.i19.4619.

Вклад авторов

Д.Л. Ротин: анализ полученных данных, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи;
О.В. Паклина, И.О. Тинькова, Д.Н. Греков, Г.Р. Сетдикова: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

D.L. Rotin: analysis of the obtained data, writing the manuscript, reviewing publications on the topic;
O.V. Paklina, I.O. Tin'kova, D.N. Grekov, G.R. Setdikova: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

Г.Р. Сетдикова / G.R. Setdikova: <https://orcid.org/0000-0002-5262-4953>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 30.01.2020. Принята к публикации: 03.03.2020.

Article submitted: 30.01.2020. Accepted for publication: 03.03.2020.

ФИТОАДАПТОГЕНЫ В БИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ И ГЕРИАТРИИ (ЧАСТЬ 1)

О.А. Бочарова¹, Р.В. Карпова¹, Е.В. Бочаров¹, А.А. Вершинская¹, М.А. Барышникова¹,
И.В. Казеев¹, В.Г. Кучеряну², М.В. Киселевский¹

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

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

Контакты: Ольга Алексеевна Бочарова imufarm@rambler.ru

В обзоре отражена история исследований фитоадаптогенов (женьшень, элеутерококк и др.), которые восточная медицина издавна считает геропротекторами. Обладая комплексным защитным действием на организм, они повышают и его противоопухолевую резистентность. В 1-й части обзора описаны антистрессорные, иммуно- и гормонотропные, когнитивные и нейропротекторные свойства адаптогенов. Вместе с тем при синхронизирующем воздействии на биоритмы адаптогены имеют существенное значение для профилактической онкологии.

Ключевые слова: адаптогены, профилактическая онкология, геропротекторы, иммуномодуляторы, нейропротекторы

Для цитирования: Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):13–21.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-13-21



PHYTOADAPTOGENS IN THE TUMOURS BIOTHERAPY AND GERIATRICS (PART 1)

O.A. Bocharova¹, R.V. Karpova¹, E.V. Bocharov¹, A.A. Vershinskaya¹, M.A. Baryshnikova¹, I.V. Kazeev¹,
V.G. Kucheryanu², M.V. Kiselevskiy¹

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

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

The review reflects the history of phytoadaptogens studies (ginseng, eleutherococcus, etc.), which are considered to be geroprotectors by Eastern medicine for centuries. They have a complex of protective effects on the body, as well as increasing its antitumor resistance. The first part of the review describes the antistress, immuno- and hormone-modulating, cognitive and neuroprotective properties of adaptogens. Together with the synchronizing effects on biorthms adaptogens are essential for preventive oncology.

Key words: adaptogens, preventive oncology, geroprotectors, immunomodulators, neuroprotectors

For citation: Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Phytoadaptogens in the tumours biotherapy and geriatrics (past 1). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):13–21. (In Russ.).

Введение

На современном этапе развития медицины все большее значение приобретают проблемы профилактики заболеваний. Особенно это касается злокачественных новообразований. Становится все более очевидным, что современные методы лечения, применяемые зачастую уже на поздних стадиях болезни, не приводят к радикальному излечению. Поэтому и сформировалось положение о том, что рак легче предупредить, чем лечить. Вместе с тем понятной стала возможность профилактики на различных этапах развития опухолевой болезни: blastomagenesis, мета-

стазирования и рецидивирования опухолей после радикальных операций. Профилактические мероприятия также могут быть направлены на регуляцию стрессового синдрома, вызванного современными методами лечения опухолевых заболеваний, улучшение качества жизни и ее продление после специфической противоопухолевой терапии. **Цель** данного обзора — обоснование возможности использования фитоадаптогенов (ФА) в профилактической онкологии.

В традиционной восточной медицине такие ФА, как женьшень, элеутерококк, лимонник, заманиха, более 2 тыс. лет используются в качестве средств,

способствующих долголетию. Известно, что существует прямая зависимость частоты возникновения опухолей от скорости старения популяции. С учетом того, что ключевым механизмом процессов старения и опухолеобразования может быть нарушение адгезионных взаимодействий (и, как следствие, дисдифференцировка), так можно рассматривать как стремительное старение клеток органа [1, 2]. В связи с этим применение геропротекторов в онкологии следует считать перспективным.

Растительные адаптогены — широкое понятие, которое было введено в 50-х годах минувшего века ленинградским фармакологом проф. Н.В. Лазаревым. Биологически активные вещества ФА, как правило, отличаются широкий диапазон клинических возможностей при минимальных побочных реакциях. Ученые Н.В. Лазарева (И.И. Брехман, Н.К. Фруентов, Н.В. Дардымов) в числе первых сконцентрировали свои усилия на изучении адаптогенных лекарственных растений, которые относятся к представителям дальневосточной флоры нашей страны, — среди них такие эндемические растения, как женьшень, родиола розовая, аралия, элеутерококк, заманиха, левзея и др. Вслед за отечественными «первопроходцами» устремились преимущественно китайские, японские, южнокорейские исследователи. В результате в работах, появившихся с конца 90-х годов XX в., с применением передовых методических подходов удалось уточнить и обосновать первоначальные знания, расширив круг клинических показаний для ФА [3].

Первым изученным эффектом ФА было стимулирующее и тонизирующее действие. Однако выяснилось, что ФА являются корректорами функций организма, в одних случаях стимулируя, в других — подавляя, т. е. нормализуя реакции организма в экстремальных условиях или в условиях соматического стресса [4].

В частности, ФА ускоряют половое созревание молодых, увеличивают детородный период стареющих животных (самок и самцов) и не влияют в этом направлении на половозрелых животных. Также выявлено, что ФА ускоряют дифференцировку эмбриональных клеток морских ежей и амфибий, повышают степень дифференцировки, например, клеток мышины меланомы В16 и гепатокарциномы, индуцируя деканцерогенез (термин Т. Ота) и тормозя опухолевый рост [5–7].

Таким образом, препараты адаптогенов, вероятно, являются индукторами программы дифференцировки (а не стимуляторами клеточного деления), поддерживая тканевые системы в высокодифференцированном состоянии (гомеостаза), характерном для зрелого онтогенеза. Поэтому интерес онкологов к такого рода препаратам неудивителен.

Антистрессорное действие фитоадаптогенов

Способность адаптировать организм при многофакторном воздействии окружающей среды является одной из самых первых характеристик ФА. Поэтому, в частности, они и получили свое название.

Адаптогены из растений в условиях стрессорного воздействия способствуют более эффективной реализации этапов срочной и долговременной адаптации. Проявлением этого выступают ингибирование гиперергических повреждений, возникающих на стадии тревоги, усиление восстановительных метаболических процессов, пролонгирование стадии резистентности стресса и задержка развития стадии истощения. ФА обнаруживают и лечебные свойства, ликвидируя разрушительные последствия стресса для деятельности различных систем и органов [1, 8, 9].

Н.В. Лазарев показал, что, изменяя общий уровень активности защитных систем организма, влияя фармакологическим путем на предшествующие комплексные защитные реакции и механизмы, можно вызвать в организме состояние неспецифической повышенной сопротивляемости. При этом подчеркивалась перспективность такого направления в сравнении с попытками влиять на отдельные звенья в цепи нарушений, развивающихся в организме. Именно Н.В. Лазарев ввел в публикациях понятие «адаптогены», которое теперь используется не только в отечественной, но и в зарубежной научной литературе. Были выработаны требования, которым должны отвечать препараты, способные разбудить и встряхнуть внутренние резервы организма, заложенные природой, но загнанные и истощенные современным образом жизни, неестественным питанием, неограниченным использованием лекарств, ухудшающейся экологией. Подобные средства должны быть абсолютно безвредными и обладать большой широтой лечебного действия, ограждать организм от самых разнообразных вредоносных факторов, помогать тем активнее, чем более глубоко поражен организм.

Учение о состоянии неспецифической повышенной сопротивляемости и адаптогенах может служить в значительной мере теоретической базой для применения различных лечебных природных веществ, которые составляют основу профилактической медицины. Действие ФА, направленное на формирование указанного состояния и повышение устойчивости к нагрузкам, сводится к нескольким основным моментам. Адаптогенный эффект в рамках неспецифической повышенной сопротивляемости предполагает психоэмоциональную стабилизацию, повышение умственной и физической работоспособности, понижение чувствительности к инфекциям и т. п. Достигается подобная защита путем оптимизации функций связанных между собой 3 основных защитных систем организма — нервной, иммунной и эндокринной —

и сопряженных с ними механизмов [4, 10, 11]. Адаптогены повышают устойчивость организма к неблагоприятным воздействиям. Поэтому, кстати, их с успехом применяют на вредных производствах [12, 13].

Между тем ФА способствуют ослаблению чувства тревоги и психостабилизации через запуск определенного рода стресслимитирующих процессов. У отдельных ФА налицо заметная анксиолитическая активность [14, 15]. Она сочетается с усилением тормозной ГАМКергической передачи и эмоциогенных структур мозга. С другой стороны, на примере изучения кардиопротекторных и противоаритмических свойств ФА показано вовлечение опиоидных пептидов, в частности β -эндорфина, а также катехоламинов, в том числе дофамина, в реализацию их антистрессорного эффекта. Кроме того, обязательным «аккомпанементом» стресса служат разнонаправленные сдвиги в состоянии иммунитета [4].

Наряду с универсальным терапевтическим действием ФА на уровне отдельных органов и систем столь же однотипным (неспецифическим) оказывается их влияние на неблагоприятные проявления стрессирования клеточного уровня в форме так называемого оксидантного стресса. Гинзенозид Rg1, например, в первичной культуре изолированных нейронов черной субстанции (продуцирующих дофамин) крыс обнаруживает отчетливые протекторные свойства при оксидантном стрессе, вызванном митохондриальным токсином ротеноном [16]. Оральное применение экстрактов женьшеня и родиолы предупреждало токсическое действие четыреххлористого углерода на печеночную ткань крыс и мышей с повышением активности антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы и ограничением накопления малонового диальдегида как одного из продуктов перекисного окисления липидов [17, 18].

Хронотропные свойства фитоадаптогенов

В происхождении антистрессорного действия ФА важную роль отводят их хронотропной активности. Наиболее частым свидетельством дизритмии служит нарушение базального циркадианного ритма сон — бодрствование в виде бессонницы, изменения фазной структуры сна. Первичная дизритмия может облегчать развитие патологических сдвигов в деятельности центральной нервной системы и периферических органов.

Между тем для препаратов ФА (женьшеня, родиолы, элеутерококка, аралии) характерна нормализация ночного сна. У здоровых молодых людей в условиях высокогорья препараты ФА оптимизировали структуру сна, увеличивали индекс эффективности сна. Применение пожилыми пациентами экстракта родиолы с витаминами ослабляло когнитивные на-

рушения с возрастанием устойчивости к стрессу и снижением бессонницы [19–21].

Снотворное, успокаивающее и ритмоорганизующее действие как ФА, так и традиционных анксиолитиков может определяться тождественными механизмами взаимодействия тех и других с центральными ГАМК-бензодиазепиновыми рецепторными комплексами, которые участвуют в контроле за возбудимостью эмоциогенных структур мозга, заинтересованных в организации биоритмических процессов. Суммарные гинзенозиды женьшеня ограничивали захват меченых нейромедиаторов синапсами мозга крыс, но особенно четко это проявлялось в отношении ГАМКергических нейронов, которые считают точкой приложения действия ФА [22].

Важно упомянуть о сезонных биоритмах. Например, элеутерококк и женьшень лучше действуют осенью и зимой, но не весной и летом (в частности, изменяют остроту зрения у испытуемых). При этом нельзя не отметить, что восточная медицина фактору сезонного действия ФА придает большое значение.

Особенности психотропной активности фитоадаптогенов

На начальном этапе изучения фармакодинамики ФА основной акцент делался на оценку их возбуждающего влияния на центральную нервную систему, которое предлагалось рассматривать как стимулирующе-тонизирующее. Под стимулирующим эффектом подразумевали повышение умственной и физической работоспособности на сравнительно короткое время, а под тонизирующим — обеспечение тех же самых сдвигов, но на более длительный срок. Положительной особенностью эффекта ФА признавалось то, что они не вызывают заметного субъективного возбуждения и неблагоприятных сдвигов в работе внутренних органов [4].

Общий смысл различий между двумя видами стимулирующего эффекта на метаболическом уровне, вероятно, заключается в том, что психомоторные стимуляторы в противоположность ФА, сильнее активируя обменные процессы, быстрее приводят к разрыву между ресинтезом энергетических соединений и их распадом, легче провоцируют негативные катаболические сдвиги в белковом обмене. Отставание воспроизводства необходимых для функции клетки метаболитов от темпов расходования ведет к довольно скорому развитию фазы угнетения с поведенческой депрессией после первоначального резкого подъема психомоторных проявлений [23]. Для действия ФА более типичны хорошая сбалансированность процессов воссоздания и потребления энергетических соединений в центральной нервной системе и на периферии, повышение анаболической активности тканей организма в целом. Обеспечивая

мягкую нормализацию функций, ФА не вызывают последующего спада психомоторных показателей [24].

Такие средства, как кофеин или фенамин, хотя и с неодинаковой силой, но неизменно активируют работу подкорковых моноаминергических синапсов. Фармакологическое усиление нигростриатной дофаминергической передачи ведет к ослаблению деятельности тормозной, инактивирующей системы, обуславливая вторичную, а фармакологическое включение норадренергических звеньев в составе ретикулярной формации мозгового ствола — первичную стимуляцию неокортекса с признаками явного психического возбуждения.

Затрагивая центральную моноаминергическую передачу, ФА, в свою очередь, демонстрируют иной профиль фармакологической активности, в меньшей степени влияя на судьбу церебральных моноаминов. Однако в экспериментах на кроликах слабому активирующему влиянию низкой дозы родозина на показатели электроэнцефалограммы сопутствовали возрастание концентрации дигидроксифенилаланина и дофамина в неокортексе и накопление их в гиппокампе [25]. При этом с увеличением дозировки ФА параллельно с синхронизацией ритмики электроэнцефалограммы и нарастанием психодепримирующего эффекта отмечалось снижение уровня дофамина в хвостатом ядре, а значит, усиление сдерживающих влияний черной субстанции на полосатое тело. В результате выявляются стриатная гиперактивность и усиление тормозного контроля ядра за функцией сопряженных мозговых структур.

Психомоторные стимуляторы из числа амфетаминов посредством своей дофаминомиметической активности могут провоцировать прямо противоположные сдвиги. Описанные свойства удачно дополняют способность действующих начал ФА оказывать успокаивающее влияние на эмоциональную сферу. Такого рода противотревожное, мягкое анксиолитическое действие служит важным составным элементом их антистрессорных возможностей. Это обусловлено понижением возбудимости эмоциональных лимбических структур мозга, отчасти за счет усиления тормозной ГАМКергической передачи.

Психофармакологический профиль ФА, вероятно, будет неполным, если игнорировать их антидепрессантную активность. Экстракты родиолы, женьшеня и элеутерококка, а также препарат из смеси лекарственных растений, в состав которого они были включены, подобно типичным антидепрессантам, укорачивали время неподвижности животных (признак депрессивного состояния в эксперименте). В сравнении с действием тетрабеназина, который истощает запасы церебральных моноаминов, указанные препараты повышали подвижность мышей, укорачивая иммобилизацию [26, 27].

Таким образом, можно полагать, что ФА обладают комплексом психотропных свойств, включая противотревожный, психотонический и, вероятно, антидепрессантный эффект. Все они, отличаясь адаптогенным характером, безусловно, направлены на оптимизацию поведения и более успешное приспособление организма к неблагоприятным факторам внешней и внутренней среды, в том числе в условиях стрессорной ситуации экзогенного и эндогенного происхождения.

Ноотропные свойства фитоадаптогенов

Возрастные нарушения когнитивной (познавательной) работы мозга значатся в показаниях для применения ФА, поскольку их ноотропные свойства тоже были выявлены.

Из опыта восточной медицины известна способность ФА улучшать когнитивную деятельность человека. Современные исследования не только подтвердили этот факт, но и аргументировали на клеточном уровне. Установлено, что биологически активные вещества ФА обладают всеми необходимыми эффектами ноотропных средств. Действие ФА направлено на сохранение функций нервных клеток и процессов высшей нервной деятельности. Модулируя различные механизмы, они могут обеспечивать защиту центральных нейронов от повреждения, а также усиливать регенераторные процессы в головном мозге [28, 29]. Нейропротекторная активность является важным свойством ФА. Показано, что увеличение содержания катехоламинов (в частности, дофамина, который подавляется при старении) повышает продолжительность жизни и снижает частоту опухолеобразования. Такие ФА, например, как элеутерококк и женьшень, предотвращают гибель дофаминергических нейронов [30, 31]. В результате картину значимости ФА для профилактической онкологии дополняет их нейропротекторная активность.

Иммунотропные свойства фитоадаптогенов

Фитоадаптогены — выраженные иммуномодуляторы. Изменяя функции иммунных механизмов в разных направлениях, они могут нивелировать признаки стрессорной дезоптимизации в их деятельности и обеспечивать таким образом иммуномодулирующий эффект [32].

Если острый стресс активирует иммунную систему и эта активация, вероятно, входит в систему защиты организма в ситуации любого напряжения, то хроническое стрессирование чаще приводит к противоположному результату — иммунной депрессии. Повторное плавание у крыс нарушает соотношение различных популяций Т-лимфоцитов. При этом в большей степени реагируют клетки тимуса. Вместе с тем угнетается формирование антителообразующих

элементов в ткани селезенки и лимфатических узлах в различные фазы иммунного ответа. Причем иммунодепрессия сохраняется длительное время после прекращения плавания. У приматов продолжительный разрыв зоосоциальных отношений приводит к прогрессирующему снижению количества лимфоцитов, ослаблению гуморального иммунитета. Исследования на людях в хронически стрессорных ситуациях свидетельствуют о снижении числа фагоцитов, лимфоцитов и их субпопуляций, а также о депрессии митогенной активности лимфоидных клеток, функции натуральных киллеров, продукции интерферонов и интерлейкинов (ИЛ) 1, 2.

Адаптогенный эффект ФА сопровождается нормализацией иммунного статуса. С лечебной точки зрения важной является способность ФА нивелировать иммунодефицитные состояния, представляющие наибольшую угрозу на фоне хронического или резко выраженного стресса. Действительно, устойчивые результаты выявлены при использовании ФА на фоне выраженных изменений иммунитета. Иными словами, наблюдается нормализация нарушенных в ту или другую сторону его показателей.

Иммуностимулирующая активность ФА показана в опытах *in vitro* и *in vivo* [33]. Инкубация мононуклеарных клеток из крови человека и макрофагов мышей с экстрактами родиолы, женьшеня приводила к усилению продукции фактора некроза опухоли α и цитокинов ИЛ-8, 10, 12 [34]. Вместе с тем увеличивалась продукция оксида азота (NO), в реализации провоспалительного эффекта которого участвует ядерный фактор NF- κ B. На макрофагах человека ФА проявили цитопротекторные свойства, снижая показатели оксидантного стресса при подавлении продукции свободных радикалов, повышении уровня глутатиона, ограничении апоптоза [35].

Иммуностимуляция способствует противоинфекционным свойствам ФА. Добавление препаратов элеутерококка и эхинацеи к гранулоцитам и моноцитам крови здоровых доноров усиливало фагоцитоз грибов семейства *Candida* [4]. При диссеминированном кандидозе гинзенозид Rg1 увеличивал продукцию различных цитокинов: интерферона γ , ИЛ-2, 4, 10 [36]. Таким образом, ФА обладают отчетливыми иммуностимулирующими свойствами. Очевидно, они вполне могут быть востребованы на фоне иммунодефицитных состояний, сопровождающих фазу истощения стрессорной реакции.

Наряду с этим ФА могут проявлять и обратные, но полезные иммуносупрессивные свойства. Доказательством способности ФА ограничивать функции иммунной системы служит наличие у их компонентов противоаллергических свойств. В частности, гинзенозид Rb1 (протопанаксациол) при добавлении к тучным клеткам из легочной ткани морских свинок

снижал выработку гистамина и лейкотриенов в ответ на действие комплекса антиген–антитело [37]. Фенольный компонент элеутерококка сирингарезинол снижал воспалительный процесс при артрите при торможении иммуногемолиза эритроцитов, экспрессии некоторых генов с подавлением AP-1 и NF- κ B сигнальных путей. При этом лимитировалась продукция ИЛ-6, циклооксигеназы 2-го типа (ЦОГ-2) и матричной металлопротеиназы-1 [38]. Похожий механизм участвует в иммуносупрессивном действии компонентов женьшеня. Среди 13 исследованных гинзенозидов их бактериальный метаболит в кишечнике, соединение K в большей степени тормозили влияние фактора некроза опухоли α на фосфорилирование 1- κ B-киназы в астроглиальных клетках человека [39]. Предварительное введение 20-(S)-гинзенозида Rg3 крысам снижало аллергические свойства липополисахарида и проявления оксидантного стресса в печени и почках при подавлении содержания ЦОГ-2 и NO-синтазы [40]. Также известно, что гинзенозид Rf ингибировал ЦОГ-2 в клетках линии A549 [41]. Можно полагать, что антиаллергическое и противовоспалительное действие ФА обусловлено подавлением ЦОГ-2, но не затрагивает ЦОГ-1. Причиной может служить также снижение транскрипции фермента через ядерный промотор, который связывает ИЛ-6. Не исключено, что действие веществ опосредовано первичным повышением ими уровня кортикостерона [42].

Следовательно, говоря об иммунотропных свойствах ФА, можно характеризовать их как иммуномодуляторы [43]. Очевидно, за этим скрываются антистрессорные возможности ФА вне зависимости от того, в какую фазу стрессорной реакции их применяют. В фазе тревоги они будут приводить к лимитированию иммунного ответа, в фазу истощения — к его активизации.

Стоит отметить, что в состав одного растения могут входить компоненты с прямо противоположными свойствами. Например, корень азиатского женьшеня содержит гинзенозиды Rh1 и 20(R)-Rh1 с иммуностимулирующей активностью, а также гинзенозиды Rg1 и F с иммуносупрессивным действием [44]. Это может служить «материальной базой» разнонаправленного иммунотропного действия препаратов ФА.

Представляют интерес адьювантные свойства ФА в отношении вакцин. Показано, в частности, что сапонины и полисахариды ФА, включая женьшень, лимонник, аралию и другие, способны усиливать эффекты вакцин в отношении гуморального и клеточного иммунитета. Сапонины могут улучшать системную и пероральную доставку антигенов. Это связано с возможной адьювантной ролью сапонинов в повышении проницаемости кишечного эпителия для облегчения прохождения высокомолекулярных соединений через слизистую оболочку при усиленном фагоцитозе антигенспецифическими клетками

и повышенной миграции макрофагов в лимфатические узлы по сравнению с чистым белком [45, 46].

Таким образом, иммуномодулирующая активность ФА удачно сочетается с синхронизирующим воздействием на биоритмические процессы, дополняя их психостабилизирующие свойства.

Гормономодулирующие свойства фитоадаптогенов

Благодаря гормономодулирующим свойствам ФА выступают геропротекторами, что обуславливает перспективу их применения в онкологии.

Повышенное содержание кортизола в крови отражает весьма выраженные нарушения гомеостаза. Кортизол считают главным катаболическим гормоном, разрушающим ткани. Ответной реакцией организма на стресс становится выброс кортизола из надпочечников, что заставляет усиленно работать сердечно-сосудистую систему и легкие, подавляя иммунную систему. При этом известно, что кортизол индуцирует гибель лимфоцитов по типу апоптоза. Повышенный уровень гормона способствует замедлению процессов пищеварения и снижению репродуктивной функции, а также негативно сказывается на работе мозга. В первую очередь он начинает разрушать нейроны, находящиеся в гиппокампе, подавляя продукцию гормонов радости — дофамина и серотонина. В результате развиваются депрессивное состояние и торможение когнитивных функций.

Основной анаболический гормон — тестостерон. Он крайне благоприятен не только для мужчин, но и для женщин. Вообще, анаболические гормоны — тестостерон, эстроген у женщин, прогестерон, гормон роста, мелатонин и дегидроэпиандростерон — способствуют росту тканей и поддержанию молодости, поэтому их относят к гормонам юности. Однако после окончания репродуктивного возраста их уровень начинает падать. В противоположность, кортизол, инсулин и эстроген у мужчин относят к гормонам старения, уровень которых в крови с возрастом повышается. Иными словами, с возрастом баланс между гормонами сдвигается от анаболиков к катаболикам. Стероидные гормоны (включая кортизол) синтезируются из холестерина. Последний превращается в прегненолон, который затем может перейти либо в прогестерон, либо в дегидроэпиандростерон, предшественник тестостерона и эстрогена. Когда организм подвергается хроническому или избыточному стрессу, производится больше кортизола за счет дегидроэпиандростерона, тестостерона

и эстрогена. Нормальный процесс старения связан со сдвигом к большему выделению кортизола и одновременным снижением образования других гормонов.

Выявлено, что биологически активные вещества ФА обладают андрогенной активностью. Традиционно этим препаратам приписывали свойство повышать потенцию и продлевать молодость. Экстракт женьшеня у крыс самцов увеличивал объем спермы в тестикулах и придатках без изменения их массы и морфологии [47]. При возрастании уровня тестостерона и лютеинизированного гормона в крови отмечали восстановление нарушенного сексуального поведения и усиление копуляторной активности крыс [48]. Такой эффект, возможно, частично зависит от прямого воздействия гинзенозидов на выработку гормонов передней доли гипофиза, поскольку добавление биологически активных веществ женьшеня *in vitro* к клеточным элементам мозговой железы сопровождалось усилением процессов секреции [49]. *In vitro* на модели опухоли предстательной железы человека в культуре (линия LNCaP) гинзенозиды Rg3 и Rh2 подавляли пролиферацию клеток рака за счет ингибирования митогенстимулируемых протеинкиназ. Вместе с тем *in vivo* гинзенозиды снижали уровень простатоспецифического антигена и потенцировали действие цитостатиков [50].

Так, введение препаратов ФА предварительно или на фоне стресса значительно уменьшало величину и длительность стадии тревоги общего адаптационного синдрома, подавляло катаболический синдром и усиливало восстановительные процессы на стадии резистентности [4]. Препараты родиолы розовой повышали уровень серотонина в мозге, снижали или исключали депрессивную симптоматику, ослабляя глюкокортикоидный остеопороз [51]. Показано, что в результате регулирования стрессорной реакции экстракт элеутерококка предотвращал взрыв метастиазирования, нередко развивающийся после операции по удалению первичной опухоли [52]. Очевидно, воздействия, регулирующие гормональный баланс, прежде всего развитие стрессорной реакции (уровень кортизола), играют важную роль в сохранении гомеостаза организма.

Таким образом, приведенные данные позволяют сделать вывод о том, что ФА способны нормализовать нарушенные в ту или другую сторону показатели разных систем организма в условиях стрессорной реакции, поддерживая гомеостаз последнего, характерный для нормального онтогенеза.

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

- Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Давыдов М.И. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии. М.: МИА, 2008. 224 с. [Bocharova O.A., Baryshnikov A.Yu., Davydov M.I. Phytoadaptogens in oncology and gerontology. Moscow: Medical News Agency, 2008. 224 p. (In Russ.)].
- 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. Eksperimental'naya onkologiya = Experimental Oncology 1983;5(3):39–42. (In Russ.)].
- Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G. et al. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia: their history and applications. J Ethnopharmacol 2014;154(3):481–536. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.007.
- Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Растительные адаптогены. Ставрополь: СтГМАМ, 2009. 232 с. [Arushanyan E.B., Beyer E.V. Plant adaptogens. Stavropol': StSMAM, 2009. 232 p. (In Russ.)].
- Ota T., Fujikawa-yamamoto K., Zong Z.P. et al. Plant-glycoside modulation of cell surface related to control of differentiation in cultured B16 melanoma cells. Cancer Res 1987;47(14):3863–7.
- Zeng X.L., Tu Z.G. Induction of differentiation by ginsenoside Rh2 in hepatocarcinoma cell SMMC-7721. Ai Zheng 2004;23(8):879–84.
- Dai C.Y., Liu P.F., Liao P.R. et al. Optimization of flavonoids extraction process in Panax notoginseng stem leaf and a study of antioxidant activity and its effects on mouse melanoma B16 cells. Molecules 2018;23(9):2219. DOI: 10.3390/molecules23092219.
- Lee B., Sur B., Park J. et al. Ginsenoside Rg3 alleviates lipopolysaccharide-induced learning and memory impairments by anti-inflammatory activity in rats. Biomol Ther 2013;21(5):381–90. DOI: 10.4062/biomolther.2013.053.
- Fang F., Chen X., Huang T. et al. Multifaced neuroprotective effects of Ginsenoside Rg1 in an Alzheimer mouse model. Biochim Biophys Acta 2012;1822(2):286–92. DOI: 10.1016/j.bbdis.2011.10.004.
- Oliynyk S., Oh S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance. J Ginseng Res 2013;37(2):144–66. DOI: 10.5142/jgr.2013.37.144.
- Amsterdam J.D., Panossian A.G. Rhodiola rosea L. as a putative botanical antidepressant. Phytomedicine 2016;23(7):770–83. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.02.009.
- Lee T.K., O'Brien K.F., Wang W.D. et al. Radioprotective effect of American ginseng on human lymphocytes at 90 minutes postirradiation: a study of 40 cases. J Altern Complement Med 2010;16(5):561–7. DOI: 10.1089/acm.2009.0590.
- Alekseeva S.N., Antipina U.D., Arzhakova L.I. et al. New applications of adaptogens to reduce radiation side effects. Wiad Lek 2015;68(4):487–9.
- Hwang S.H., Shin E.J., Shin T.J. et al. Gintonin, a ginseng-derived lysophosphatidic acid receptor ligand, attenuates Alzheimer's disease-related neuropathies: involvement of non-amyloidogenic processing. J Alzheimers Dis 2012;31(1):207–23. DOI: 10.3233/JAD-2012-120439.
- Ghaemini M., Rajkumar R., Koh H.L. et al. Ginsenoside Rg1 modulates medial prefrontal cortical firing and suppresses the hippocampo-medial prefrontal cortical long-term potentiation. J Ginseng Res 2018;42(3):298–303. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.03.010.
- Song X.Y., Hu J.F., Chu S.F. et al. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats. Eur J Pharmacol 2013;710(1–3):29–38. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.051.
- Zhang X., Li X., Xiong P. et al. Effects of Panax notoginseng saponins on liver graft rejection in rats and the mechanisms. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2019;39(4):394–400. DOI: 10.1212/j.issn.1673-4254.2019.04.03.
- Choudhry Q.N., Kim J.H., Cho H.T. et al. Ameliorative effect of black ginseng extract against oxidative stress-induced cellular damages in mouse hepatocytes. J Ginseng Res 2019;43(2):179–85. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.10.003.
- Radad K., Moldzio R., Rausch W.D. Ginsenosides and their CNS targets. CNS Neurosci Ther 2011;17(6):761–8. DOI: 10.1111/j.1755-5949.2010.00208.x.
- Tan X., Gu J., Zhao B. et al. Ginseng improves cognitive deficit via the RAGE/NF- κ B pathway in advanced glycation end product-induced rats. J Ginseng Res 2015;39(2):116–24. DOI: 10.1016/j.jgr.2014.09.002.
- Kim S., Kim M.S., Park K. et al. Hippocampus-dependent cognitive enhancement induced by systemic gintonin administration. J Ginseng Res 2016;40(1):55–61. DOI: 10.1016/j.jgr.2015.05.001.
- Zhang X., Shi M., Björås M. et al. Ginsenoside Rd promotes glutamate clearance by up-regulating glial glutamate transporter GLT-1 via PI3K/AKT and ERK1/2 pathways. Front Pharmacol 2013;4:152. DOI: 10.3389/fphar.2013.00152.
- Chu S., Gu J., Feng L. et al. Ginsenoside Rg5 improves cognitive dysfunction and beta-amyloid deposition in STZ-induced memory impaired rats via attenuating neuroinflammatory responses. Int Immunopharmacol 2014;19(2):317–26. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.01.018.
- Shin B.K., Kwon S.W., Park J.H. Chemical diversity of ginseng saponins from Panax ginseng. J Ginseng Res 2015;39(4):287–98. DOI: 10.1016/j.jgr.2014.12.005.
- Wang G.L., Wang Y.P., Zheng J.Y. et al. Monoaminergic and aminoacidergic receptors are involved in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1 in mouse hippocampus (CA3) and prefrontal cortex. Brain Res 2018;1699:44–53. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.05.035.
- Panossian A., Nikoyan N., Okanyan N. et al. Comparative study of Rhodiola preparations on behavioral despair of rats. Phytomedicine 2008;15(1–2):84–91. DOI: 10.1016/j.phymed.2007.10.003.
- Lu G.H., Zhou Q.K., Sun S.Q. et al. Differentiation of Asian ginseng, American ginseng and Notoginseng by Fourier transform infrared spectroscopy combined with two-dimensional correlation infrared spectroscopy. J Mol Str 2008;883(3):91–8. DOI: 10.1016/j.molstruc.2007.12.008.
- Zhu J.D., Wang J.J., Zhang X.H. et al. Panax ginseng extract attenuates neuronal injury and cognitive deficits in rats with vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion. Neural Regen Res 2018;13(4):664–72. DOI: 10.4103/1673-5374.230292.
- Szczuka D., Nowak A., Zakłós-Szyda M. et al. American Ginseng (Panax quinquefolium L.) as a Source of Bioactive Phytochemicals with Pro-Health Properties. Nutrients 2019;11(5):1041–60. DOI: 10.3390/nu11051041.
- Zhang X., Wang Y., Ma C. et al. Ginsenoside Rd and ginsenoside Re offer

- neuroprotection in a novel model of Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis* 2016;5(1):52–61.
31. Wang G.L., He Z.M., Zhu H.Y. et al. Involvement of serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems in the antidepressant-like effect of ginsenoside Rb1, a major active ingredient of *Panax ginseng* C.A. Meyer. *J Ethnopharmacol* 2017;204:118–24. DOI: 10.1016/j.jep.2017.04.009.
 32. Jang A.Y., Song E.J., Shin S.H. et al. Potentiation of natural killer (NK) cell activity by methanol extract of cultured cambial meristematic cells of wild ginseng and its mechanism. *Life Sci* 2015;135:138–46. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.06.018.
 33. Li B., Zhang N., Feng Q. et al. The core structure characterization and of ginseng neutral polysaccharide with the immune-enhancing activity. *Int J Biol Macromol* 2019;123:713–22. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.140.
 34. Kaur P., Robin., Makanjuola V.O. et al. Immunopotentiating significance of conventionally used plant adaptogens as modulators in biochemical and molecular signalling pathways in cell mediated processes. *Biomed Pharmacother* 2017;95:1815–29. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.081.
 35. Akhter K.F., Mumin M.A., Lui E.M.K., Charpentier P.A. Fabrication of fluorescent labeled ginseng polysaccharide nanoparticles for bioimaging and their immunomodulatory activity on macrophage cell lines. *Int J Biol Macromol* 2018;109:254–62. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.050.
 36. Lee J.H., Han Y. Ginsenoside Rg1 helps mice resist to disseminated candidiasis by Th1 type differentiation of CD4⁺ T cell. *Int Immunopharmacol* 2006;6(9):1424–30. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.04.009.
 37. Lee B.H., Lee Y.H., Lee S.M. et al. Identification of ginsenoside interaction sites in 5-MT3A receptors. *Neuropharmacology* 2007;52(4):1139–50. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2006.12.001.
 38. Yamazaki T., Shimosava S., Sasaki H. (+)-Syringaresinol-di-O-beta-D-glucoside, a phenolic compound from *Acanthopanax senticosus harmus*, suppressed proinflammatory mediators in SW982 human synovial sarcoma cells by inhibiting activating protein-1 and/or nuclear factor-kappa B activities. *Toxicol In Vitro* 2007;21(8):1530–37. DOI: 10.1016/j.tiv.2007.04.016.
 39. Choi K., Kim M., Ryu J. Ginsenosides compound K and Rh2 inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced activation of the NF-kappa B and JNK pathways in human astroglial cells. *Neurosci Lett* 2007;421(1):37–41. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.05.017.
 40. Kang K.S., Yokozawa T., Yamode N. et al. ESR study on the structure and hydroxyl radical-scavenging activity relationships of ginsenosides isolated from *Panax ginseng* C.A. Meyer. *Biol Pharm Bull* 2007;30(5):917–21. DOI: 10.1248/bpb.30.917.
 41. Song H., Park J., Choi K. et al. Ginsenoside Rf inhibits cyclooxygenase-2 induction via peroxisome proliferator-activated receptor gamma in A549 cells. *J Ginseng Res* 2019;43(2):319–25. DOI: 10.1016/j.jgr.2018.11.007.
 42. Park W., Lim W., Cho Y. et al. Inhibitory effects of ginsenoside-Rb1 on activation of the 12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced cyclooxygenase-2 promoter. *Planta Med* 2006;72(3):272–5. DOI: 10.1055/s-2005-873172.
 43. Lee S.K., Wong C.K., Poon P.M. et al. *In vitro* immunomodulatory activities of a newly concocted traditional Chinese medicine formula: VI-28. *Phytother Res* 2006;20(10):883–8. DOI: 10.1002/ptr.1955.
 44. Yu J.L., Dou D.Q., Chen X.H. et al. Protopanaxatriol-type ginsenosides differentially modulate type 1 and type 2 cytokines production from murine splenocytes. *Planta Med* 2005;71(3):202–7. DOI: 10.1055/s-2005-837817.
 45. García A., de Sanctis J.B. An overview of adjuvant formulations and delivery systems. *APMIS* 2014;122(4):257–67. DOI: 10.1111/apm.12143.
 46. Sun B., Yu S., Zhao D. Polysaccharides as vaccine adjuvants. *Vaccine* 2018;36(35):5226–34. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.07.040.
 47. Park J.S., Hwang S.Y., Lee W.S. et al. The therapeutic effect of tissue cultured root of wild *Panax ginseng* C.A. Meyer on spermatogenic disorder. *Arch Pharm Res* 2006;29(9):800–7. DOI: 10.1007/bf02974082.
 48. Kim S.K., GyuKo I., Park H.J. et al. Effects of *Panax ginseng* on the nerve growth factor expression in testosterone induced benign prostatic hyperplasia. *Saudi J Biol Sci* 2018;25(1):66–70. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.07.005.
 49. Tsai S.C., Chiao Y.C., Lu C.C. Stimulation of the secretion of luteinizing hormone by ginsenoside-Rb1 in male rats. *Chin J Physiol* 2003;46(1):1–7.
 50. Xie X., Eberding A., Madera C. et al. Rh2 synergistically enhances paclitaxel or mitoxantrone in prostate cancer models. *J Urol* 2006;175(5):1926–31. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)00891-8.
 51. Panossian A. Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1401(1):49–64. DOI: 10.1111/nyas.13399.
 52. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растения в комплексной терапии опухолей. М.: Издательство РАМН, 2008. 432 с. [Goldberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P. et al. Plants in complex therapy of tumors. Moscow: RAMS Publishing House, 2008. 432 p. (In Russ.).]

Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна исследования, написание текста, анализ рукописи;
Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров: обзор публикаций по теме статьи, написание текста;
А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну: обзор публикаций по теме статьи;
М.В. Киселевский: анализ рукописи.

Authors' contributions

O.A. Bocharova: developing the research design, writing the manuscript, manuscript analysis;
R.V. Karpova, E.V. Bocharov: reviewing of publications of the article's theme; writing the manuscript;
A.A. Verzhinskaya, M.A. Baryshnikova, I.V. Kazeev, V.G. Kucheryanu: reviewing of publications of the article's theme;
M.V. Kiselevskiy: manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>
М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 20.11.2019. Принята в печать: 03.03.2020.
Article submitted: 20.11.2019. Accepted for publication: 03.03.2020.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С.В. Чулкова^{1,2}, Н.Н. Субботина³, Г.Д. Петрова¹, Н.В. Сидорова¹, О.П. Колбацкая¹,
Н.Н. Тупицын¹, А.Ю. Нуртазина⁴

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

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

³Клиническая больница «МЕДСИ»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

⁴ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Восстановление В-клеточного звена иммунитета — это ключевая составляющая успешности аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. В большинстве случаев восстановление В-лимфопоэза является медленным и часто незавершенным процессом, который сопровождается снижением толерантности реципиента к бактериальным, вирусным, грибковым патогенам. На этот процесс оказывает влияние ряд факторов, определяющих его эффективность и темп. Важно восстановление не только численности В-клеточной популяции, но и их функциональной полноценности. В статье проводится анализ современных данных литературы о значимости восстановления В-клеточного иммунитета после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, обзор основных факторов, влияющих на процесс В-лимфопоэза, и их прогностической составляющей.

Ключевые слова: адаптивный иммунитет, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, врожденный иммунитет, восстановление иммунитета, В-клетки

Для цитирования: Чулкова С.В., Субботина Н.Н., Петрова Г.Д. и др. Восстановление В-клеточного иммунитета после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):22–30.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-22-30



RECONSTITUTION OF B-CELLS IMMUNITY AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

S.V. Chulkova^{1,2}, N.N. Subbotina³, G.D. Petrova¹, N.V. Sidorova¹, O.P. Kolbatskaya¹, N.N. Tupitsyn¹, A.U. Nurtazina⁴

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

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

³Clinical Hospital "MEDSI"; 5, 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

⁴Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia;
8 Build 2, Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

The restoration of B-cell immunity is a key component of the success of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In most cases, the restoration of B-lymphopoiesis is a slow and often incomplete process, which is accompanied by a decrease in the tolerance of the recipient to bacterial, viral, fungal pathogens. This process is influenced by a number of factors that determine its effectiveness and pace. It is important to restore not only the size of the B-cell population, but also their functional usefulness. The article provides an analysis of modern literature data on the significance of the restoration of B-cell immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, a review of the main factors affecting the process of B-lymphopoiesis, and their prognostic component.

Key words: adaptive immunity, allogeneic haematopoietic stem cell transplant, innate immunity immunoreconstitution, B-cells

For citation: Chulkova S.V., Subbotina N.N., Petrova G.D. et al. Reconstitution of B-cells immunity after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):22–30. (In Russ.).

Введение

Восстановление В-клеточного иммунитета реципиента — одно из условий успешности проведенной аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК), поскольку посттрансплантационный период сопряжен с риском развития инфекционных осложнений. Согласно данным литературы, такие осложнения являются ведущей причиной низкой безрецидивной выживаемости [1–5].

Довольно сложный путь пройден исследователями со времен первой аллогенной трансплантации. Впервые она была осуществлена в 1957 г. [6]. Спустя 10 лет в научном сообществе появилась публикация Жоржа Мате, в которой сообщалось об успешном приживлении костного мозга (КМ) от сиблинга у больного острым лейкозом [7]. Автором был описан мощный антилейкемический эффект [7]. К сожалению, несмотря на успешность самой алло-ТГСК, у реципиента на фоне хронической реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) развилась вирусная инфекция, что привело к летальному исходу. На протяжении многих последующих лет ученые разрабатывали подходы в терапии инфекционных осложнений, режимы предтрансплантационной подготовки реципиента, методы профилактики РТПХ. Вместе с тем осваивались новые источники получения гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Все это привело к тому, что алло-ТГСК стали проводить регулярно, одновременно расширялись и показания к ним [8]. В настоящее время алло-ТГСК выполняют во всем мире, их число составляет свыше 60 тыс. в год [9]. Более половины всех аллогенных пересадок ГСК, по данным Европейской группы по трансплантации КМ, проводят у пациентов с лимфопролиферативными заболеваниями [10]. Кроме того, алло-ТГСК — неотъемлемая часть терапии острых и хронических лейкозов, миелодиспластического синдрома, а также солидных опухолей [11].

С увеличением количества выполняемых алло-ТГСК приобретает большую значимость понимание процессов восстановления В-клеточного иммунитета реципиента. Многочисленные исследования, посвященные этому вопросу, свидетельствуют о том, что восстановление популяции В-клеток и их функции идет с разным темпом, зависящим от многих факторов. При этом высокая частота инфекционных осложнений после алло-ТГСК указывает на неполноценность данного процесса, который затягивается на годы [1, 5, 12–14].

Факторы, оказывающие влияние на успешность алло-ТГСК

В России первые аллогенные трансплантации были редкими и часто заканчивались неудачами. Успешная алло-ТГСК, которая привела к длительной

ремиссии лейкоза, была выполнена в 1985 г. С течением времени менялись показания к алло-ТГСК, внедрялись в практику новые лабораторные методы HLA-типирования, разрабатывались оптимальные режимы предтрансплантационной подготовки реципиента, пополнялся арсенал лекарственных средств сопроводительной терапии. Значительным стимулом для развития технологий проведения алло-ТГСК послужило знание о том, что успешность алло-ТГСК связана не только с противоопухолевым воздействием предтрансплантационного химиолучевого лечения, но и с наличием феномена «трансплантат против опухоли», который заключается в том, что Т-лимфоциты донора распознают опухолевые клетки больного как «чужие» и разрушают их [15, 16]. На сегодняшний день этот факт позволяет использовать в качестве режима кондиционирования при алло-ТГСК не только миелоаблативный, обладающий значительной степенью органной токсичности, но и немиелоаблативный режим [17]. Такая подготовка легче переносится больными, обладает меньшей органной токсичностью, в то же время она содержит иммунодепрессанты в дозах, способных обеспечить приживление трансплантата [17]. Учеными признано, что данная технология позволяет снизить частоту осложнений и в конечном итоге — летальность, связанную непосредственно с проведением алло-ТГСК.

Как показывают результаты многочисленных исследований, выбор источника получения ГСК — важный фактор, определяющий успешность алло-ТГСК. Источниками ГСК могут служить КМ, периферические стволовые клетки (ПСК), пуповинная/плацентарная кровь (ППК). Оптимальным донором для алло-ТГСК является HLA-идентичный родственный донор, как правило, сиблинг. Однако только 20 % больных имеют совместимого родственного донора [8]. При отсутствии HLA-идентичного донора рассматривается возможность проведения алло-ТГСК с использованием ГСК из альтернативных источников. Такими источниками могут быть HLA-совместимый неродственный донор, частично совместимый неродственный донор, гаплоидентичный родственный донор и ППК, образцы которой приходится объединять для пересадки одному пациенту из-за низкой клеточности материала [8]. При гаплоидентичной алло-ТГСК в качестве доноров стволовых клеток выступают, как правило, родственники 1-й линии: родители, сиблинги, братья, сестры, которые частично совместимы с реципиентом по крайней мере по одному гаплотипу.

Сообщается, что основной причиной безрецидивной смертности реципиентов после алло-ТГСК являются инфекции [1–5]. Среди факторов, влияющих на риск развития последних, выделяют статус гематологического заболевания к моменту трансплантации,

иммуносупрессивную терапию, применение моно- и поликлональных антител на предшествующих этапах лечения, в том числе в режимах кондиционирования. В последнее время использование режимов кондиционирования пониженной токсичности при алло-ТГСК привело к тому, что бактериальные инфекции встречаются реже, чем после обычных миелоаблативных режимов [17]. Вместе с тем, к сожалению, нередко встречаются вирусные инфекции. Например, цитомегаловирусная инфекция (ЦМВ) выступает наиболее частой причиной летальности после алло-ТГСК, достигающей 70 % [10]. Мониторинг ЦМВ проводится 2 раза в неделю как минимум до 100-го дня. Однако развитие ЦМВ может происходить и в более поздние сроки, особенно у больных с РТПХ.

Накопленный мировой опыт свидетельствует, что угнетение В-клеточного иммунитета повышает риски инфекционных осложнений после алло-ТГСК. Поэтому решающим показателем успеха становится полноценное восстановление иммунного ответа реципиента. В связи с этим важно принимать во внимание, что проводимые лечебные мероприятия (химиотерапия, лучевая терапия, собственно алло-ТГСК) влекут нарушения КМ-микроокружения, и эти изменения негативно отражаются на восстановлении В-клеточного звена иммунной системы [18]. Ученые установили, что процесс восстановления В-лимфопоэза после алло-ТГСК идет медленно и задерживается на длительный период времени [19, 20]. Кроме того, угнетение тимопоэза до трансплантации в результате цитотоксического действия лекарственных препаратов или облучения также может задерживать восстановление В-клеточного иммунитета [21, 22].

Таким образом, восстановление иммунного ответа при алло-ТГСК крайне важно. Присутствующие в трансплантате донорские иммунные клетки опосредуют эффект «трансплантат против опухоли», обеспечивают защиту от инфекций, в том числе условно-патогенных, сдерживают РТПХ, однако это не быстрый процесс, и он начинается с восстановления врожденного иммунитета, что может занимать от нескольких месяцев до года, в то время как с момента приживления трансплантата до полного возрождения адаптивного иммунитета требуется 2 года или более [23–26]. Особенно это касается функционального восстановления В-клеток, которое следует за нормальным В-клеточным онтогенезом [27, 28].

Восстановление популяции В-клеток

В первые несколько месяцев после алло-ТГСК уровни циркулирующих В-клеток очень низкие. Восстановление относительного количества В-клеток после алло-ТГСК у большинства больных начинается с 3-го месяца, достигая нормальных значений

к 1–2-му году, но в последующем их уровни постепенно снижаются. Абсолютное количество В-клеток достигает нормальных значений ближе к 12-му месяцу, однако у реципиентов с РТПХ их восстановление в дальнейшем задерживается [26]. Важно отметить: несмотря на то что количество В-клеток может достигать уровня нормальных значений, большинство восстанавливающихся В-клеток в 1-й год после алло-ТГСК состоит из субпопуляций транзитных (В1) и наивных зрелых В-клеток (В2). Восстановление же популяции В-клеток памяти происходит намного позднее.

В норме в процессе В-клеточного онтогенеза субпопуляции клеток В1 и клеток В2, прежде чем покинуть КМ, подвергаются селекции, которая осуществляется с участием клеток КМ-окружения [29]. Субпопуляции В1-клеток, проходящих положительную селекцию в процессе В-клеточного онтогенеза, характеризуются фенотипом $CD19^{++}CD21^{low}CD23^{-}$ (рис. 1).

Субпопуляции В2-клеток несут на себе иммуноглобулиновый рецептор IgM, IgD, активационные антигены CD23 и CD5 на мембране отсутствуют (см. рис. 1). В2-клетки, характеризующиеся выраженной экспрессией CD23- и CD21-антигенов и IgD, подвергаются отрицательной селекции [29]. В2-клетки вовлечены в формирование адаптивного гуморального иммунного ответа. Покидая КМ, наивные зрелые В-клетки попадают в периферические лимфоидные органы, где проходит их антигензависимая дифференцировка [29].

При взаимодействии с антигеном происходит активация и пролиферация В-клеток, что выражается в экспрессии CD23, HLA-DR, утрате мембранного IgD [27, 28]. Наличие или отсутствие IgD и антигена CD27 разграничивает наивные В-клетки ($IgD^{+}CD27^{-}$), В-клетки памяти без переключения классов иммуноглобулинов ($IgM^{+}IgD^{+}CD27^{+}$), а также с переключением классов ($IgM^{-}IgD^{-}CD27^{+}$) [30, 31]. Вместе с тем В-клетки могут быть активированы без участия Т-лимфоцита. Субпопуляции В1-клеток способны дифференцироваться в антителопродуцирующие формы без стимуляции антигеном по так называемому тимуснезависимому пути, что сопровождается синтезом преимущественно IgM [29]. Следует подчеркнуть, что В1-клетками секретируется примерно половина сывороточного IgM [32]. Этот вид ответа не сопровождается формированием клеток памяти. С учетом угнетения тимопоэза до трансплантации этот путь оказывается значительным в формировании адекватного иммунного ответа у реципиента на вирусные и бактериальные патогены. Не следует забывать, что антитела класса М играют ключевую роль в индукции апоптоза опухолевых клеток [32].

Количество транзитных В-клеток в периферической крови (ПК) у здоровых взрослых составляет

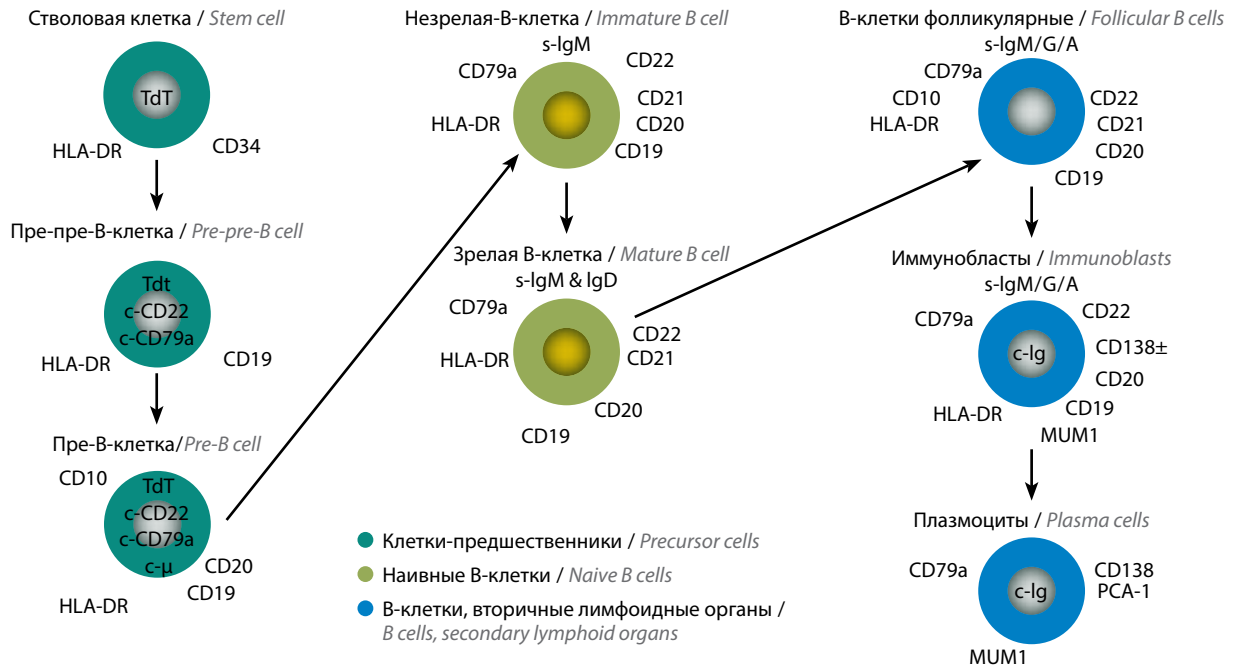


Рис. 1. В-лимфопоэз. Адаптировано из [43] с разрешения авторов

Fig. 1. B-lymphopoiesis. Adapted from [43] with permission of the authors

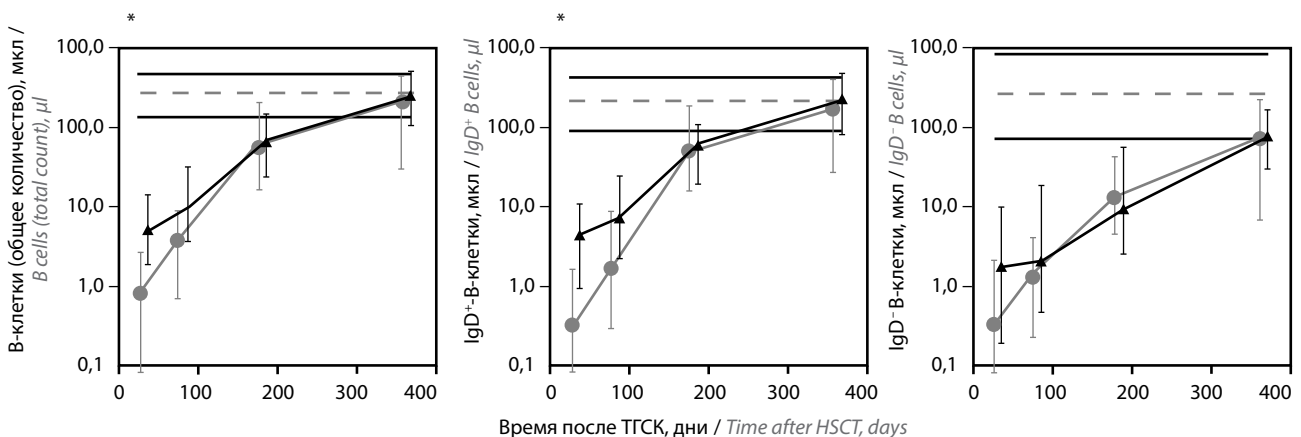


Рис. 2. Количество В-клеток после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Нормальные значения показаны в виде горизонтальных линий (жирная сплошная линия — для 10-го и 90-го перцентилей, пунктирная — для медианы); серые кружки — реципиенты костного мозга; черные треугольники — реципиенты периферических стволовых клеток. Столбики ошибок указывают на 25–75-й перцентили; *значительная разница при $p < 0,05$. Адаптировано из [35] с разрешения авторов

Fig. 2. B-cells count after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation (HSCT). Horizontal lines represent normal values (solid line — 10th and 90th percentile, dashed line — median); gray circles — bone marrow recipients; black triangles — recipients of peripheral stem cells. Error bars — the 25–75th percentile; *difference significant at $p < 0.05$. Adapted from [35] with permission of the authors

только 2 %, субпопуляции наивных В-клеток — около 50 %, а клеток памяти с переключением и без переключения класса Ig — примерно 10–15 % [33, 34]. В зависимости от источника ГСК численность популяции В-клеток отличается. По данным J. Storek и соавт., общее количество В-клеток, наивных и клеток памяти в 10–20 раз выше в трансплантате ПК по сравнению с КМ-трансплантатом (рис. 2) [35]. Следовательно, эти зрелые субпопуляции В-клеток пассивно

передаются в трансплантате ПК и могут быть обнаружены в большом количестве у реципиента на сроке 3 мес после трансплантации. Стоит отметить, что от источника получения ГСК зависит не только численность популяции В-клеток, но и темп ее восстановления. Как выявили исследователи, темп восстановления В-клеток быстрее у реципиентов КМ по сравнению с реципиентами ПК, что возможно из-за наличия большого количества предшественников В-клеток

в КМ-трансплантате [35]. Однако функциональная активность В-клеток при этом, по-видимому, одинакова, поскольку уровни Ig спустя 3 мес после алло-ТГСК сопоставимы при обоих видах трансплантации. При этом уровни Ig значительно ниже нормы [35].

Другая группа исследователей проанализировала результаты алло-ТГСК при использовании ППК и ПК. Оказалось, применение ППК приводит к быстрому восстановлению популяции В-клеток по сравнению с реципиентами ПК, что, по мнению авторов, отражает высокий пролиферативный потенциал клеток [36]. N. Vejanayan и соавт. также установили, что численность популяции В-клеток у реципиентов после алло-ТГСК с использованием ППК больше, чем у реципиентов ПК. Вместе с тем авторы обратили внимание, что использование в режимах кондиционирования анти timоцитарного Ig тормозило темпы восстановления В-клеточной популяции при обоих видах алло-ТГСК (независимо от источника ГСК) [37]. Негативное влияние анти timоцитарного Ig на В-лимфопоэз отмечено и другой группой ученых, которые установили, что у реципиентов, в режимах кондиционирования которых был использован анти timоцитарный Ig, в первые месяцы существенно замедляется восстановление популяции В-клеток, в частности $CD19^+CD21^{high}CD27^-$ -наивных и $CD19^+CD27^+$ -клеток памяти [38].

Значительное влияние на темпы восстановления популяции В-клеток оказывает острая РТПХ, которая представляет собой одно из тяжелых осложнений раннего посттрансплантационного периода [39–41]. Y. Shono и соавт. описали снижение количества предшественников В-клеток в КМ после алло-ТГСК на 30-й и 80-й день в случаях развития острой РТПХ [42].

Позднее в мультицентровом рандомизированном исследовании на большом количестве материала была доказана взаимосвязь между острой РТПХ и восстановлением В-клеточного звена после алло-ТГСК у разных групп реципиентов (КМ и ПК) [43]. У тех из них, у кого наблюдалось развитие острой РТПХ II–IV степени, количество В-клеток было значительно ниже, особенно в группе реципиентов КМ [43]. Кроме того, темпы восстановления популяции среди реципиентов КМ были медленнее, особенно при развитии острой РТПХ II–IV степени.

Активация ЦМВ как в ранний, так и в поздний посттрансплантационный период, в особенности у больных с РТПХ, также оказывает влияние на В-лимфопоэз [4, 12, 44]. Уже находясь в условиях иммунодефицита, организм реципиента сталкивается с реактивацией вирусных патогенов, что еще более усугубляет иммунодепрессию и тормозит возрождение адаптивного иммунитета. Высокая частота развития инфекции наблюдается при гаплоидентичной алло-ТГСК. Ввиду основной роли Т-лимфоцитов

в аллореактивности важное значение уделяется Т-В-клеточной деплеции, которая осуществляется путем включения в режим кондиционирования анти timоцитарного Ig или использования моноклональных антител. Учеными швейцарской группы по трансплантации ГСК был проведен ретроспективный анализ результатов гапло-ТГСК, выполненных с 1998 по 2010 г. [45]. Оказалось, что использование Т-(CD3/CD19)-В-клеточной деплеции *ex vivo* или применение анти-CD52-моноклонального антитела *in vivo* приводило к росту частоты инфекционных осложнений (рис. 3) [45]. В основном наблюдалась реактивация ЦМВ. Использование предложенной позднее методики TCR альфа/бета и CD19-деплеции, апробированной учеными из Германии, Италии, России, установило, что в первые месяцы после трансплантации сохраняется высокий риск развития тяжелых вирусных инфекций и в первую очередь ЦМВ [46].

Еще один фактор, оказывающий влияние на темпы восстановления В-лимфопоэза, – возраст реципиента. У детей старше 10 лет отмечается нарушение восстановления популяции В-клеток [47].

На основании изложенных данных о восстановлении В-клеточного звена исследователи утверждают, что развитие В-клеток до антителопродуцирующих форм происходит неполноценно. При анализе возможных причин, лежащих в основе задержки восстановления В-лимфопоэза, ученые в первую очередь рассматривают повреждение предшественников В-клеток, возникающее как результат «цитокинового шторма», а также в результате применения иммуносупрессивных препаратов в терапии РТПХ [42, 47]. Вместе с тем причиной замедления восстановления популяции может быть повреждение стромальной ниши ГСК

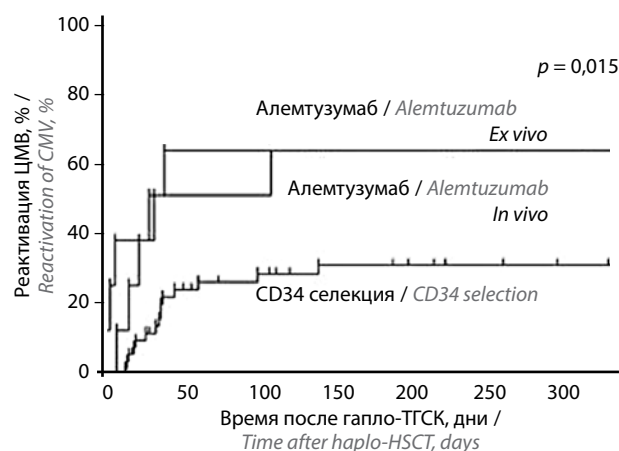


Рис. 3. Реактивация цитомегаловирусной инфекции (ЦМВ) после гаплогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (гаплогенной трансплантации). Адаптировано из [45] с разрешения авторов

Fig. 3. Reactivation of cytomegalovirus infection (CMV) after haplotransplantation of hematopoietic stem cells (haplo-HSCT). Adapted from [45] with permission of the authors

в КМ, которое обусловлено как самой трансплатацией, так и предтрансплантационной подготовкой.

Из экспериментальных исследований известно, что РТПХ ограничивает дифференцировку плазматоидных дендритных клеток [24], ухудшает созревание В-клеток [48], подавляет их количество и разнообразие [49]. Результатом становится увеличение аутореактивных В-клеток [50], а также уменьшение популяции наивных В1- и транзиторных В-лимфоцитов [51]. Пониженное количество плазматоидных дендритных и В-клеток может отражать эффекты воспаления, связанные с РТПХ, которые нарушают дифференцировку стволовых клеток в плазматоидные дендритные и В-клетки, а также эффекты стероидной терапии, используемой в лечении РТПХ [52].

Восстановление функции В-клеток

Необходимо понимать, что после алло-ТГСК важно полноценное восстановление не только количества В-клеток, но и их функции. Как известно, развитие В-лимфоцитов до антителопродуцирующих форм является сложным процессом, восстановление которого происходит поэтапно. В первые несколько месяцев после алло-ТГСК у В-клеток отсутствуют пролиферативные и дифференцировочные ответы на антигензависимую стимуляцию, что отражает их функциональную некомпетентность [53]. Только спустя 3 мес начинает восстанавливаться антителопродукция. В первую очередь нормализуется синтез IgM. Антитела класса М являются наиболее ранними в иммуногенезе, и многие из антител полиспецифичны, имея низкую аффинность, взаимодействуют с несколькими антигенами [32].

В работе группы авторов из США были изучены уровни IgM и темпы его восстановления после алло-ТГСК у реципиентов ППК и ПК [36, 37]. Ученые отметили, что уровни Ig после трансплантации на протяжении года существенно не отличаются у реципиентов ППК и ПК, что, по-видимому, отражает одинаковую функциональную незрелость субпопуляций В-клеток [37]. Вместе с тем темп восстановления продукции Ig быстрее в случае использования в качестве источника ГСК ППК [36]. Несмотря на это, у реципиентов после алло-ТГСК с использованием ППК инфекции наблюдаются значительно чаще. Так, высокий риск вирусных инфекций отмечается с 61-го по 180-й день, а с 30-го по 60-й день вероятен риск и вирусных, и бактериальных инфекций [37, 51, 54].

Что касается специфических IgG, то для восстановления их продукции, осуществляемой В-клетками памяти, требуется более длительный интервал времени. Восстановление уровней IgG после алло-ТГСК

происходит постепенно на 2-м году. В своем исследовании N. Bejanyan и соавт. изучили восстановление продукции IgG после алло-ТГСК у реципиентов в зависимости от источника получения ГСК [37]. Продукция IgG1 и IgG3 нормализуется в течение первого года после трансплантации, а дефицит IgG2 и IgG4 сохраняется в течение полутора лет. Продолжительный дефицит IgG2 может объяснить чрезмерную восприимчивость реципиентов к бактериальным инфекциям в позднем посттрансплантационном периоде.

Наиболее поздно происходит восстановление продукции IgA. Его важная роль в защите слизистых оболочек от патогенов частично объясняет продолжительный риск рецидивирующих инфекций желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей даже спустя годы после трансплантации. Следует отметить, что дефицит Ig гораздо более выражен и продолжителен у тех реципиентов, у которых развивается РТПХ, или у тех, кто получает анти timоцитарный Ig [31]. Использование в режимах кондиционирования анти timоцитарного Ig задерживает восстановление В-клеточной популяции, что объясняет сниженный уровень продукции антител [34].

Таким образом, у реципиента после алло-ТГСК наблюдается функциональная незрелость донорских лимфоцитов в сочетании с низким уровнем плазматических клеток реципиента, а также низкими уровнями Ig. Это наблюдается довольно продолжительное время, что приводит к снижению толерантности к вирусным и бактериальным патогенам после алло-ТГСК.

Заключение

Данные научных исследований свидетельствуют о том, что успех алло-ТГСК определяется полным восстановлением В-клеточного иммунитета реципиента. Известны различные факторы, оказывающие влияние на темпы восстановления популяции В-клеток: статус гематологического заболевания, возраст реципиента, источник получения ГСК, режимы кондиционирования, терапия РТПХ. Поэтому на текущий момент остается нерешенным вопрос: каким образом возможно оказывать влияние на темпы восстановления популяции В-клеток и их функциональной зрелости? Совокупные мировые данные указывают, что основным мощным фактором, способствующим задержке возрождения В-клеточного иммунитета, служит повреждение микроокружения КМ реципиента как результат предтрансплантационной подготовки. В связи с этим крайне актуальной представляется разработка технологий, нацеленных на обеспечение защиты иммунного окружения КМ, что позволит полноценно восстановить В-клеточный иммунный ответ.

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

- Young J.H., Logan B.R., Wu J. et al. Infections after transplantation of bone marrow or peripheral blood stem cells from unrelated donors. *Biol Blood Marrow Transplant* 2016;22(2):359–70. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.09.013.
- Pasquini M.C., Zhu X. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR Summary Slides, 2015. Available by: <http://www.cibmtr.org>.
- Socie G., Stone J.V., Wingard J.R. et al. Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late effects working committee of the international bone marrow transplant registry. *N Engl J Med* 1999;341:14–21. DOI: 10.1056/NEJM199907013410103.
- Eapen M., Rocha V., Sanz G. et al. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 2010;11:653–60. DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70127-3.
- Parody R., Martino R., Rovira M. et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:734–48. DOI: 10.1016/j.bbmt.2006.03.007.
- Thomas E.D., Lochte H.L.Jr, Lu W.C., Ferrebee J.W. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *New Engl J Med* 1957;257(11):491–6. DOI: 10.1056/NEJM195709122571102.
- Mathé G., Amiel J.L., Schwarzenberg L. et al. Successful allogeneic bone marrow transplantation in man: chimerism induced specific tolerance and possible antileukemic effects. *Blood* 1965;25:179–96.
- Субботина Н.Н., Долгополов И.С., Попа А.В. и др. Гаплоидентичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток у детей с острыми миелоидными лейкозами: эволюция метода и собственные данные. *Онкогематология* 2014;7(2):131–6. Subbotina N.N., Dolgoplov I.S., Popa A.V. et al. Haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in children with acute myeloid leukemia: evolution of the method and own data. *Onkohematologiya = Oncohematology* 2014;7(2):131–6. (In Russ.).
- Рукавицын О.А. Гематология: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 776 с. [Rukavitsyn O.A. Hematology: national leadership. Moscow: GEOTAR-Media, 2015. 776 p. (In Russ.).]
- Грицаев С.В., Павлова И.Е., Семенова Н.Ю. Отдельные аспекты трансплантации гемопоэтических стволовых клеток онкогематологическим больным. *Вестник гематологии* 2015;11(3):9–28. [Gritsaev S.V., Pavlova I.E., Semenova N.Yu. Some aspects of hematopoietic stem cell transplantation to oncohematological patients. *Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology* 2015;11(3):9–28. (In Russ.).]
- Carreras E., Rambaldi A. Evaluation and Counseling of Candidates. Eds.: E. Carreras, C. Dufour, M. Mohty, N. Kröger. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies*. 7th Ed. Cham (CH): Springer, 2019;11.
- Sauter C., Abboud M., Jia X. et al. Serious infection risk and immune recovery after double-unit cord blood transplantation without antithymocyte globulin. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(10):1460–71. DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.02.001.
- Winston D.J., Gale R.P., Meyer D.V., Young L.S. Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Med (Baltimore)* 1979;58:1–31. DOI: 10.1097/00005792-197901000-00001.
- Atkinson K., Storb R., Prentice R.L. et al. Analysis of late infections in 89 long-term survivors of bone marrow transplantation. *Blood* 1979;53:720–31.
- Kolb H.J. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 2008;112(12):4371–83. DOI: 10.1182/blood-2008-03-077974.
- Horowitz M.M., Gale R.P., Sondel P.M. et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75(3):555–62. DOI: 10.1182/blood.V75.3.555.bloodjournal753555.
- Мелкова К.Н., Петрова Г.Д., Горбунова Н.В. и др. Классификация режимов кондиционирования: исторические предпосылки и современные представления. *Клиническая онкогематология* 2017;10(4):494–500. [Melkova K.N., Petrova G.D., Gorbunova N.V. et al. Classification of conditioning modes: historical background and current understanding. *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2017;10(4):494–500. (In Russ.).] DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-4-494-5.
- Гривцова Л.Ю. Дифференцированный прогноз трансплантации стволовых клеток в онкологии. Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2015. [Grivtsova L.Yu. Differentiated prognosis of stem cell transplantation in oncology. Abstract of the dissertation of a doctor of biological sciences. Moscow, 2015. (In Russ.).]
- Williams K.M., Gress R.E. Immune reconstitution and implications for immunotherapy following haematopoietic stem cell transplantation. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008;21(3):579–96. DOI: 10.1016/j.beha.2008.06.003.
- Fujimaki K., Maruta A., Yoshida M. et al. Immune reconstitution assessed during five years after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2001;27(12):1275–81. DOI: 10.1038/sj.bmt.1703056.
- Komanduri K.V., St John L.S., de Lima M. et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007;110:4543–51. DOI: 10.1182/blood-2007-05-092130.
- Ringhoffer S., Rojewski M., Dohner H. et al. T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation: assessment by measurement of the sjTREC/βTREC ratio and thymic naive T-cells. *Haematologica* 2013;98:1600–8. DOI: 10.3324/haematol.2012.072264.
- Di Ianni M., Falzetti F., Carotti A. et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117(14):3921–8. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311894.
- Mehta R.S., Rezvani K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. *Virulence* 2016;7(8):901–16. DOI: 10.1080/21505594.2016.1208866.
- Storek J., Geddes M., Khan F. et al. Reconstitution of the immune system after hematopoietic stem cell transplantation in humans. *Semin Immunopathol* 2008;30(4):425–37. DOI: 10.1007/s00281-008-0132-5.
- Bosch M., Khan F.M., Storek J. Immune reconstitution after hematopoietic cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2012;19(4):324–35. DOI: 10.1097/MOH.0b013e328353bc7d.
- Storek J., Ferrara S., Ku N. et al. B cell reconstitution after human bone marrow transplantation: recapitulation of ontogeny? *Bone Marrow Transplant* 1993;12(4):387–98.

28. Gerritsen E.J., van Tol M.J., Lankester A.C. et al. Immunoglobulin levels and monoclonal gammopathies in children after bone marrow transplantation. *Blood* 1993;82(11):3493–502.
29. Привцова Л.Ю., Глухов Е.В., Чулкова С.В. и др. Особенности В-клеточного звена иммунитета у больных раком желудка после спленэктомии. *Иммунология* 2014;35(5):279–86. [Grivtsova L.Yu., Glukhov E.V., Chulkova S.V. et al. Features of B-cell immunity in patients with gastric cancer after splenectomy. *Immunologiya = Immunology* 2014;35(5):279–86. (In Russ.)].
30. Burns D.M., Tierney R., Shannon-Lowe C. et al. Memory B cell reconstitution following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation is an EBV-associated transformation event. *Blood* 2015;126(25):2665–75. DOI: 10.1182/blood-2015-08-665000.
31. Marie-Cardine A., Divay F., Dutot I. et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 2008;127:14–25. DOI: 10.1016/j.clim.2007.11.013.
32. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Грищенко Н.В. и др. Ключевая роль популяции В-1 в иммунном ответе у больных раком желудка. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(4):64–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70. [Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Grishchenko N.V. et al. The role of B-1 lymphocytes in antitumor immunity in patients with gastric cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(4):64–70. (In Russ.)].
33. Sims G.P., Ettinger R., Shiota Y. et al. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 2005;105:4390–8. DOI: 10.1182/blood-2004-11-4284.
34. Klein U., Rajewsky K., Kuppers R. Human immunoglobulin (Ig)M⁺ IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B-cells. *J Exp Med* 1998;188:1679–89. DOI: 10.1084/jem.188.9.1679.
35. Storek J., Dawson M.A., Storer B. et al. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001;97:3380–9. DOI: 10.1182/blood.V97.11.3380.
36. Jacobson C.A., Turki A.T., McDonough S.M. et al. Immune reconstitution after double umbilical cord blood stem cell transplantation: comparison with unrelated peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;18:565–74. DOI: 10.1016/j.bbmt.2011.08.018.
37. Bejanyan N., Brunstein Claudio G., Cao Qing et al. Delayed immune reconstitution after allogeneic transplantation increases the risks of mortality and chronic GVHD. *Blood Adv* 2018;2(8):909–22. DOI: 10.1182/bloodadvances.2017014464.
38. Abdel-Azim H., Elshoury A., Mahadeo Kris M. et al. Humoral immune reconstitution kinetics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: a maturation block of IgM memory B cells may lead to impaired antibody immune reconstitution. *Biol Blood Marrow Transplant* 2017;23(9):1437–46. DOI: 10.1016/j.bbmt.2017.05.005.
39. Kalwak K., Gorczyńska E., Toporski J. et al. Immune reconstitution after haematopoietic cell transplantation in children: immunophenotype analysis with regard to factors affecting the speed of recovery. *Br J Haematol* 2002;118(1):74–89. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2002.03560.x.
40. Clave E., Busson M., Douay C. et al. Acute graft-versus-host disease transiently impairs thymic output in young patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2009;113(25):6477–84. DOI: 10.1182/blood-2008-09-176594.
41. Petersen S.L., Ryder L.P., Bjork P. et al. A comparison of T-, B- and NK-cell reconstitution following conventional or nonmyeloablative conditioning and transplantation with bone marrow or peripheral blood stem cells from human leucocyte antigen identical sibling donors. *Bone Marrow Transplant* 2003;32(1):65–72. DOI: 10.1038/sj.bmt.1704084.
42. Shono Y., Ueha S., Wang Y. et al. Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010;115(26):5401–11. DOI: 10.1182/blood-2009-11-253559.
43. Waller E.K., Logan B.R., Fei M. et al. Kinetics of immune cell reconstitution predict survival in allogeneic bone marrow and G-CSF-mobilized stem cell transplantation. *Blood Adv* 2019;3(15):2250–63. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018029892.
44. Peterson P.K., McGlave P., Ramsay N.K. et al. A prospective study of infectious diseases following bone marrow transplantation: emergence of Aspergillus and Cytomegalovirus as the major causes of mortality. *Infect Control* 1983;4(2):81–9. DOI: 10.1017/s0195941700057805.
45. Marek A., Stern M., Chalandon Y. et al. The impact of T-cell depletion techniques on the outcome after haploidentical hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 2014;49:55–61. DOI: 10.1038/bmt.2013.132.
46. Aversa F., Pierini A., Ruggeri L. et al. The Evolution of T Cell Depleted Haploidentical Transplantation. *Front Immunol* 2019;10:2769. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02769.
47. Storek J., Wells D., Dawson M.A. et al. Factors influencing B lymphopoiesis after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2001;98(2):489–91. DOI: 10.1097/00007890-200204150-00026.
48. Remberger M., Ringd'en O., Blau I.W. et al. No difference in graft-versus-host disease, relapse, and survival comparing peripheral stem cells to bone marrow using unrelated donors. *Blood* 2001;98(6):1739–45. DOI: 10.1182/blood.V98.6.1739.
49. Zorn E., Kim H.T., Lee S.J. et al. Reduced frequency of FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106(8):2903–11. DOI: 10.1182/blood-2005-03-1257.
50. Sarantopoulos S., Stevenson K.E., Kim H.T. et al. Altered B-cell homeostasis and excess BAFF in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2009;113(16):3865–74. DOI: 10.1182/blood-2008-09-177840.
51. Sarantopoulos S., Stevenson K.E., Kim H.T. et al. Recovery of B-cell homeostasis after rituximab in chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2011;117(7):2275–83. DOI: 10.1182/blood-2010-10-307819.
52. Waller E.K., Logan B.R., Harris W.A. et al. Improved survival after transplantation of more donor plasmacytoid dendritic or naive T cells from unrelated-donor marrow grafts: results from BMTCTN 0201. *J Clin Oncol* 2014;32(22):2365–72. DOI: 10.1200/JCO.2013.54.4577.
53. Matsue K., Lum L.G., Witherspoon R.P., Storb R. Proliferative and differentiative responses of B cells from human marrow graft recipients to T cell-derived factors. *Blood* 1987;69:308–15.
54. Szabolcs P., Niedzwiecki D. Immune reconstitution after unrelated cord blood transplantation. *Cytotherapy* 2007;9(2):111–22. DOI: 10.1080/14653240701231014.

Вклад авторов

С.В. Чулкова: написание текста рукописи, подготовка рукописи, перевод;
Н.Н. Субботина, Г.Д. Петрова: обзор и анализ публикаций по теме статьи;
О.П. Колбацкая: дизайн, обзор публикаций;
Н.Н. Тупицын: идея, анализ рукописи;
А.Ю. Нуртазина: анализ рукописи, оформление;
Н.В. Сидорова: анализ рукописи.

Authors' contributions

S.V. Chulkova: manuscript writing, manuscript preparation, translation;
N.N. Subbotina, G.D. Petrova: review and analysis of publications on the topic of the article;
O.P. Kolbatskaya: design, review of publications;
N.N. Tupitsyn: idea, manuscript analysis;
A.Yu. Nurtazina: manuscript analysis, design;
N.V. Sidorova: manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>
О.П. Колбацкая / O.P. Kolbatskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8493-9012>
А.Ю. Нуртазина / A.Yu. Nurtazina: <https://orcid.org/0000-0002-2337-3307>
Н.В. Сидорова / N.V. Sidorova: <http://orcid.org/0000-0003-3797-5808>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 19.09.2019. Принята к публикации: 03.03.2020.

Article submitted: 19.09.2019. Accepted for publication: 03.03.2020.

ПАПИЛЛОМАВИРУСНЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ. ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ

ЧАСТЬ 2. ВПЧ-АССОЦИИРОВАННЫЕ ФОРМЫ РАКА В РОССИИ. ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ВПЧ-ВАКЦИНЫ*

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

В России в структуре онкологической заболеваемости женщин на долю рака шейки матки (РШМ) в 2015 г. приходилось около 5 %; прирост заболеваемости РШМ за период с 2005 по 2015 г. составил 24,47 %. Несмотря на то что в целом показатели смертности от злокачественных новообразований за 2005–2015 гг. у мужчин и женщин снизились, смертность женщин от РШМ в этот период выросла на 8,3 %. В возрастной группе 30–39 лет смертность от РШМ выходит на 1-е место среди всех причин смерти от злокачественных новообразований. Помимо этого, у лиц обоих полов в период с 2005 по 2015 г. увеличились показатели заболеваемости раком ротовой полости и глотки, а также раком полового члена у мужчин, что выступает, как и в случае с РШМ, проявлением тревожной тенденции. Настоящая часть обзора посвящена формам рака, ассоциированным с вирусами папилломы человека (ВПЧ), в России, вертикальной передаче ВПЧ, а также профилактическим ВПЧ-вакцинам.

Ключевые слова: канцерогенез, вирусы папиллом, профилактические вакцины против вируса папилломы человека

Для цитирования: Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 2. ВПЧ-ассоциированные формы рака в России. Профилактические ВПЧ-вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):31–8.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-31-38



PAPILLOMAVIRAL CARCINOGENESIS. MAJOR ACHIEVEMENTS AND CERTAIN CHALLENGES PART 2. HPV-ASSOCIATED CANCERS IN RUSSIA. PREVENTIVE HPV VACCINES*

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

Cervical cancer (CC) incidence rate made up about 5 % in overall women cancer incidence in Russia in 2015. CC morbidity rose by 24.47 % during 2005–2015. Despite the fact that aggregated standardized cancer mortality rates for both men and women during 2005–2015 declined, women CC mortality increased by 8.3 %. CC is the leading cancer mortality cause in women aged 30–39 years. Moreover growth of oral and pharynx cancer incidence rates in both genders as well as penile cancer in men all indicate to an unfavorable trend. The present Review part contains data on HPV-associated cancers in Russia, vertical HPV transition as well as preventive HPV vaccines.

Key words: carcinogenesis, papillomaviruses, human papillomavirus vaccine

For citation: Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 2. HPV-associated cancers in Russia. Preventive HPV vaccines. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):31–8. (In Russ.).

Вирусы папилломы человека (ВПЧ) высокого онкогенного риска — этиологические агенты рака шейки

матки (РШМ) у женщин, а также ряда других новообразований аногенитальной области, головы и шеи [1].

*Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 1. Общие представления о папилломавирусах. Формы рака, ассоциированные с вирусами папилломы человека. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(1):6–12.

*Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part I. General notions of papillomaviruses. Human papillomaviruses-associated cancers. Russian Journal of Biotherapy 2020;19(1):6–12.

ВПЧ-ассоциированные формы рака в России

В структуре онкологической заболеваемости российских женщин на долю РШМ в 2015 г. приходилось 5,2 %. Тогда диагноз РШМ был установлен впервые в жизни у 16 740 женщин. Средний возраст этих женщин составлял 52 года (в 2005 г. — 53,3 года). Прирост заболеваемости РШМ за период с 2005 по 2015 г. равен 24,47 %. В структуре смертности женского населения России РШМ находится на 10-м месте (4,8 %), но в группе 30–39 лет уровень смертности от РШМ выходит на 1-е место среди всех причин смерти от злокачественных новообразований (ЗНО) — 24,3 %. Несмотря на то что в целом стандартизованные показатели смертности от ЗНО за период 2005–2015 гг. снизились как среди мужского, так и среди женского населения России, смертность женщин от РШМ в этот период выросла на 8,3 % [2]. Программы скрининга РШМ в России пока не внедрены, а стоимость комплексного лечения 1 случая РШМ, согласно экспертным оценкам, составляет около 1,1 млн руб. [3]. Как и в мире в целом, ВПЧ типа 16 преобладает среди онкогенных ВПЧ в биопсиях, полученных из образцов РШМ от российских больных, 2-м по частоте обнаружения является ВПЧ типа 18 [4]. Помимо РШМ, ДНК канцерогенных ВПЧ обнаружена в образцах рака мочевого пузыря и предстательной железы у российских больных [5, 6]. На большой выборке здоровых российских мужчин (752 человека, средний возраст — 32 года), обследованных на наличие инфекций, передаваемых половым путем, ДНК онкогенных ВПЧ была выявлена в 42 % случаев в мочеиспускательном канале и/или секрете предстательной железы [7].

Что касается других форм ЗНО, ассоциированных с канцерогенными ВПЧ (без вычленения собственно ВПЧ-положительных случаев), то в 2015 г. среди мужчин абсолютное число случаев впервые в жизни установленного диагноза рака полости рта составило 6268 (в 2005 г. — 4663), среди женщин — 2693 (в 2005 г. — 1716). Рак глотки был выявлен в 2015 г. у 4658 мужчин (в 2005 г. — у 3518), у женщин данный показатель составил 749 (в 2005 г. — 514). Рак полового члена в 2015 г. диагностирован у 606 мужчин (в 2005 г. — у 442). Средний возраст мужчин и женщин за этот период не изменился: при раке полости рта в 2015 г. он составил 60,8 года, при раке глотки — 60,1. Прирост «грубого» показателя заболеваемости раком полости рта на 100 тыс. населения для лиц обоих полов составил 34,5 %, заболеваемости раком глотки — 24,25 %, заболеваемости мужчин раком полового члена — 35,93 %. На фоне общего снижения показателей смертности от ЗНО за период с 2005 по 2015 г. как среди мужчин, так и среди женщин отмечен рост уровня смертности среди женщин от рака полости рта и глотки на 19,9 % [2].

Итак, вопреки тому, что уровень заболеваемости и смертности от РШМ снижается во многих развитых

странах, что связано с уменьшением распространенности ВПЧ-инфекции, а также с проведением массового организованного цитологического скрининга, позволяющего диагностировать не только РШМ на ранних стадиях, но и предраковые неоплазии, в России показатели заболеваемости и смертности от данной формы рака увеличиваются. Причиной неблагоприятных тенденций, сохраняющихся в России, следует признать отсутствие программ организованного скрининга, а «попытки заменить организованный скрининг на основании рекомендаций Всемирной организации здравоохранения диспансеризацией населения вряд ли приведут к снижению заболеваемости и смертности от рака данной локализации» [8]. Подтверждением этой точки зрения эпидемиологов являются данные популяционно-больничного канцер-регистра Центральной клинической больницы с поликлиникой Управления делами Президента РФ. Благодаря высокому уровню ранней диагностики и качества лечения больных здесь показатель заболеваемости РШМ значительно ниже общепопуляционного (2,2 %), а в период с 2000 по 2017 г. отмечена выраженная тенденция к уменьшению заболеваемости и незначительная — к снижению показателей смертности от данной формы рака [9]. Отмеченный у лиц обоих полов в период с 2005 по 2015 г. рост показателей заболеваемости раком ротовой полости и глотки, а также раком полового члена у мужчин служит, как и в случае с РШМ, проявлением тревожной тенденции и свидетельствует в пользу необходимости профилактики ВПЧ-инфекции в России.

О вертикальной передаче ВПЧ

Заражение ВПЧ традиционно рассматривается как инфекция, передаваемая половым путем (горизонтально): при генитально-генитальных, генитально-оральных, генитально-мануальных и других контактах с зараженным эпителием. Однако несколько авторов сообщили о присутствии ВПЧ в эпителии ротовой полости, слизистой оболочке глаза, а также на гениталиях новорожденных и детей младшего возраста, не имевших сексуальных контактов [10–13]. Оказалось, что кроме полового возможны и иные пути заражения, например интранатальный — при прохождении плода по родовым путям ВПЧ-зараженной матери, из плаценты или через пуповинную кровь, где также встречаются ВПЧ [13, 14].

В рамках проспективного когортного обследования финских семей проблемой вертикальной передачи ВПЧ занимаются проф. С. Сирьянен и его коллеги. По их данным, семьи, в которых все трое (младенец, мать и отец) заражены онкогенным ВПЧ, нередки — они составили 29 %. Семьи, в которых заражены только мать и младенец, составили 26 %;

реже встретились семьи, в которых ВПЧ-инфицированными были только ребенок и отец, — 11 % (здесь среди прочих обсуждается гипотеза вертикальной передачи вируса от отца через зараженную сперму); в 8 % семей инфицированным ВПЧ был только младенец, что дает основание предполагать неизвестные пока источники заражения. Возраст 6 мес исследователи выделили как критичный для ребенка: к этому моменту он или заразился ВПЧ, или оказывался стабильно свободным от этой инфекции [10].

К настоящему времени установлено, что «материнскими» факторами риска вертикальной передачи вируса ребенку являются длительная инфекция цервикального канала матери ВПЧ высокого риска, одновременная инфекция эпителия шейки матки ВПЧ нескольких типов, ВПЧ-инфекция плаценты, бородавки на руках матери, юный возраст сексуального дебюта матери, использование ею оральных контрацептивов, присутствие ВПЧ в пуповинной крови [15]. Очевидно, что дети, оказавшиеся инфицированными ВПЧ в младенчестве, составляют группу повышенного риска развития аногенитального рака, а также рака ротовой полости. Казалось бы, более чем уместно рекомендовать им профилактическую ВПЧ-вакцинацию по достижении ими соответствующего возраста. Однако остается пока открытым вопрос об особенностях формирования у таких детей иммунного ответа на введение ВПЧ-вакцин и на возможное заражение их ВПЧ после того, как они начнут половую жизнь. Получены первые указания о том, что гуморальный и клеточный иммунитет к ВПЧ типа 16 у детей с персистирующей с младенчества ВПЧ-инфекцией может не сформироваться [16]. Насколько типичны такие случаи, станет ясно при продолжении исследований. На особенности функционирования иммунитета у этих детей указывает и тот факт, что бактериальная микрофлора ротовой полости у них, по последним данным, значимо коррелирует с их ВПЧ-статусом [17].

Масштаб проблемы, обусловленной вертикальной передачей ВПЧ новорожденным, проявится в ходе дальнейшей работы. Однако уже получены данные, предупреждающие об опасности ее недооценки. Так, в проспективном когортном исследовании, проводимом в Канаде, ВПЧ одного или нескольких типов были обнаружены в эпителии шейки матки и/или влагалища в I триместре беременности у 45 % женщин, плацента была ВПЧ-инфицированной у 14 % из них, в 11 % случаев дети в возрасте до 3 мес имели ВПЧ в разных частях тела: на конъюнктиве, в ротовой полости, гортани, на гениталиях [13]. У 17,3 % мальчиков, не имевших половых контактов, было зафиксировано присутствие ВПЧ в клетках крайней плоти, в том числе онкогенных ВПЧ — у 12,1 % из них [18]. В целом очевидно, что данная группа детей должна

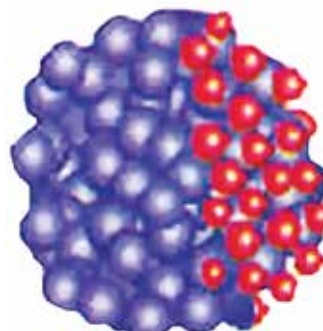
находиться в фокусе внимания педиатров, иммунологов и онкологов.

Профилактические ВПЧ-вакцины

Как было описано в 1-й части обзора, жизненный цикл ВПЧ, завершающийся высвобождением зрелых вирусных частиц, проходит в многослойном эпителии параллельно с дифференцировкой эпителиальных клеток [1]. Моделирование *in vitro* или *in ovo* условий, при которых ВПЧ проходили бы подобный цикл в многослойном дифференцирующемся эпителии и представилась бы возможность нарабатывать количество вируса, достаточное для выпуска вакцины (подобно тому, как создаются вакцины против полиомиелита, кори и других заболеваний), сопряжено с рядом методических трудностей [19, 20].

Создание профилактических ВПЧ-вакцин стало возможным благодаря обнаружению у белка L1, основного структурного белка ВПЧ, способности к самосборке в вирусоподобные частицы (VLPs), очень похожие на зрелые вирионы, включающие эпитопы, к которым при попадании этих частиц в организм человека вырабатываются нейтрализующие антитела (см. рисунок). VLPs не содержат ДНК вируса и поэтому неинфекционны и неканцерогенны (подробности и сведения о соответствующих патентах см. [21]). На сегодня созданы и используются следующие 3 профилактические ВПЧ-вакцины, все они представляют собою суспензии, вводимые внутримышечно в объеме 0,5 мл.

Церварикс (Cervarix) — 2-валентная вакцина против ВПЧ (HPV-2) (производство компании GlaxoSmithKline Biologicals, Риксенсарт, Бельгия) — пролицензирована Food and Drug Administration (FDA) (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов, США) в 2007 г., одобрена в Европе и Австралии, рекомендована для введения



Вирион ВПЧ. Красная окраска части капсомеров отражает результат реакции нейтрализующих антител с белком L1. Фрагмент эмблемы 25-й Международной конференции по папилломавирусам (Швеция, 2009)

HPV virion. The capsomeres in red depict results of neutralising antibodies interaction with the protein L1. The fragment of the 25th International Conference on Papillomaviruses (Sweden, 2009)

девочкам и женщинам в возрасте от 10 до 25 лет. Вакцина содержит L1 VLPs, продуцируемые в культивируемых *in vitro* клетках насекомого *Trichoplusia ni* (совка ни, cabbage looper moth), инфицированных рекомбинантным бакуловирусом, несущим последовательности ДНК L1 ВПЧ типов 16 и 18. Содержит адъювант ASO₄, который состоит из 50 мкг 3-О-деацетилованного-4-монофосфорил-липид А, адсорбированного на 500 мкг гидрооксида алюминия. В состав вакцины входят VLPs ВПЧ типов 16 и 18: рекомбинантный L1 ВПЧ типа 16 – 20 мкг, рекомбинантный L1 ВПЧ типа 18 – 20 мкг. Рекомендована для 3-кратного введения: 2-я доза – не ранее 1 мес после введения 1-й, 3-я – не ранее 6 мес после 1-й. Вакцина зарегистрирована в России, показания к применению: девочкам в возрасте от 10 до 17 лет, женщинам в возрасте от 18 до 45 лет [3].

Гардасил (Gardasil) – 4-валентная вакцина против ВПЧ (известна также как Silgard, производство компании Merck and Co., Inc, Нью-Джерси, США) – была пролицензирована FDA в 2006 г. 1 доза вакцины содержит 120 мкг антигена (VLPs рекомбинантного L1 ВПЧ типа 6 (20 мкг), 11 (40 мкг), 16 (40 мкг) и 18 (20 мкг)). Вакцина содержит L1 VLPs, продуцируемые в клетках пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*), в качестве адъюванта используется гидроксифосфат сульфата алюминия (225 мкг). Пролицензирована вакцина во многих странах, вводится девочкам и женщинам в возрасте 9–26 лет в целях профилактики РШМ, рака вульвы, вагины, ануса, индуцируемых ВПЧ типов 16 и 18, а также аногенитальных бородавок, вызываемых ВПЧ типов 6, 11, и цервикальных, анальных, вагинальных и вульварных предраковых поражений. В ряде стран практикуются также прививки мальчиков и мужчин в возрасте 9–26 лет в целях предупреждения анального рака, вызываемого ВПЧ типов 16 и 18, аногенитальных бородавок, индуцируемых ВПЧ типов 6, 11, диспластических повреждений эпителия анального канала, вызываемых всеми 4 типами ВПЧ. Вакцина рекомендована для 3-кратного введения: 2-я доза – через 2 мес после 1-й, 3-я – спустя 6 мес после 1-й. Вакцина зарегистрирована в России. Показания к применению: девочкам и мальчикам в возрасте от 9 до 17 лет, женщинам от 18 до 45 лет, мужчинам от 18 до 26 лет [3].

Gardasil 9 (производство компании Merck and Co., Inc, Нью-Джерси, США) – 9-валентная вакцина – 9vHPV (6/11/16/18/31/33/45/52/58), основанная на VLPs и обеспечивающая защиту дополнительно еще от 5 онкогенных ВПЧ. В качестве адъюванта используется гидрофосфат сульфат алюминия (500 мкг). Одобрена FDA в 2014 г. Содержит в 1 дозе VLPs в следующих количествах: ВПЧ типа 6 (30 мкг), типа 11 (40 мкг), типа 16 (60 мкг), типа 18 (40 мкг), типа 31 (20 мкг), типа 33 (20 мкг), типа 45 (20 мкг), типа 52

(20 мкг) и типа 58 (20 мкг). Рекомендована для введения девочкам и женщинам в возрасте от 9 до 26 лет, а также мальчикам в возрасте от 9 до 15 лет. Схема вакцинации та же, что и при введении гардасила. В то время как церварикс и гардасил способны защищать предположительно от 70 % злокачественных ВПЧ-ассоциированных новообразований, гардасил 9 создан, чтобы предупреждать до 90 % этих новообразований. В России гардасил 9 пока не зарегистрирован.

Ввиду того, что инфекция ВПЧ ограничена эпителиальными клетками, весьма ограничена и презентация вирусных антигенов иммунной системы организма человека. При естественном заражении ВПЧ аногенитального эпителия у большинства индивидов формируется гуморальный иммунный ответ, интенсивность которого зависит от вирусной нагрузки и длительности инфицирования; антитела к ВПЧ присутствуют в сыворотке крови зараженного индивида длительно, но они не способствуют устранению ранее произошедшего заражения, – эти антитела взаимодействуют со свободными вирусными частицами, препятствуя их проникновению в эпителиальную клетку [22, 23]. Капсид ВПЧ, как отмечалось ранее, состоит из 2 вирусных белков: главного белка L1, а также белка L2 [1]. Вируснейтрализующие антитела к белку L1 типоспецифичны. Что касается белка L2, то он располагается главным образом внутри капсомеров, и лишь небольшой его сегмент находится на поверхности вириона и может распознаваться вируснейтрализующими антителами. VLP на основе L1 ВПЧ несут те же эпитопы, что и инфекционный вирус. Ожидаемым оказалось, что внутримышечное введение вакцин на основе VLP вызывает гуморальный иммунный ответ, на несколько порядков более выраженный, чем тот, который регистрируется при естественном заражении ВПЧ [23].

Несмотря на то что при разработке этих вакцин главная цель состояла в предупреждении развития РШМ, оценивать их эффективность путем фиксации случаев рака невозможно ни по методическим, ни по этическим причинам. Прежде всего, латентный период между заражением ВПЧ и развитием раковой опухоли может составлять несколько десятилетий, и столь длительное наблюдение с начала вакцинаций пока неосуществимо. Кроме того, в развитых странах, где начато массовое использование этих вакцин, практикуется и массовый скрининг женщин, предполагающий лечение предраковой неоплазии в случае ее обнаружения. В связи с этим при оценке эффективности вакцин используются промежуточные (иногда именуемые суррогатными) результаты (end-points) вакцинаций [23]. Это персистирующая (≥6 мес) ВПЧ-инфекция, а также гистологически подтвержденные умеренные и тяжелые дисплазии эпителия шейки

матки, предраковая неоплазия II и III степени соответственно [24, 25].

Высокая эффективность 2-, 4- и 9-валентных профилактических ВПЧ-вакцин продемонстрирована в рандомизированных многоцентровых клинических исследованиях II и III фаз [3, 26, 27]. Использование 4-валентной вакцины с 3-кратной иммунизацией девочек-подростков дало 100 % эффективность в отношении цервикально-генитальных патологий, ассоциированных с ВПЧ типов 6, 11, 16 и 18, при наблюдении в течение 10 лет; использование бивалентной вакцины при аналогичной схеме иммунизации завершилось подтверждением полной эффективности в отношении цервикальных новообразований, связанных с ВПЧ типов 16 и 18, — follow up в этом случае составило 9,4 года. Что касается 9-валентной вакцины, то эффективность ее введения девочкам-подросткам была 100 % в отношении ВПЧ-инфекции вакцинными штаммами вируса и ВПЧ-ассоциированных дисплазий эпителия шейки матки, влагалища и вульвы при наблюдении на протяжении 5,6 года [28].

В отношении безопасности всех 3 профилактических ВПЧ-вакцин на основании обобщенного опыта их использования в США, Японии, Австралии и ряде других стран не возникло опасений. Зафиксированы локальные реакции у привитых в виде боли в месте инъекции (84 %), покраснения (<25 %) и отека (25 %) [28].

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2017 г. в национальный календарь прививок ВПЧ-вакцинация включена для девочек в 71 стране, для мальчиков — в 11 странах [28]. С материалами, обосновывающими позицию ВОЗ по профилактическим ВПЧ-вакцинам, можно ознакомиться по электронному адресу: <http://www.who.int/immunization/documents/positionpapers/en/index.html>.

«Феминизация» проблемы ВПЧ, ее отрицательные последствия. Профилактические вакцинации мальчиков

Ввиду того, что именно РШМ стал первой формой рака, для которой была доказана роль ВПЧ как этиологических агентов, именно девочки первоначально стали адресатами 4-валентной вакцины в США. Мальчикам проведение этой прививки на регулярной основе было рекомендовано лишь в 2011 г. после осознания возможности предупредить с ее помощью такие ЗНО, как анальный рак и рак ротоглотки, а также аногенитальные папилломы [29]. Однако представления о папилломавирусном канцерогенезе и ВПЧ-вакцинациях как преимущественно «женских» проблемах по-прежнему остаются весьма укоренившимися и имеют отрицательные последствия как для мужчин, так и для женщин. Отмечено, что в странах, где 4-валентная вакцина рекомендована

не только девочкам, но и мальчикам, уровень охвата этими прививками женских контингентов стабильно более высокий, чем уровень охвата мужских. Это ведет к недостаточно эффективной профилактике «мужских» ВПЧ-ассоциированных форм ЗНО. Насколько недостаточной, на сегодня не представляется возможным оценивать как из-за длительности латентного периода ВПЧ-индуцированных форм рака, так и из-за отсутствия среди мужских контингентов отработанных скрининговых процедур, подобных практикуемым в ряде развитых стран при профилактике РШМ, которые позволяли бы выявлять предраковые нарушения эпителия ротовой полости, анального канала, полового члена. Помимо этого, низкий охват вакцинацией мальчиков — причина неэффективности этой процедуры на уровне популяции в целом, в том числе по отношению к невакцинированным ее членам (см. далее о коллективном иммунитете). К тому же мужчины, поддерживающие гомосексуальные контакты, остаются группой повышенного риска возникновения ВПЧ-ассоциированных карцином: они часто не декларируют и скрывают свою ориентацию, на них в последнюю очередь распространяется коллективный иммунитет.

Профилактика ВПЧ-ассоциированных форм рака у женщин в таких популяциях неизбежно окажется менее эффективной, чем в популяциях с широким охватом как женщин, так и мужчин; сравнительная экономическая эффективность ВПЧ-вакцинаций в популяциях, где не только девочки, но и мальчики охвачены широко и где охват мал, будет оценена в будущем, обоснованно предполагается, что сравнение окажется в пользу первых [29]. Итак, «феминизация» проблемы ВПЧ требует активного преодоления.

Естественная циркуляция ВПЧ среди мужчин имеет ряд особенностей по сравнению с распространением его среди женщин, в частности, иммунный ответ на повторное заражение ВПЧ у мужчин выражен слабее, чем у женщин [30]. Как уже отмечалось, ВПЧ типов высокого риска вызывают у мужчин ЗНО (рак полового члена, карциномы головы и шеи и, возможно, рак предстательной железы и мочевого пузыря), а ВПЧ типов 6 и 11 — и аногенитальные папилломы [18]. Важность вакцинаций не только девочек, но и мальчиков для уменьшения распространения ВПЧ в популяции, а также для предупреждения ВПЧ-ассоциированных ЗНО как у женщин (в первую очередь РШМ), так и у мужчин была отмечена неоднократно [3, 31, 32]. Иммуногенность и эффективность 4-валентной ВПЧ-вакцины на группах мальчиков и молодых мужчин подтвердили несколько групп исследователей [33, 34]. ВОЗ, оценивая целесообразность профилактических ВПЧ-прививок мальчиков и мужчин, рекомендует в каждой конкретной стране принимать

во внимание организационную и экономическую осуществимость данной программы, а также то, не отвлечет ли это средства из программ профилактических прививок девочек (основного целевого контингента) и скрининга РШМ [35].

Коллективный иммунитет против ВПЧ

Требуется прояснения вопрос относительно эффекта вакцинаций на уровне популяции в целом, включающего как перекрестную защиту (от типов вирусов, которые не входят в вакцину) у вакцинированных лиц, так и косвенные последствия вакцинации девочек среди невакцинированных мальчиков, мужчин и взрослых женщин (herd effect — буквально «стадный эффект»). Был проведен метаанализ популяционных последствий ВПЧ-вакцинаций в 9 экономически развитых странах, где вакцинации девочек были введены в 2007 г., максимальный период наблюдения составил 7 лет. Для оценки эффективности вакцинаций учитывали распространенность ВПЧ-инфекции и частоту аногенитальных бородавок [36]. Популяционные эффекты существенно различались в зависимости от того, насколько полным был охват группы девочек, подлежащих вакцинации 4-валентной вакциной. В случаях, когда данный показатель был не менее 50 %, инфицированность ВПЧ типов 16 и 18 непосредственно среди провакцинированных от момента введения вакцины до момента окончательного учета результатов уменьшилась на 68 %, частота аногенитальных бородавок в этой группе снизилась на 61 %. В данной возрастной группе (от 13 до 19 лет) девочек было также зафиксировано достоверное снижение показателя (на 28 %) инфицированности ВПЧ типов 31, 33 и 45, что свидетельствует о перекрестной защите от типов ВПЧ, не входящих в состав вакцины. Имело место и значимое снижение частоты аногенитальных бородавок у мальчиков в возрасте до 20 лет, а также у женщин в группе от 20 до 39 лет, что указывало на эффект ВПЧ-вакцинации среди невакцинированных. Что касается популяций, в которых охват девочек при вакцинации был <50 %, то здесь был обнаружен достоверный эффект только среди провакцинированных. Перекрестная защита, а также защита от ВПЧ среди непривакцинированных мальчиков и взрослых женщин не наблюдалась.

Результаты этого масштабного исследования носят предварительный характер. Вопросы о том, с какой скоростью снижается во времени эффект вакцинации, а также о том, происходит ли после вакцинации замещение одних онкогенных типов

ВПЧ другими, не включенными в состав вакцины, остаются пока без ответа. Главный вопрос — насколько ВПЧ-вакцинации снизят заболеваемость РШМ и смертность от него — получит ответ лишь по прошествии нескольких десятилетий.

Вакцинация «вдогонку» (catch-up vaccination)

Профилактические ВПЧ-вакцинации в ряде стран, включая Россию, рекомендованы мужчинам и женщинам, начавшим сексуальную жизнь. Некоторые факты, послужившие основанием для данной рекомендации, таковы. Е. Couto и соавт., обобщив результаты 13 рандомизированных клинических испытаний вакцин церварикс и гардасил, в которых были провакцинированы девочки в возрасте 16 лет и старше, а продолжительность follow-up составляла до 4 лет, установили достоверное снижение в этих группах частоты умеренных и тяжелых дисплазий шейки матки, вагины и вульвы [37]. В Канаде в когортном исследовании, охватившем около 2 тыс. женщин в возрасте от 17 до 29 лет, которым вводилась вакцина гардасил, вакцинации оказались эффективными в отношении типов ВПЧ, включенных в вакцину, для женщин, возраст которых не превысил 23 лет [38]. Важно отметить, что в последнем случае в обследованной группе вагинальные ВПЧ были обнаружены примерно у 40 % сексуально активных женщин, а более чем у половины из них имела место инфекция ВПЧ одновременно нескольких типов.

Вакцинация инфицированных вирусом иммунодефицита человека

Лица, зараженные вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), образуют группу повышенного риска, так как они чаще других бывают инфицированы онкогенными ВПЧ; установлены синергидные взаимодействия между ВПЧ- и ВИЧ-инфекциями. Предполагается высокая вероятность пользы ВПЧ-вакцинации ВИЧ-инфицированных в плане контроля за обеими этими инфекциями в популяции [39]. Имеются ограниченные данные, свидетельствующие о безопасности и иммуногенности бивалентной и тетравалентной ВПЧ-вакцин при 3-кратном введении их ВИЧ-инфицированным детям, женщинам и мужчинам [28]. ВОЗ рекомендует ВИЧ-инфицированным независимо от того, получают ли они антиретровирусную терапию, профилактические ВПЧ-прививки. Тестирование на ВИЧ не является необходимым условием для ВПЧ-вакцинации [35].

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

1. Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 1. Общие представления о папилломавирусах. Формы рака, ассоциированные с вирусами папилломы человека. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(1):6–12. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-1-6-12. [Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 1. General notions of papillomaviruses. Human papillomaviruses—associated cancers. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(1):6–12. (In Russ.)].
2. Злокачественные новообразования в России в 2015 г. (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2017. [Malignant malformations in Russia in 2015 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, G.V. Petrova. Moscow, 2017. (In Russ.)].
3. Ульрих Е.А., Урманчеева А.Ф., Гуркин Ю.А. и др. Первичная профилактика рака шейки матки. Эффективность, безопасность, экономическая приемлемость вакцинации. Обзор. Онкогинекология 2018;28(4):61–71. [Ulrikh E.A., Urmanceeva A.F., Gurkin Yu.A. et al. Primary prevention of cervical cancer. Effectiveness, safety, economic feasibility of vaccination. Oncoginekologiya = Gynecologic Oncology 2018;28(4):61–71. (In Russ.)].
4. Samoilova E.V., Shaikhaev G.O., Petrov S.V. et al. HPV infection in cervical-cancer cases in Russia. Int J Cancer 1995;61(3):337–41. DOI: 10.1002/ijc.2910610311.
5. 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 Journal of Biotherapy 2019;18(1):37–41. (In Russ.)].
6. 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.
7. Smelov V., Eklund C., Bzhalava D. et al. Expressed prostate secretions in the study of human papillomavirus epidemiology in the male. PLoS One 2013;8(6):66630. DOI: 10.1371/journal.pone.0066630.
8. Заридзе Д.Г., Максимович Д.М. Профилактика злокачественных новообразований. Успехи молекулярной онкологии 2017;4(2):8–25. DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-2-8-25. [Zaridze D.G., Maksimovich D.M. Prevention of malignant malformations. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2017;4(2):8–25. (In Russ.)].
9. Аксель Е.М., Виноградова Н.Н. Статистика злокачественных новообразований женских репродуктивных органов. Онкогинекология 2018;27(3):64–78. [Aksel E.M., Vinogradova N.N. Malignant malformations statistics of female reproductive organs. Oncoginekologiya = Gynecologic Oncology 2018;27(3):64–78. (In Russ.)].
10. Rintala M.A., Grénman S.E., Järvenkylä M.E. et al. High-risk types of human papillomavirus (HPV) DNA in oral and genital mucosa of infants during their first 3 years of life: experience from the Finnish HPV Family Study. Clin Infect Dis 2005;41(12):1728–33. DOI: 10.1086/498114.
11. Koskimaa H.M., Waterboer T., Pawlita M. et al. Human papillomavirus genotypes present in the oral mucosa of newborns and their concordance with maternal cervical human papillomavirus genotypes. J Pediatr 2012;160(5):837–43. DOI: 10.1016/j.jpeds.2011.10.027.
12. Merckx M., Liesbeth W.V., Arbyn M. et al. Transmission of carcinogenic human papillomavirus types from mother to child: a meta-analysis of published studies. Eur J Cancer Prev 2013;22(3):277–85. DOI: 10.1097/CEJ.0b013e3283592c46.
13. Trotter H., Mayrand M.H., Coutlee F. et al. Human papillomavirus (HPV) perinatal transmission and risk of HPV persistence among children: design, methods and preliminary results of the HERITAGE study. Papillomavirus Res 2016;2:145–52. DOI: 10.1016/j.pvr.2016.07.001.
14. Sarkola M.E., Grenman S.E., Rintala M.A. et al. Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. Acta Obstet Gynecol Scand 2008;87(11):1181–8. DOI: 10.1080/00016340802468308.
15. Tuominen H., Rautava S., Collado M.C. et al. HPV infection and bacterial microbiota in breast milk and infant oral mucosa. PLoS One 2018;13(11):0207016. DOI: 10.1371/journal.pone.0207016.
16. Koskimaa H.M., Paaso A., Welters M.J.P. et al. The presence of human papillomavirus (HPV) in placenta and/or cord blood might result in Th2 polarization. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2017;36(8):1491–503. DOI: 10.1007/s10096-017-2958-z.
17. Tuominen H., Rautava S., Syrjänen S. et al. HPV infection and bacterial microbiota in the placenta, uterine cervix and oral mucosa. Sci Rep 2018;8(1):9787. DOI: 10.1038/s41598-018-27980-3.
18. Lee B., Lee S.W., Kim D.I., Kim J.H. HPV prevalence in the foreskins of asymptomatic healthy infants and children: Systematic review and meta-analysis. Sci Rep 2017;7(1):7050. DOI: 10.1038/s41598-017-07506-z.
19. Wilson R., Laimins L.A. Differentiation of HPV-containing cells using organotypic “raft” culture or methylcellulose. Methods Mol Med 2005;119:157–69. DOI: 10.1385/1-59259-982-6:157.
20. Regan J.L., Laimins L.A. Viral transformation of epithelial cells. Methods Mol Biol 2013;945:449–65. DOI: 10.1007/978-1-62703-125-7_26.
21. Dadar M., Chakraborty S., Dhama K. et al. Advances in designing and developing vaccines, drugs and therapeutic approaches to counter human papilloma virus. Front Immunol 2018;2478(9):32. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02478.
22. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. 100 Part B: Biological agents. Lyon, 2011.
23. Dillner J., Arbyn M., Unger E., Dillner L. Monitoring of human papillomavirus vaccination. Clin Exp Immunol 2011;163(1):17–25. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2010.04268.x
24. Pagliusi S.R., Teresa Aguado M. Efficacy and other milestones for human papillomavirus vaccine introduction. Vaccine 2004;23(5):569–78. DOI: 10.1016/j.vaccine.2004.07.046.
25. Lowy D.R., Frazer I.H. Chapter 16: Prophylactic human papillomavirus vaccines. J Natl Cancer Inst Monogr 2003;31:111–6. DOI: 10.1093/oxford-journals.jncimonographs.a003472.
26. Joura E.A., Giuliano A.R., Iversen O.E. et al. Broad Spectrum HPV Vaccine Study. A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. N Engl J Med 2015;372(8):711–23. DOI: 10.1056/NEJMoa1405044.
27. Garland S.M., Pitisuttithum P., Ngan H.Y.S. et al. Efficacy,

- immunogenicity, and safety of a 9-valent human papillomavirus vaccine: subgroup analysis of participants from Asian countries. *J Inf Dis* 2018;218(1):95–108. DOI: 10.1093/infdis/jiy133.
28. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, may 2017. WHO, weekly epidemiological record 2017;92(19):241–68.
 29. Daley E.M., Vámos C.A., Thompson E.L. et al. The feminization of HPV: how science, politics, economics and gender norms shaped U.S. HPV vaccine implementation. *Papillomavirus Res* 2017;3:142–48. DOI: 10.1016/j.pvr.2017.04.004.
 30. Волгарева Г.М. Естественная циркуляция вирусов папилломы человека у мужчин: что о ней известно? Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):28–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-28-33. [Volgareva G.M. Natural history of papillomaviruses in men – what is known? *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):28–33. (In Russ.)].
 31. Zur Hausen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)* 2008;73(5):498–503. DOI: 10.1134/S0006297908050027.
 32. Zur Hausen H., Mammas I.N., Spandidos D.A. HPV vaccination in boys: determining the clinical relevance of this strategy. *Exp Ther Med* 2017;14(4):3327–8. DOI: 10.3892/etm.2017.5005.
 33. Giuliano A.R., Palefsky J.M., Goldstone S. et al. Efficacy of quadrivalent HPV vaccine against HPV infection and disease in males. *N Engl J Med* 2011;364(5):401–11. DOI: 10.1056/NEJMoa0909537.
 34. Pinto L.A., Kemp T.J., Torres B.N. et al. Quadrivalent human papillomavirus (HPV) vaccine induces HPV-specific antibodies in the oral cavity: results from the mid-adult male vaccine Trial. *J Infect Dis* 2016;214(8):1276–83. DOI: 10.1093/infdis/jiw359.
 35. WHO position paper on vaccines against human papillomavirus(HPV). Summary of key points. WHO, Geneva, 2017.
 36. Drolet M., Benard E., Boily M.C. et al. Population-level impact and herd effects following human papillomavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2015;5(5):565–80. DOI: 10.1016/S1473-3099(14)71073-4.
 37. Couto E., Saeterdal I., Juvet L.K., Klemp M. HPV catch-up vaccination of young women: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2014;14:867. DOI: 10.1186/1471-2458-14-867.
 38. Goggin P., Sauvageau C., Gilca V. et al. Low prevalence of vaccine-type HPV infections in young women following the implementation of a school-based and catch-up vaccination in Quebec, Canada. *Hum Vaccin Immunother* 2018;14(1):118–23. DOI: 10.1080/21645515.2017.1385688.
 39. Looker K.J., Rönn M.M., Brock P.M. et al. Evidence of synergistic relationships between HIV and human papillomavirus (HPV): systematic reviews and meta-analyses of longitudinal studies of HPV acquisition and clearance by HIV status, and of HIV acquisition by HPV status. *J Int AIDS Society* 2018;21(6):25110. DOI: 10.1002/jia2.25110.

ORCID автора / ORCID of author

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: 03.03.2020.

Article submitted: 03.04.2019. Accepted for publication: 03.03.2020.

СОЗДАНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ЗОНДОВ МЕТОДОМ МОДИФИКАЦИИ ОЛИГОСАХАРИДОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ФЛЮОРЕСЦЕИН-5-ТИОСЕМИКАРБАЗИДОМ

А.С. Гриневич, И.В. Чинарева, О.С. Бурова, П.К. Иванов

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

Контакты: Анатолий Станиславович Гриневич agrinevich@mail.ru

Введение. Моноклональные антитела (МКАТ) — надежный инструмент диагностики различных заболеваний человека. В этом качестве их используют в виде конъюгатов с флуоресцентными и иными метками. Классический подход создания таких конъюгатов сводится к химическим реакциям, использующим белковую основу МКАТ. Вместе с тем для целого ряда МКАТ синтез конъюгата сопровождается встраиванием метки в антигенсвязывающий участок, что приводит к уменьшению или полной потере специфической активности конъюгата. Для выхода из данной ситуации предлагается синтез флуоресцентных конъюгатов методами углеводной химии через пространственно удаленные от активного центра олигосахариды антител.

Цель исследования — получение активных и стабильных при хранении конъюгатов антител серии ICO на основе реакции ковалентного включения флуоресцентной метки в олигосахаридную последовательность МКАТ.

Материалы и методы. В исследовании были использованы МКАТ серии ICO высокой степени очистки. Олигосахариды МКАТ окисляли до альдегидных групп, подвергали взаимодействию с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом с последующим восстановлением гидразонового производного боргидридами. Полученный ковалентный конъюгат исследовали в прямой реакции иммунофлуоресценции.

Результаты. Отработаны тонкие детали синтеза флуоресцентного конъюгата МКАТ с использованием олигосахаридов последнего. Модифицированные МКАТ сохраняли специфическое связывание с клетками-мишенями, присущее нативным антителам. Полученные конъюгаты сохраняли свою активность на протяжении длительного времени в процессе хранения.

Заключение. Разработан альтернативный метод для конъюгирования флуоресцентных меток с МКАТ, позволяющий получать конъюгаты высокой активности.

Ключевые слова: моноклональные антитела, флуоресцентные конъюгаты, олигосахарид IgG, проточная цитометрия

Для цитирования: Гриневич А.С., Чинарева И.В., Бурова О.С., Иванов П.К. Создание флуоресцентных зондов методом модификации олигосахаридов моноклональных антител флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):39–46.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-39-46



FLUORESCENT MODIFICATION OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES OLIGOSACCHARIDES BY FLUORESCIEIN-5-THIOSEMICARBAZIDE

A.S. Grinevich, I.V. Chinareva, O.S. Burova, P.K. Ivanov

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. Monoclonal antibodies (Mabs) are a good tool for diagnosing human pathologies. They are used as conjugates with fluorescent and other dyes. The classical approach of creating such conjugates is reduced to chemical reactions using the protein base of the Mab. At the same time, for a number of Mabs, conjugate production is accompanied by embedding the label into the antigen binding site, which leads to a decrease or complete loss of the specific activity of the conjugate. To get out of this situation, the synthesis of fluorescent conjugates by methods of carbohydrate chemistry through spatially distant from the active center oligosaccharides of antibodies is proposed.

Objective. To obtain high activity ICO series Mab conjugates based on the reaction of covalent inclusion of the fluorescent label in the oligosaccharide sequence of the Mab.

Materials and methods. We used Mab series ICO of high purity. Oligosaccharides Mabs oxidized to aldehyde groups, were subjected to interaction with fluorescein-5-thiosemicarbazide, followed by the reduction of hydrazone derivative borhydrides. The resulting covalent conjugate was investigated in a flow cytometry.

Results. The synthesis of a fluorescent conjugate using monoclonal antibodies oligosaccharides was worked out. Modified monoclonal antibodies retain specific binding to target cells inherent in the native antibody. The resulting conjugates remained active for a long time during storage.

Conclusion. An alternative method for conjugation of immunofluorescent, allowing to obtain conjugates of high activity, has been developed.

Key words: monoclonal antibodies, fluorescent conjugates, IgG oligosaccharide, flow cytometry

For citation: Grinevich A.S., Chinareva I.V., Burova O.S., Ivanov P.K. Fluorescent modification of the monoclonal antibodies oligosaccharides by fluorescein-5-thiosemicarbazide. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2020; 19(2):39–46. (In Russ.).

Введение

Проточная цитометрия с использованием флуоресцентных конъюгатов моноклональных антител (МКАТ) широко применяется для диагностики патологических состояний у пациентов с иммунологическими, гематологическими и онкологическими заболеваниями. Указанные конъюгаты часто именуют флуоресцентными зондами (ФЗ). Набор используемых МКАТ и качество ФЗ на их основе определяют успех медицинских мероприятий. Общепринятый на сегодня подход к модификации МКАТ для их применения в иммунометрическом анализе сводится к химическим реакциям, затрагивающим белковую часть молекулы. Из данных литературы и личного опыта известно, что в ряде случаев такая модификация антител приводит к потере их антигенсвязывающих свойств, что, по-видимому, обусловлено включением флуоресцентной метки в область антигенсвязывающего центра [1, 2]. Иммуноглобулины по химической природе являются гликопротеинами, гликозилирование которых связано преимущественно с CH2-доменом (аспарагин 297), пространственно удаленным от антигенсвязывающего центра (рис. 1) и ассоциированного с биологическими свойствами антител и иммунных комплексов [3–5].

Использование олигосахаридных цепей МКАТ представляется перспективным при создании высокоэффективных ФЗ с ненарушенной антигенсвязывающей активностью. Характерно, что олигосахариды химически достаточно инертны, но легко переводятся в реакционные формы альдегидов ферментативным или химическим окислением. Дальнейшая модификация полученных альдегидов в ФЗ во многом определяется доступными флуорохромами, способными напрямую взаимодействовать с альдегидной группой. Ранее мы сообщали о принципиальной схеме мечения МКАТ через олигосахаридные цепи. При этом на I-м этапе альдегиды олигосахаридов МКАТ биотинилировали с помощью гидразинактивированного производного биотина (Biotin-LC-Hydrazide). На следующем этапе был сформирован комплекс биотинилированных таким образом МКАТ со стрептавидин-флуоресцеином [6]. Полученный флуоресцентный комплекс проявлял все основные характеристики, необходимые для ФЗ, но обладал очевидным недостатком, поскольку основывался на нековалентной связи между МКАТ и флуоресцеином, что приво-

дило к нестабильности полученных конъюгатов при хранении. В последнее время на рынке биохимических реактивов стали доступны производные флуорохромов, способные к прямому взаимодействию с альдегидными группами, что позволило предложить новую схему синтеза: на I этапе гексозы в составе

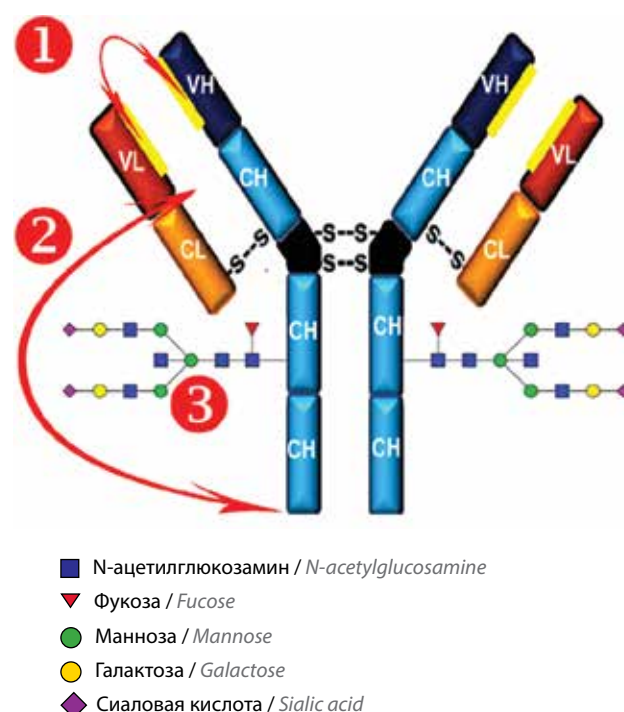


Рис. 1. Схема строения IgG. Гипервариабельная зона в области VH- и VL-доменов формирует специфический центр связывания антигена. Константные домены тяжелых цепей (CH) ответственны за биологические эффекты антител и иммунных комплексов с их участием: связывание с комплементом, Fc-рецепторами, проникновение через плаценту, скорость деградации, взаимодействие с белками A и G стрептококка и др. Олигосахаридные последовательности на основе гексоз находятся в CH2-домене, пространственно не перекрывающаяся с антигенсвязывающим центром. 1 – антигенсвязывающий центр; 2 – область IgG, ответственная за реализацию биологических свойств; 3 – олигосахаридные остатки

Fig. 1. The IgG structure. Hypervariable area in the region VL and VH domain forms a specific binding site of the antigen. The constant domains of the heavy chain (CH) responsible for the biological effects of antibodies and immune complexes with their participation: the binding of complement, Fc-receptors, penetration through the placenta, the rate of degradation, interaction with proteins A and G Streptococcus, etc. Oligosaccharide on the basis of the hexoses is in CH2 domain, spatially not overlapping with the antigen-binding site. 1 – the antigen-binding site; 2 – region of IgG responsible for implementation of the biological properties; 3 – oligosaccharide residues

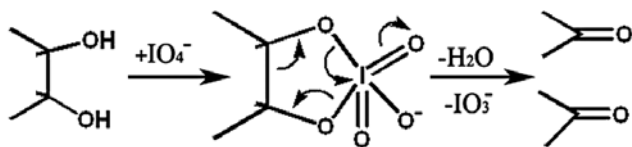


Рис. 2. Схема модификации спиртовых групп гексозного кольца до альдегидов с помощью солей иодной кислоты (периодатное окисление)

Fig. 2. Modification of the alcohol groups hexose's rings to aldehydes with the iodic acid salt (periodate oxidation)

олигосахаридов МКАТ окисляются до альдегидных групп с помощью периодатного окисления (рис. 2).

Далее образовавшиеся альдегидные группы вступают во взаимодействие с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом (5-ФТ) с образованием гидразоновых связей (рис. 3).

Двойную связь между углеродом и азотом в гидразоне ($R-C=N-NH-$) восстанавливают с помощью борогидридов.

Цель исследования — получение активных и стабильных при хранении конъюгатов антител серии ICO на основе реакции ковалентного включения флуоресцентной метки в олигосахаридную последовательность МКАТ.

Материалы и методы

Получение и фракционирование МКАТ. В работе использован клон ICO-180 (анти-CD20). Источником МКАТ служили асцитные жидкости мышей линии BALB/с. Фракционирование МКАТ проводили с использованием аффинной хроматографии на белке А [7]. Чистоту полученных МКАТ анализировали при помощи электрофореза (SDS-ПААГ) по Лэммли [8].

Периодатное окисление углеводов МКАТ. МКАТ переводили в 0,1 М фосфатно-солевой буфер, pH 7,2–7,4

(PBS) и концентрировали до 5–10 мг/мл. Здесь и в последующем для смены буфера и удаления низкомолекулярных реагентов и промежуточных продуктов синтеза использовали обессоливающие колонки PD-10 (Biosciences, Inc., Amersham, Англия), для концентрирования образцов — центрифужный фильтр Centricon 30 (Millipore, США). Готовили свежий 100 мМ раствор натрия периодата ($NaIO_4$ — Sigma) на деионизированной воде. К образцам МКАТ добавляли $NaIO_4$ до конечной концентрации 2–20 мМ и выдерживали в темноте при температуре 25 °С и постоянном перемешивании в течение 30 мин. К реакционной смеси добавляли 100 мкл этиленгликоля и продолжали инкубировать еще 15 мин. По завершении реакции МКАТ отделяли от непрореагировавших продуктов, концентрацию МКАТ доводили до 1,5–4,0 мг/мл.

Взаимодействие окисленных олигосахаридов МКАТ с 5-ФТ (Thermo Fisher Scientific, F121). За основу взят синтез, используемый для мечения гликопротеинов [9]. Маточный раствор 5-ФТ готовили на безводном диметилсульфоксиде в концентрации 4 мг/мл. Раствор хранили не более 30 дней при –20 °С. Сразу после окисления МКАТ к ним добавляли 5-ФТ в конечной концентрации 1 мг/мл и инкубировали в темноте при 25 °С и постоянном перемешивании в течение 0,5–24 ч. Образовавшиеся на этом этапе гидразоновые связи между окисленными гексозами олигосахаридов МКАТ и 5-ФТ восстанавливали инкубацией с борогидридом натрия ($NaBH_4$) или с цианоборогидридом ($NaBH_3CN$), концентрация последних в реакционной смеси составляла 5 мг/мл, инкубацию проводили при 4 °С в течение 1,5 ч. После завершения инкубации МКАТ отделяли от продуктов синтеза. Хранили полученные конъюгаты в их концентрации по белку >1 мг/мл при наличии 0,1 % азида натрия в защищенном от света контейнере при 4 °С.

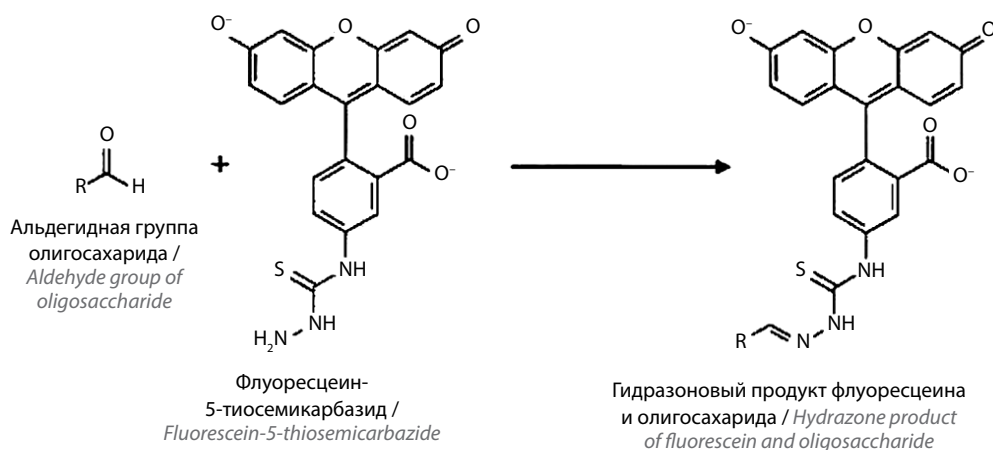


Рис. 3. Схема взаимодействия флуоресцеин-5-тиосемикарбазида с окисленным олигосахаридом моноклональных антител с образованием гидразоновой связи

Fig. 3. Fluorescein-5-thiosemicarbazide reacts with aldehydes groups of the monoclonal antibodies oligosaccharides to produce hydrazone linkage

Степень включения флуоресцеина в МКАТ определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение конъюгатов при 2 длинах волн — 280 и 495 нм. Расчеты проводили по формулам:

$$\frac{A_{280} - (0,35 \times A_{495})}{1,4} = \text{IgG (1)},$$

$$\frac{2,87 \times A_{495}}{A_{280} - (0,35 \times A_{495})} = \text{ФЛ/IgG (2)},$$

где A_{280} — оптическая плотность раствора при 280 нм; A_{495} — оптическая плотность раствора при 495 нм; IgG — концентрация МКАТ, мг/мл; ФЛ/IgG — молярное отношение флуоресцеина в МКАТ.

Определение устойчивости флуоресцентных конъюгатов к хранению. Для определения того, насколько устойчивым является комплекс МКАТ с флуоресцеином при длительном хранении, использовали следующий подход. Полученные конъюгаты через определенные интервалы времени концентрировали на центрифужных фильтрах Centricon 30 и повторно пропускали через обессоливающие колонки PD-10. Прошедший через колонку материал повторно анализировали спектрофотометрически (см. предыдущий пункт). При этом предполагалось, что, если в процессе хранения связь флуоресцеина с IgG разрушится, свободный флуоресцеин задержится на колонке PD-10. Об устойчивости комплекса свидетельствовала величина отношения ФЛ/IgG (формула 2).

Прямая реакция иммунофлуоресценции и точная цитометрия описаны ранее [10].

Результаты

Для создания работоспособной методологии измерения МКАТ с помощью 5-ФТ необходимо было исследовать ряд параметров данного синтеза. Основная идея экспериментов сводилась к получению ФЗ с максимально большим соотношением флуоресцеина к белковой части IgG без потери специфической активности, а также к сохранению работоспособности полученных зондов в результате хранения.

1. Влияние концентрации NaIO_4 на степень включения 5-ФТ в МКАТ

Для решения этой задачи равные аликвоты ICO-180 смешивали с различными объемами маточного раствора NaIO_4 . Конечная концентрация окислителя варьировала в диапазоне от 2 до 20 мМ. Далее все образцы МКАТ инкубировали с окислителем, как описано ранее, отделяли от непрореагировавших продуктов и проводили взаимодействие с 5-ФТ в течение 2,5 ч. После восстановления гидразоновых связей МКАТ отделяли от продуктов синтеза и определяли степень

включения флуоресцеина в МКАТ. Результаты 2 независимых опытов представлены на рис. 4.

Как видно, степень включения 5-ФТ в ФЗ закономерно возрастала с увеличением концентрации окислителя. Дальнейшего повышения концентрации NaIO_4 в реакционной смеси мы не проводили, поскольку из данных литературы известно, что при концентрациях $\text{NaIO}_4 > 50$ мМ наблюдается уменьшение степени окисления IgG, обусловленное в том числе и деструкцией белковой части антител [11]. Таким образом, даже при минимально исследованной концентрации окислителя степень включения метки в ФЗ превышает 1 моль на моль МКАТ.

2. Влияние времени инкубации с 5-ФТ на степень включения метки в МКАТ

Для нахождения оптимального режима взаимодействия МКАТ с 5-ФТ равные аликвоты ICO-180, окисленные NaIO_4 в концентрации 20 мМ, инкубировали с 5-ФТ в течение 0,5–20 ч. Данные 2 опытов приведены на рис. 5.

Как видно из приведенного графика, плотность включения флуоресцеина в МКАТ прямо пропорциональна времени инкубации. При этом максимальное нарастание включения метки проходило в пределах первых 2–3 ч. Далее этот показатель выходил на плато, достигая значения 2,3–2,7 моля флуоресцеина на моль IgG.

3. Сохранность флуоресцентных конъюгатов МКАТ при хранении

Через определенные интервалы времени в течение 7 мес от момента синтеза конъюгатов ICO-180 с 5-ФТ определяли молярное соотношение включенного в МКАТ флуоресцеина. В качестве материала для исследования использовали конъюгаты, полученные при исследовании времени инкубации с 5-ФТ и, как показано ранее, имеющие различную степень включения флуоресцеина. Данные приведены на рис. 6.

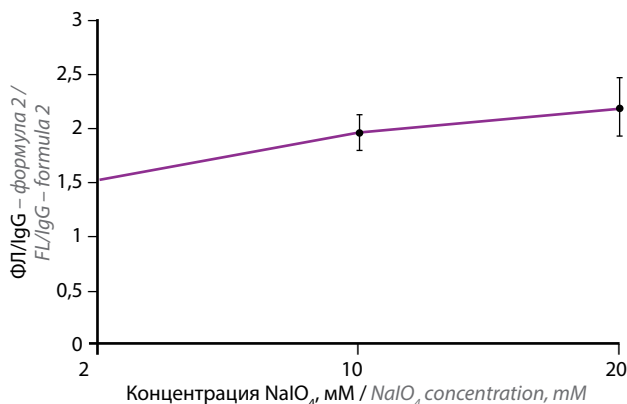


Рис. 4. Плотность включения флуоресцеин-5-тиосемикарбазида в ICO-180 в зависимости от концентрации NaIO_4 на стадии окисления
Fig. 4. The inclusion of fluorescein-5-thiosemicarbazide in ICO-180, depending on the NaIO_4 concentration

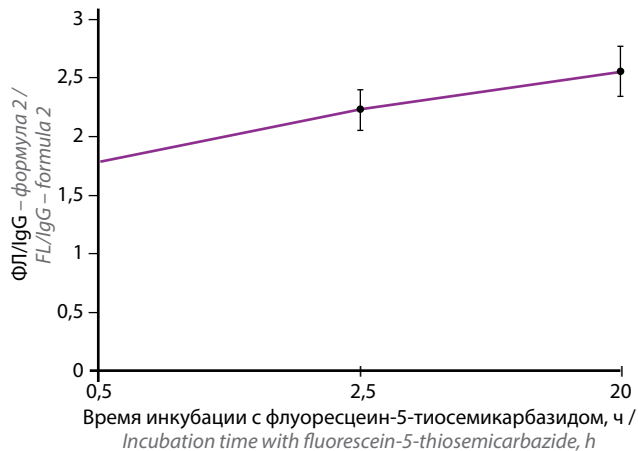


Рис. 5. Плотность включения флуоресцеина в моноклональные антитела ICO-180 в зависимости от времени инкубации с флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом

Fig. 5. The fluorescein inclusion in monoclonal antibodies ICO-180 depending on incubation time with fluorescein-5-thiosemicarbazide

Как видно из графика, при хранении конъюгатов наблюдалось падение молярного отношения флуоресцеина к белковой части IgG. Однако при периоде наблюдения больше полугода расщепление конъюгатов было незначительным. Так, если в течение 1-го месяца отношение ФЛ/IgG (формула 2) уменьшилось для всех конъюгатов в среднем на 10 %, последующее изменение этого показателя за 6 мес не превысило 6 %. Среднее падение включения флуоресцеина в конъюгаты за 7 мес наблюдения составило не более 15 %, что было меньше, чем разница в плотности мечения МКАТ за счет разного времени инкубации с 5-ФТ («нулевые точки» на рис. 6). Иными словами, формальное падение плотности флуоресцеина в зондах при их хранении оказалось меньше, чем разница в плотности мечения МКАТ в исследованных диапазонах варьирования параметров реакции.

4. Влияние восстановителя на свойства конъюгатов МКАТ с 5-ФТ

На стадии восстановления гидразинового производного ICO-180 и 5-ФТ мы применяли 2 реактива: боргидрид натрия (NaBH_4) и цианоборгидрид (NaBH_3CN). Для этого окисленные 20 мМ NaIO_4 ICO-180 инкубировали 2,5 ч с 5-ФТ и далее обрабатывали NaBH_4 или NaBH_3CN , как описано в части «Материалы и методы». Полученные таким образом конъюгаты имели похожие свойства с плотностью включения флуоресцеина 1,5–1,65 (формула 2). Последующее хранение конъюгатов с повторным определением отношения ФЛ/IgG через 3 нед показало для обоих конъюгатов похожее и, как следует из раздела «Результаты», ожидаемое падение данного показателя на 8–10 %. Таким образом, данный эксперимент позволяет заключить, что боргидрид и цианоборгидрид Na одинаково пригодны для восстановления

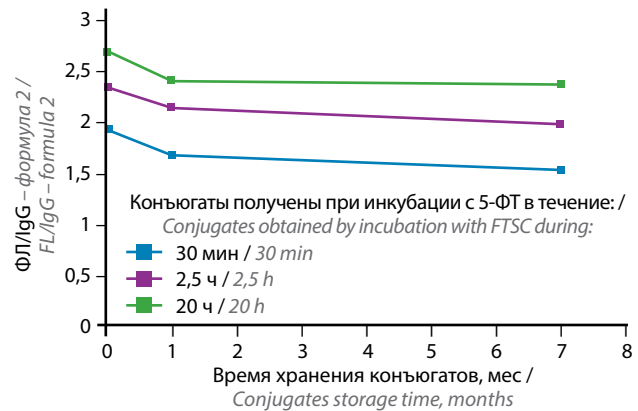


Рис. 6. Изменение включения флуоресцеина в конъюгаты с моноклональными антителами ICO-180 в зависимости от времени их хранения. 5-ФТ – флуоресцеин-5-тиосемикарбазид

Fig. 6. The inclusion changing of fluorescein in monoclonal antibodies ICO-180 conjugates depending on their storage time. FTSC – fluorescein-5-thiosemicarbazide

гидразинового производного ФЗ. Однако реакция с боргидридом Na проходила более интенсивно, с образованием газообразного водорода, что затрудняло колоночные методы хроматографии для отделения непрореагировавших продуктов синтеза. Поэтому в качестве основного реагента на этом этапе синтеза нами выбран NaBH_3CN .

Флуоресцентные свойства конъюгатов ICO-180 с 5-ФТ и зависимость выявления клеток-мишеней от плотности флуоресцеина в IgG

Конъюгаты ICO-180, полученные при различных способах окисления (см. выше раздел 1), при разном времени конъюгирования с 5-ФР (см. выше раздел 2), также в результате длительного хранения (см. выше раздел 3) проверялись в прямой реакции иммунофлуоресценции на выявление CD20-положительных ($\text{CD}20^+$) клеток-мишеней. Результаты представлены в таблице и на рис. 7.

Как видно из представленных данных, все исследованные конъюгаты ICO-180, полученные в рамках данного исследования, выявляли клетки $\text{CD}20^+$ в крови здоровых доноров практически так же, как ICO-80, меченные флуоресцеина изотиоцианатом по белковой части IgG. Из данных литературы известно, что содержание $\text{CD}20^+$ -В-клеток в крови здоровых доноров находится в пределах 6–23 % [12]. Такого порядка величины содержания клеток $\text{CD}20^+$ наблюдались и в наших экспериментах. Отличия в выявлении клеток-мишеней исследуемыми конъюгатами и методом контроля составляли не более 7–12 % относительной величины измерения (см. таблицу), что укладывается в границы погрешности, принятые для биологического эксперимента. Работоспособностью обладали все конъюгаты независимо от способов их получения и хранения. При этом следует особо отметить, что

Специфическое связывание конъюгатов ICO-180, меченных флуоресцеином в различных условиях, с лимфоцитами человека в прямой реакции иммунофлуоресценции

Specific binding of ICO-180 conjugates labeled with fluorescein under various conditions to human lymphocytes by immunofluorescence reaction

Тип конъюгата Conjugate type	% CD20 ⁺ -лимфоцитов в прямой РИФ с конъюгатами ICO-180, меченными флуоресцеином % CD20 ⁺ -lymphocytes in direct IR with fluorescein-labeled ICO-180 conjugates						
	Характеристики конъюгатов, меченных 5-ФТ Characteristics of FTSC conjugates						
	Без хранения No storing				45 дней хранения Stored for 45 days		
	Концентрация NaIO ₄ при окислении, мМ NaIO ₄ concentration at oxidation, mM						
	2	20	2	20	2	10	20
	Длительность реакции с 5-ФТ, ч Time of reaction with FTSC, h						
	2,5		20		2,5		
	Молярное отношение ФЛ/IgG (формула 2) FL/IgG molar ratio (formula 2)						
	1,93	2,35	2,1	2,7	1,63	2,05	2,39
	Контрольный конъюгат ICO-180, меченный ФИТЦ FITC ICO-180 control conjugate	14,0		16,0		9,7	
Конъюгаты ICO-180, меченные 5-ФТ FTSC ICO-180 conjugates	15,5	13,8	15,2	16,5	8,5	11,1	9,0

Примечание. РИФ — реакция иммунофлуоресценции; 5-ФТ — флуоресцеин-5-тиосемикарбазид; ФЛ/IgG — молярное отношение флуоресцеина в моноклональных антителах; ФИТЦ — флуоресцеина изотиоцианат.

Note. IR — immunofluorescence reaction; FTSC — fluorescein-5-thiosemicarbazide; FL/IgG — fluorescein molar ratio in monoclonal antibodies; FITC — fluorescein isothiocyanate.

молярное отношение ФЛ/IgG для всех исследованных конъюгатов было выше 1,6. В данном исследовании мы не ставили задачу найти минимальное значение ФЛ/IgG, при котором конъюгаты теряют свойства ФЗ, но значение 1,5–1,7, по-видимому, достаточно для использования полученных конъюгатов в качестве работоспособных зондов.

Заключение

В результате проведенной работы нами были получены работоспособные ФЗ анти-CD20 МКАТ кло-на ICO-180. Характеристики полученных конъюгатов проводили биохимическими (спектрофотометрия с определением плотности включения флуоресцеина в МКАТ) и иммунофлуоресцентными (реакция иммунофлуоресценции для определения связывания с клетками-мишенями) методами. Безусловно, когда речь идет о ФЗ, реакция иммунофлуоресценции является окончательным методом контроля качества полученных конъюгатов. Однако спектрофотометрия позволяет достаточно быстро провести скрининговые оценки получаемых конъюгатов. Известно, что чем выше молярное включение флуорохрома в молекулу зонда, тем выше суммарный квантовый выход полученной конструкции, однако параллельно этому уве-

личивается вероятность деструкции получаемых зондов за счет блокады антигенсвязывающего центра антител [13]. Так, для ФЗ на основе флуоресцеина изотиоцианата (синтез происходит по вторичным аминок группам лизина и аргинина) оптимальными зондами считаются те, которые имеют плотность включения флуоресцеина 2–6 на моль IgG. В нашем случае использования олигосахаридов для модификации белковая часть IgG не затрагивалась. При этом получить плотность мечения МКАТ более 3 молей флуоресцеина на моль IgG нам не удалось. В значительной степени это может быть связано со стерическими ограничениями выбранной модели, в частности с тем, что 5-ФТ имеет очень короткий спейсер (не более 4 атомов), что ограничивает его пространственную проницаемость вглубь цепочки олигосахарида, и реакции взаимодействия, вероятно, ограничиваются дистальными гексозами. Тем не менее даже в пределах этого узкого диапазона включения флуоресцеина в МКАТ были выявлены основные закономерности протекания синтеза. Во-первых, увеличение концентрации NaIO₄ на стадии окисления увеличивало степень включения флуоресцеина в зонд, при этом для оптимальных концентраций NaIO₄ нами выявлен и принят диапазон 10–20 мМ. Во-вторых, увеличение

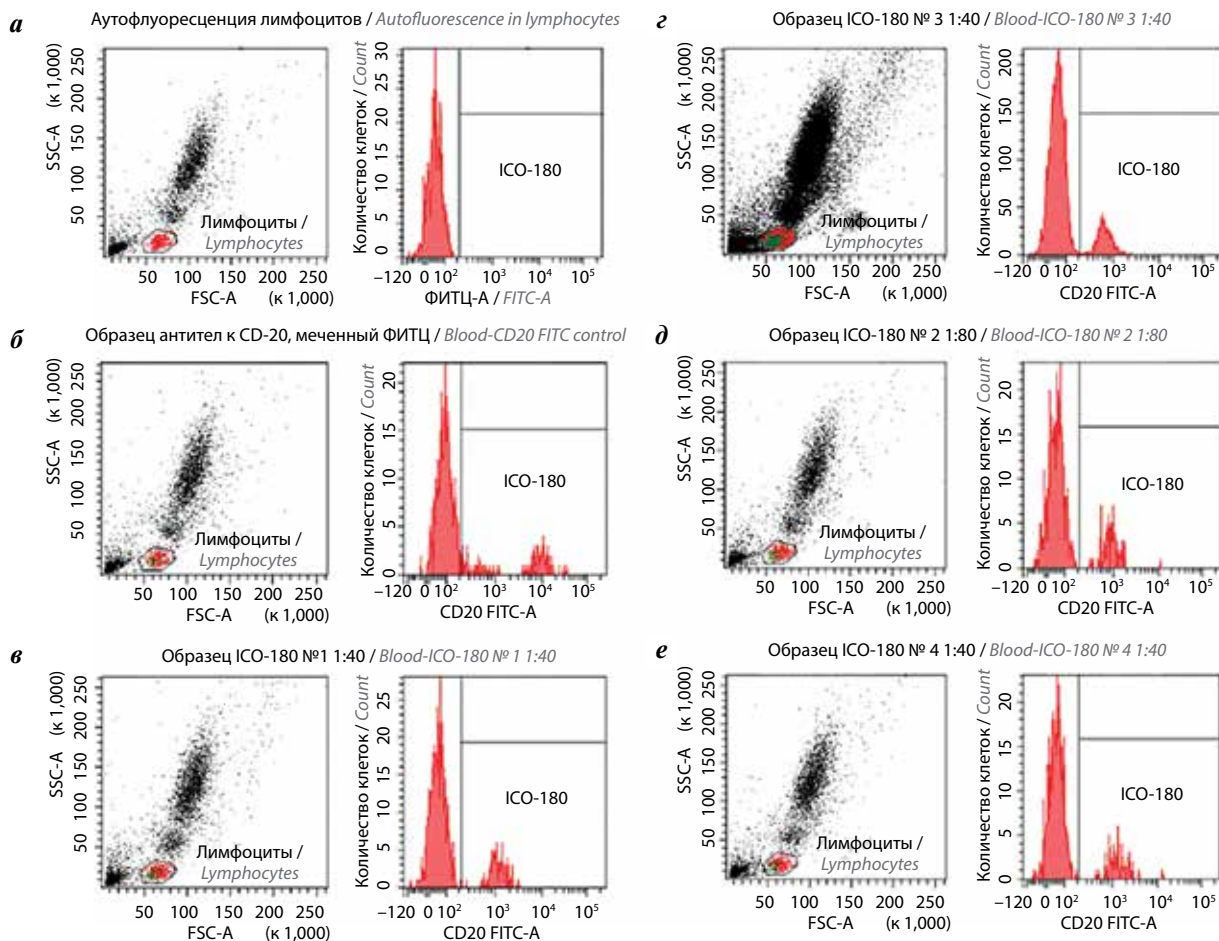


Рис. 7. Гистограммы CD20⁺-клеток. Под каждой литерой изображены две гистограммы: левая — прямое и боковое рассеивание, многогранником выделены гейты исследуемых клеток, правая — флуоресценция лимфоцитов внутри гейта: а — аутофлуоресценция лимфоцитов; б — флуоресценция с конъюгатом ICO-180, меченным флуоресцеина изотиоцианатом (ФИТЦ); в–е — конъюгатами ICO-180, меченными флуоресцеин-5-тиосемикарбазидом (5-ФТ). Условия синтеза флуоресцентных зондов, меченных 5-ФТ: в и г — 2 мМ NaIO₄, д и е — 20 мМ NaIO₄; в и д — 2,5 ч инкубации с 5-ФТ; г и е — 20 ч инкубации с 5-ФТ

Fig. 7. Histograms of CD20⁺-cells (the left histogram is fast and side scattering, the gates of the studied cells are selected, the right histogram is fluorescence of lymphocytes within the gate). а — autofluorescence in lymphocytes; б — fluorescence with a fluorescein isothiocyanate labeled (FITC) ICO-180 conjugate; в–е — ICO-180 conjugates labeled with fluorescein-5-thiosemicarbazide. The conditions of synthesis ICO-180 with 5-FIT: в and г — 2 mm NaIO₄, д and е — 20 mm NaIO₄; в and д — 2.5 hour of incubation with 5-FIT, г and е — 20 hours of incubation with 5-FIT

времени инкубации окисленных гексоз с 5-ФТ от 0,5 до 20 ч приводило к увеличению включения флуоресцеина в зонд, однако основная реакция протекала в пределах первых 2–3 ч. В-третьих, полученные конъюгаты после восстановления гидразоновой связи цианоборгидридом были достаточно стабильными, что выражалось в падении включения флуоресцеина не более чем на 15 % при их хранении в течение 7 мес и не от-

ражалось на свойствах конъюгатов как ФЗ. И наконец, показано, что для адекватной работы в качестве детекторов клеток-мишеней ФЗ должны иметь степень включения флуоресцеина >1,5 молекулы на моль IgG.

Распространение данного подхода к МКАТ других клонов позволило бы как уточнить особенности данного синтеза, так и, возможно, повысить эффективность ФЗ иных специфичностей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Grossberg L., Pressman D. Modification of arginine in the active sites of antibodies. *Biochemistry* 1968;7(1):272–9. DOI: 10.1021/bi00841a033.
- Tawfik D.S., Chap R., Eshhar Z., Green B.S. pH on–off switching of antibody-hapten binding by site-specific chemical modification of tyrosine. *Protein Eng* 1994;7(3):431–4. DOI: 10.1093/protein/7.3.431.
- Dwek R.A., Lellouch A.C., Wormald M.R. Glycobiology: “the function of sugar in the IgG molecule”. *J Anat* 1995;187(Pt 2):279–92.
- Matsumiya S., Yamaguchi Y., Saito J. et al. Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. *J Mol*

- Biol 2007;4;368(3):767–79.
DOI: 10.1016/j.jmb.2007.02.034.
5. Lund J., Takahashi N., Popplewell A. et al. Expression and characterization of truncated forms of humanized L243 IgG1. Architectural features can influence synthesis of its oligosaccharide chains and affect superoxide production triggered through human Fcγ receptor I. *Eur J Biochem* 2000;267(24):7246–57.
DOI: 10.1046/j.1432-1327.2000.01839.x.
 6. Гриневич А.С., Краева М.Н., Бурова О.С. и др. Использование олигосахаридов иммуноглобулинов для модификации моноклональных антител. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):44–8.
DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-44-48. [Grinevich A.S., Kraeva M.N., Burova O.S. et al. The use of oligosaccharides of immunoglobulin for modification of monoclonal antibodies. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(4):44–8. (In Russ.)].
 7. Ey P.L., Prowse S.J., Jenkin C.R. Isolation of pure IgG1, IgG2a, and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-sepharose. *Immunochemistry* 1978;15(7):429–36.
DOI: 10.1016/0161-5890(78)90070-6.
 8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;15;227(5259):680–5.
DOI: 10.1038/227680a0.
 9. Hermanson G.T. Fluorescent Probes. In: *Bioconjugate Techniques*. 3rd Ed. Academic Press, 2013:395–463.
DOI: 10.1016/B978-0-12-382239-0.00010-8.
 10. Голубцова Н.В., Бурова О.С., Барышников К.А. и др. Моноклональные антитела ICO-406 против антигена CD117. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):99–104. [Golubtsova N.V., Burova O.S., Baryshnikov K.A. et al. Monoclonal antibodies ICO-406 against the antigen CD117. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):99–104. (In Russ.)].
 11. Wolfe C.A., Hage D.S. Studies on the rate and control of antibody oxidation by periodate. *Anal Biochem* 1995;231(1):123–30.
DOI: 10.1006/abio.1995.1511.
 12. Al-Mawali A., Pinto A.D., Busaidi R.A., Al-Zakwani I. Lymphocyte subsets: reference ranges in an age- and gender-balanced population of Omani healthy adults. *Cytometry* 2013;83(8):739–44.
DOI: 10.1002/cyto.a.22322.
 13. Vira S., Mekhedov E., Humphrey G. et al. Fluorescent-labeled antibodies: Balancing functionality and degree of labeling. *Anal Biochem* 2010;402(2):146–50.
DOI: 10.1016/j.ab.2010.03.036.

Вклад авторов

А.С. Гриневич: получение иммунофлуоресцентных зондов, обзор публикаций по теме статьи, анализ данных, написание рукописи статьи;
И.В. Чинарева: получение и фракционирование асцитов, получение высокоочищенных моноклональных антител;
О.С. Бурова: оценка специфической активности иммунофлуоресцентных зондов методом проточной цитометрии, обзор публикаций по теме статьи;
П.К. Иванов: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

A.S. Grinevich: obtaining immunofluorescence probes, reviewing publications on the topic, data analysis, writing the manuscript;
I.V. Chinareva: obtaining and fractionation of ascites, obtaining highly purified monoclonal antibodies;
O.S. Burova: assessing specific activity of immunofluorescence probes using flow cytometry, reviewing publications on the topic;
P.K. Ivanov: developing study design.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.С. Гриневич / A.S. Grinevich: <https://orcid.org/0000-0002-4570-2124>
И.В. Чинарева / I.V. Chinareva: <https://orcid.org/0000-0002-5749-5652>
О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>
П.К. Иванов / P.K. Ivanov: <https://orcid.org/0000-0003-1403-8520>

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. Протокол исследования №55-4 от 16.04.2020 одобрен этическим комитетом Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. 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 the rules of bioethics. The study protocol №55-4 or 16.04.2020 was approved by the biomedical ethics committee of Research Institute for Experimental Diagnosis and Treatment of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 06.09.2019. Принята к публикации: 03.03.2020.

Article submitted: 06.09.2019. Accepted for publication: 03.03.2020.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КОСТНОГО МОЗГА БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

Н.Н. Тупицын¹, Т.М. Джуманазаров¹, А.Д. Палладина¹, А.К. Аллахвердиев^{2,3},
С.В. Чулкова^{1,4}, П.В. Кононец¹

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

²ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова
Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
Россия 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а

Контакты: Николай Николаевич Тупицын nntca@yahoo.com

Введение. Костный мозг — место генерации значительной части иммунокомпетентных клеток и в то же время периферический лимфоидный орган, в котором накапливаются эффекторные клетки и клетки памяти противоопухолевого иммунитета. Этот орган еще недостаточно изучен при опухолях.

Цель исследования — изучение иммунокомпетентных клеток костного мозга пациентов с немелкоклеточным раком легкого.

Материалы и методы. В исследовании участвовали 68 больных, у которых были диагностированы плоскоклеточный рак легкого ($n = 28$), аденокарцинома ($n = 38$) и другие формы рака легкого ($n = 2$). Во всех случаях, помимо стандартных методов диагностики и стадирования, исследовали костный мозг больных — морфологию (миелограмму) и субпопуляции лимфоцитов. При изучении субпопуляционного состава применяли метод многоцветной проточной цитометрии. Изучены Т-клетки и их субпопуляции, В-лимфоциты, NK-клетки, перфоринсодержащие лимфоциты, экспрессия костимуляторной молекулы CD27.

Результаты. В ходе исследования плоскоклеточный рак легкого характеризовался более высоким содержанием костномозговых зрелых Т-клеток (CD3) и CD8-лимфоцитов. Для аденокарциномы была типичной В-клеточная реакция (CD20). Эффекторные (перфоринсодержащие) популяции лимфоцитов костного мозга также имели связь с гистологическим диагнозом рака легкого: для аденокарциномы были более типичны CD4-положительные цитотоксические лимфоциты и экспрессия на эффекторах CD27. Перфоринсодержащие лимфоидные клетки костного мозга находились в реципрокных отношениях с эритрокариоцитами.

Заключение. Субпопуляционный состав клеток костного мозга имеет взаимосвязь с гистологическим вариантом рака и эритропозом у больных раком легкого.

Ключевые слова: рак легкого, костный мозг, Т-клетки, CD8, CD20, CD27, перфорин, эритрокариоциты

Для цитирования: Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М., Палладина А.Д. и др. Иммунологические показатели костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):47–54.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-47-54



IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF BONE MARROW IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

N.N. Tupitsyn¹, T.M. Dzumanazarov¹, A.D. Palladina¹, A.K. Allakhverdiev^{2,3}, S.V. Chulkova^{1,4}, P.V. Kononetz¹

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

²Moscow Clinical Scientific and Practical Center of Moscow Department of Healthcare; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia;
Russia; Build 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia

Introduction. Generation of most immunocompetent cells takes place in bone marrow. Bone marrow is a peripheral lymphoid organ where antitumor effector cells and memory cells are present.

The aim of the work is to estimate peripheral lymphoid cell subpopulations in bone marrow of lung cancer patients.

Materials and methods. Study has been done in 68 pts with lung cancer: squamous cell cancer ($n = 28$), adenocarcinoma ($n = 38$), other forms ($n = 2$). In all cases standard diagnostic and staging procedures were performed, as well as morphological (myelogram) and

immunological study of bone marrow lymphocyte subpopulations. Multicolor Flow cytometry was used for study of bone marrow lymphocyte populations. We studied T-cells and its subpopulations, B-cells, NK-cells, perforin-positive cells, and CD27-positive cells.

Results. *Squamous cell lung cancer was characterized by higher content of bone marrow mature T-cells (CD3), and CD8 lymphocytes. More typical for adenocarcinoma was mature B-cell reaction (CD20). Effector (perforin-positive) populations of lymphocytes also were related to histological type of cancer: for adenocarcinoma presence of CD4-positive cytotoxic lymphocytes and CD27-expression on effector cells. Perforin-containing lymphoid cells were in opposite correlation to erythrocytes.*

Conclusion. *Subpopulational lymphocyte content of bone marrow is related to histological variant of cancer and erythropoiesis in lung cancer patients.*

Key words: lung cancer, bone marrow, T-cells, CD8, CD20, CD27, perforin, erythrocytes

For citation: Tupitsyn N.N., Dzgumanazarov T.M., Palladina A.D. et al. Immunological parameters of bone marrow in non-small cell lung cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(2):47–54. (In Russ.).

Введение

Рак легкого — один из наиболее типичных примеров успешного применения иммунотерапии в онкологии. Достижения связаны в основном с использованием ингибиторов контрольных точек иммунного ответа — антител к CTLA-4, PD-1, PD-L1 и т.д. [1]. Использование препаратов данной группы позволило добиться больших успехов в лечении рака легкого и отчетливо показать, что влияние на иммунную систему пациента может быть не менее эффективным, чем цитотоксическое воздействие на саму опухоль. Важно отметить, что в этой бурно развивающейся области идет постоянная эволюция лечебных подходов и возникает понимание необходимости разработки не только новых ингибиторов контрольных точек, но и агонистов ряда костимуляторных молекул (например, CD27 — варлиумаб) для реализации эффективного противоопухолевого иммунного ответа [2]. В ряде исследований отмечен не только клинический эффект агониста CD27, но и синергизм действия с блокаторами PD-1 [3].

Интенсивно развиваются методы оценки иммунологических параметров при раке легкого, а также определения мишеней иммунотерапии для предсказания эффекта лечения. Достаточно хорошо изучены лимфоидные клетки крови, интратуморальные лимфоциты и собственно опухолевые клетки.

Значительно меньшее внимание уделено костному мозгу (КМ) больных раком легкого. Публикаций на этот счет практически нет. А ведь именно в КМ происходит на начальных этапах генерация NK-клеточных и В-линейных эффекторов противоопухолевого иммунитета, а в дальнейшем — накопление Т-клеточных (включая регуляторные клетки) эффекторов противоопухолевого иммунитета и клеток памяти.

Статья посвящена исследованию субпопуляций зрелых лимфоцитов КМ больных немелкоклеточным раком легкого.

Материалы и методы

Исследование проведено с участием 68 больных немелкоклеточным раком легкого: 52 (76,5 %) муж-

чин и 16 (23,5 %) женщин в возрасте от 17 до 80 лет (средний возраст пациентов 63,9 года). У 28 (41,8 %) больных был установлен плоскоклеточный рак, у 38 — аденокарцинома, в 2 случаях — другие формы рака.

Распределение больных по стадиям было следующим: IA — 8 (11,8 %), IB — 15 (22,1 %), IIA — 13 (19,1 %), IIB — 8 (11,8 %), IIIA — 14 (20,6 %), IIIB — 4 (5,9 %), IV — 6 (8,8 %). Преобладали больные со стадиями заболевания IB (22,1 %), IIA (19,1 %), IIIA (20,6 %).

В соответствии с размером первичной опухоли (pT) распределение было следующим: T1a — 4 (5,9 %), T1b — 7 (10,3 %), T2a — 31 (45,6 %), T2b — 7 (10,3 %), T3 — 12 (17,6 %), T4 — 7 (10,3 %). Преобладали больные с отсутствием метастазов в регионарных лимфатических узлах (N0) — 32 (47,1 %), N1 — 21 (30,9 %), N2 — 12 (17,6 %), N3 — 2 (2,9 %), лишь в одном случае индекс N не был установлен (Nx) — 1,5 %. Отдаленные метастазы выявлены у 6 (8,8 %) больных.

Помимо стандартного клинико-лабораторного обследования у всех пациентов был изучен КМ как морфологическим методом (миелограмма), так и иммунологически. Иммунологически были изучены основные субпопуляции Т- и В-лимфоцитов — CD3, CD4, CD8, CD19/CD20, NK-клеток (CD16⁺CD3⁻) и ряд дополнительных характеристик лимфоцитов по степени зрелости (CD27), цитотоксическому потенциалу (перфорин), экспрессии CD25.

Субпопуляции костномозговых лимфоцитов были изучены проточно-цитометрически в гейте зрелых лимфоцитов, определяемых на основании выраженной экспрессии CD45 в сочетании с низкими характеристиками SSC (боковое рассеяние света лазерного луча). Анализ цитометрических данных проводили с использованием программы FSC v. 3 на персональном компьютере.

Результаты

В целом в группе больных немелкоклеточным раком легкого средний возраст мужчин и женщин не различался: возраст мужчин — $64,5 \pm 1,1$, женщин — $63,3 \pm 2,4$ года ($p = 0,59$). Отмечена четкая связь

гистологического диагноза с полом больных ($p = 0,00$) (табл. 1).

Как видно, женщин, больных плоскоклеточным раком легкого (ПКРЛ), в анализируемой группе не было. В то же время аденокарцинома наблюдалась с примерно равной частотой у мужчин и женщин.

Среднее содержание зрелых Т-клеток ($CD3^+$) в анализируемой группе больных ($n = 42$) составило 67,1 % (31,3–82 %). У мужчин содержание зрелых Т-лимфоцитов было достоверно более высоким, чем у женщин ($69,3 \pm 2,1$ %, $n = 33$, и $58,8 \pm 2,96$ %, $n = 9$), $p = 0,01$. Достоверные различия по данному показателю ($CD3^+$ -клетки) отмечены при сопоставлении гистологических типов рака легкого: при ПКРЛ уровни $CD3^+$ -лимфоцитов в КМ больных были более высокими (в среднем 73 %, $n = 19$), чем при аденокарциноме (в среднем 63 %, $n = 22$), $p = 0,003$. Уровни $CD8^+$ -лимфоцитов также были достоверно более высокими у мужчин: $32,4 \pm 1,8$ % ($n = 32$) и $23,6 \pm 2,0$ % ($n = 9$), $p = 0,003$. Уровни $CD4^+$ -лимфоцитов не различались в зависимости от пола ($p = 0,9$).

Таблица 1. Связь гистологического диагноза с полом больных раком легкого

Table 1. The relationship of histological diagnosis with the gender of patients with lung cancer

Пол больных Patients' gender	Плоскоклеточный рак легкого, абс. (%) Squamous-cell carcinoma, abs. (%)	Аденокарцинома, абс. (%) Adenocarcinoma, abs. (%)	Абс. (%) Abs. (%)
Мужской Male	28 (56,0)	22 (44,0)	50 (100,0)
Женский Female	0 (0,0)	16 (100,0)	16 (100,0)
Всего Total	28 (42,4)	38 (57,6)	66 (100,0)

Мы оценили, насколько взаимосвязаны пол пациентов и уровни Т-клеток и $CD8^+$ -лимфоцитов при аденокарциноме легкого: были представлены и мужчины, и женщины в примерно равной пропорции. Хотя некоторое преобладание $CD3^+$ - и $CD8^+$ -клеток у мужчин и было, достоверных различий не получено (табл. 2).

Эти данные свидетельствуют о том, что уровни $CD3^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов в КМ больных раком легкого более вероятно ассоциированы с гистологическим диагнозом, нежели с полом пациентов.

Как и следовало предполагать, исходя из высокой ассоциации гистологического типа рака легкого с полом, достоверно более высокие уровни $CD8^+$ -лимфоцитов отмечены при ПКРЛ: $34,1 \pm 2,4$ % ($n = 19$) и $27,3 \pm 1,9$ % ($n = 22$), $p = 0,03$. В отношении $CD4^+$ -лимфоцитов такой взаимосвязи не отмечено ($p = 0,35$).

Таблица 2. Уровни $CD3^+$ - и $CD8^+$ -лимфоцитов у мужчин и женщин, больных аденокарциномой легкого

Table 2. Levels of $CD3^+$ - and $CD8^+$ -lymphocytes in men and women with lung adenocarcinoma

Показатель Parameter	Пол больных Patients' gender	n	Среднее Mean	Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	p
$CD3^+$	Мужской Male	13	66,62	3,39	—
	Женский Female	9	58,84	2,95	0,12
$CD8^+$	Мужской Male	13	29,89	2,69	—
	Женский Female	9	23,59	2,00	0,1

Примечание. Здесь и в табл. 3–5: n – число больных; p – уровень значимости различий.

Note. Here and in tables 3–5: n – patients' number; p – significance level.

Интересные данные получены при проведении сравнений в гейте Т-клеток: субпопуляции Т-цитотоксических лимфоцитов ($CD3^+CD8^+$) достоверно не различались в зависимости от пола больных ($p = 0,127$). Аналогично и гистологические типы рака легкого (плоскоклеточный, аденокарцинома) не различались по уровням цитотоксических $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов ($p = 0,52$). Сравнение средних значений НК-клеток ($CD16^+CD3^-$) также не выявило связи с полом ($p = 0,52$). Различий в уровнях костномозговых НК-клеток при ПКРЛ и аденокарциноме не установлено ($p = 0,57$).

Таким образом, у больных раком легкого преобладание зрелой Т-клеточной популяции лимфоцитов КМ ($CD3$) отмечено у мужчин и при ПКРЛ. Аналогично $CD8^+$ -лимфоциты преобладали в тех же группах. Вместе с тем среди зрелых Т-клеток ($CD3^+$) преобладания $CD8^+$ -лимфоцитов в указанных группах не отмечено. При анализе НК-клеток ($CD16^+CD3^-$) достоверной связи с полом и гистологическим типом рака не выявлено.

Зрелые В-клетки КМ ($CD20^+CD45^{++}$) достоверно преобладали у женщин: $25,3 \pm 4,97$ % ($n = 7$) и $15,8 \pm 1,8$ % ($n = 26$), $p = 0,032$. В-лимфоциты также достоверно преобладали при аденокарциноме легкого в сравнении с ПКРЛ: $21,7 \pm 3,1$ % ($n = 17$) и $13,7 \pm 1,4$ % ($n = 16$), $p = 0,025$. С учетом взаимосвязи диагноза и пола в анализируемой группе больных мы провели сравнительный анализ уровней В-клеток в зависимости от пола при аденокарциноме. Различий по уровням $CD20^+$ -лимфоцитов не получено: у мужчин $19,2 \pm 3,9$ % ($n = 10$), у женщин $25,3 \pm 4,97$ % ($n = 7$), $p = 0,35$. Есть все основания считать более высокие уровни зрелых костномозговых В-лимфоцитов характерными для аденокарциномы легкого.

Таким образом, пол больных раком легкого и гистологический тип опухоли в анализируемой группе были взаимосвязаны: ПКРЛ был более типичен для мужчин, а аденокарцинома с равной частотой встречалась у мужчин и женщин. Для лиц мужского пола и при диагнозе ПКРЛ отмечено доминирование CD3⁺- и CD8⁺-клеток среди лимфоцитов КМ. В пределах зрелых Т-лимфоцитов таких взаимосвязей не отмечено. В-клетки КМ доминировали у женщин и при диагнозе аденокарциномы.

Ввиду важности эффекторных Т-клеточных популяций в реализации противоопухолевого эффекта мы изучили перфоринсодержащие лимфоциты, их связь с полом больных и гистологическим диагнозом. Это исследование проведено у 38 больных.

При исследовании перфоринсодержащих лимфоцитов КМ связи с полом нами не установлено (табл. 3).

В то же время имела место связь ряда иммунологических параметров с гистологическим диагнозом рака (табл. 4).

Достоверные различия заключались в преобладании CD4-лимфоцитов, положительных в отноше-

нии перфорина, и перфорин-положительных CD27⁺-лимфоцитов при аденокарциноме в сравнении с ПКРЛ.

Существование обеих этих субпопуляций хорошо известно, они являются минорными и малоизученными. Их обнаружение в КМ больных раком легкого и достоверная связь с гистологическим типом заболевания — это новый факт, заслуживающий несомненного внимания и более подробного изучения.

В последние годы отмечается большой интерес к исследованиям гемопоэза при опухолях. Мы проанализировали перфоринсодержащие клетки во взаимосвязи с показателями гемопоэза у больных раком легкого. Случаи разбавления КМ кровью были исключены на основании суммарного содержания клеток эритроидного ростка в КМ <5 %.

Корреляционные связи морфологически выявляемых клеточных типов КМ с перфоринсодержащими лимфоцитарными субпопуляциями представлены в табл. 5.

Как видно, миелоидные и эритроидные предшественники находятся в отрицательной корреляционной связи с перфорин-положительными клетками.

Таблица 3. Средние уровни перфорин-положительных лимфоцитов у мужчин и женщин, больных раком легкого

Table 3. Average levels of perforin-positive lymphocytes in men and women with lung cancer

Популяция лимфоцитов Lymphocytes population	Пол больных Patients' gender	n	Среднее Mean	Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	p
CD8 ⁺ -перфорин ⁺ CD8 ⁺ -perforin ⁺	Мужской Male	30	10,86	1,87	—
	Женский Female	8	9,04	3,94	0,67
CD45 ⁺ -перфорин ⁺ CD45 ⁺ -perforin ⁺	Мужской Male	30	21,26	3,06	—
	Женский Female	8	18,81	3,92	0,7
CD8-перфорин ⁺ CD8-perforin ⁺	Мужской Male	30	13,25	1,76	—
	Женский Female	8	14,36	4,10	0,78
CD4 ⁺ -перфорин ⁺ CD4 ⁺ -perforin ⁺	Мужской Male	30	6,98	2,02	—
	Женский Female	8	5,16	1,11	0,65
CD4-перфорин ⁺ CD4-perforin ⁺	Мужской Male	30	19,89	2,35	—
	Женский Female	8	15,68	4,53	0,42
CD27 ⁺ перфорин ⁺ CD27 ⁺ perforin ⁺	Мужской Male	30	1,59	0,39	—
	Женский Female	8	1,15	0,50	0,59

Таблица 4. Средние уровни перфорин-положительных лимфоцитов у больных аденокарциномой и плоскоклеточным раком легкого
Table 4. Average levels of perforin-positive lymphocytes in patients with adenocarcinoma and squamous cell lung cancer

Субпопуляция лимфоцитов Lymphocytes subpopulation	Гистология Histology	n	Среднее Mean	Стандартная ошибка среднего Standard error of the mean	p
CD8 ⁺ -перфорин ⁺ CD8 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	10,04	1,75	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	10,83	2,72	0,82
CD45 ⁺ -перфорин ⁺ CD45 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	18,23	2,30	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	22,77	4,20	0,38
CD8-перфорин ⁺ CD8-perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	12,19	1,20	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	14,53	2,77	0,48
CD4 ⁺ -перфорин ⁺ CD4 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	2,19	0,46	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	10,16	2,66	0,008
CD4-перфорин ⁺ CD4-perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	20,02	2,48	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	18,18	3,22	0,67
CD27 ⁺ -перфорин ⁺ CD27 ⁺ -perforin ⁺	ПКРЛ SCLC	17	0,78	0,15	—
	Аденокарцинома Adenocarcinoma	21	2,09	0,56	0,033

Примечание. ПКРЛ — плоскоклеточный рак легкого.
Note. SCLC — squamous cell lung cancer.

Это не исключает регуляторного влияния соответствующих клеток с цитотоксическим потенциалом на ранние этапы дифференцировки эритроидных и миелоидных предшественников. Положительные корреляции имели место для перфоринсодержащих клеток со зрелыми нейтрофилами и уровнем лимфоцитов. Высокие уровни сегментоядерных нейтрофилов и лимфоцитов обычно свидетельствуют о разбавлении КМ кровью, и в связи с этим можно было бы думать о том, что перфоринсодержащие лимфоциты попадают в КМ как примесь крови. Однако, как было отмечено, случаи разбавления КМ кровью были нами исключены из данного анализа.

Интересно, что обе минорные перфоринсодержащие субпопуляции, более высокие уровни которых наблюдались при аденокарциноме легкого (CD4, CD27), были взаимосвязаны с определенными показателями миелограммы.

Обсуждение

В данной работе мы рассмотрели как традиционные субпопуляции лимфоцитов — Т-клетки (CD3) и их

субпопуляции (CD4, CD8), зрелые В-лимфоциты (CD20), НК-клетки, так и ряд минорных, или эффекторных популяций (CD4⁺CD25⁺, CD27, перфорин⁺). Исследование впервые проведено в КМ больных раком легкого с параллельным детальным изучением миелограммы пациентов.

Уже на 1-м этапе обратили на себя внимание выраженные различия иммунологических профилей субпопуляционного состава лимфоцитов КМ больных ПКРЛ и аденокарциномой. Т-клеточные субпопуляции (CD3) и CD8-лимфоциты (Т- и НК-клетки) достоверно преобладали у больных ПКРЛ. А более высокие уровни зрелых В-лимфоцитов КМ были характерны для аденокарциномы. Вполне возможно, что принятие во внимание более характерного для той или иной гистологической формы рака варианта иммунного ответа (Т-, НК-клеточного или гуморального) позволит более направленно планировать таргетную и иммунотерапию у больных. Вместе с тем нельзя не отметить высокую ассоциацию пола больных с гистологическим вариантом опухоли — все 28 больных ПКРЛ были мужчины. С учетом того факта, что при

Таблица 5. Корреляционные связи перфоринсодержащих лимфоцитарных популяций костного мозга больных раком легкого с клетками гемопоэза

Table 5. Correlation of perforin-containing lymphocytic bone marrow populations of patients with lung cancer and hematopoietic cells

Клеточный тип и индекс миелограммы Cell type and myelogram index	CD45 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD45 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)		CD8 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD8 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)		CD4 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD4 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)		CD27 ⁺ -перфорин ⁺ (n = 36) CD27 ⁺ -perforin ⁺ (n = 36)	
	R	p	R	p	R	p	R	p
Миелоциты Myelocytes	−0,340	0,042	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	0,548	0,001	0,567	0,000	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Индекс созревания нейтрофилов Neutrophil maturation index	−0,363	0,029	−0,408	0,014	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Лимфоциты Lymphocytes	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	0,471	0,004	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Нормобласты базофильные Basophilic normoblasts	−0,397	0,017	−0,399	0,016	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Нормобласты полихроматофильные Polychromatophilic normoblasts	−0,701	0,000	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.
Сумма клеток эритроидного ростка Erythroid lineage cells count	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	0,349	0,037
Индекс созревания эритроидных клеток Erythroid maturation index	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	н. д. n. s.	−0,33	0,05

Примечание. R — коэффициент корреляции; н. д. — нет достоверности.

Note. R — correlation coefficient; n. s. — not significant.

аденокарциноме легкого достоверных различий в уровнях CD3⁺ и CD8⁺ в зависимости от пола не выявлено, мы склонны связывать более высокие уровни эффекторных Т-клеток и CD8-клеток с гистологическим диагнозом ПКРЛ, а не с полом пациентов. Аналогично более высокие уровни зрелых В-клеток были характерными для аденокарциномы легкого. Иными словами, при исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов КМ мы впервые показали, что ПКРЛ характеризуется в большей степени Т- и НК-клеточными проявлениями иммунитета, а аденокарцинома — проявлениями гуморального иммунитета.

Дальнейший анализ полученных данных был посвящен эффекторным субпопуляциям, воздействие на которые может быть использовано для повышения эффективности противоопухолевого иммунитета. Эти перфоринсодержащие субпопуляции не имели связи с полом больных. Вместе с тем установлена достоверная связь с гистологическим вариантом опухоли. Минорные популяции цитотоксических CD4-лимфоцитов и CD27-лимфоциты, содержащие перфорин, были более выраженными при аденокарциноме легкого.

Таблица 6. Субпопуляции Т-клеток, экспрессирующих CD27 и эффекторные молекулы [5]

Table 6. Subpopulations of T-cells expressing CD27 and effector molecules [5]

Субпопуляция Т-клеток T-cells subpopulation	CD27	Гранзим А Granzim A		Гранзим В Granzim B	
		CD4	CD8	CD4	CD8
Tn	++	—	—	—	—
Tscm	+	—	—	—	—
Tcm	+	—	—/+	—	—
Ttm	+	—	++	—	+
Tem	—/+	—/+	+++	—/+	++
Tte	—	+	+++	—/+	+++

Примечание. Субпопуляции Т-клеток: Tn — наивные, Tscm — стволовые клетки памяти, Tcm — клетки центральной памяти, Ttm — промежуточные клетки памяти, Tem — эффекторные клетки памяти, Tte — терминальные эффекторные клетки.

Note. T-cells subpopulations: Tn — naïve; Tscm — memory stem cells; Tcm — central memory cells; Ttm — intermediate memory cells; Tem — effector memory cells; Tte — terminal effector cells.

CD4⁺-Т-клетки с цитотоксической активностью, как известно, выявляются при различных иммунных реакциях, играя важную роль в противовирусном и противоопухолевом иммунитете. Эти клетки характеризуются способностью секретировать гранзим В и перфорин и убивать клетки-мишени в контексте рестрикции класса HLA II. Считается, что эти клетки наиболее близки Th1 (Т-хелперы 1-го типа), секретирующим интерферон γ . Обнаружен подкласс наивных Т-клеток, способных дифференцироваться в CD4-цитотоксические Т-лимфоциты. CD4-цитотоксические Т-лимфоциты рассматриваются как потенциальные мишени для терапевтических целей [4].

Не менее интересен факт обнаружения достоверно более высоких показателей CD27-положительных клеток, экспрессирующих перфорин, при аденокарциноме легкого. Вероятнее всего, речь идет об эффекторных Т-клетках памяти, на которых коэкспрессия данных молекул (гранзим В, перфорин) возможна (табл. 6).

Взаимосвязь субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток КМ с миелокариоцитами представляет интерес как с точки зрения понимания

регуляции гемопоэза, так и с точки зрения особенностей, присущих различным опухолям. В ряде наших публикаций были отмечены особенности гемопоэза, связанные с накоплением оксифильных нормобластов, что являлось фактором, препятствующим развитию анемии при ряде лимфом [6–8]. Для определения оксифильных нормобластов нами был предложен проточно-цитометрический метод [9]. Особенности гемопоэза при меланоме были связаны с поражением КМ [10]. Более того, реципрокные взаимоотношения костномозговых НК-клеток с эритроидными предшественниками имели место при раке молочной железы [11].

Заключение

В статье изучены субпопуляции лимфоцитов КМ больных раком легкого (аденокарцинома, ПКРЛ). Установлено, что Т- и НК-клетки более характерны в количественном плане для ПКРЛ, а зрелые В-лимфоциты – для аденокарциномы. Эффекторные (перфорин-положительные) субпопуляции, такие как CD4⁺ и CD27⁺, также были достоверно более выраженными при аденокарциноме легкого. Установлена связь этих популяций с уровнем эритрокариоцитов КМ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Steven A., Fischer S.A., Robinson B.W. Immunotherapy for lung cancer. *Respirology* 2016;21:821–33. DOI: 10.1111/resp.12789.
2. Buchan S.L., Anne Rogel A., Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. *Blood* 2018;131(1):39–48. DOI: 10.1182/blood-2017-07-741025.
3. Buchan S., Manzo T., Flutter B. et al. OX40- and CD27-mediated costimulation synergizes with anti-PD-L1 blockade by forcing exhausted CD8⁺ T cells to exit quiescence. *J Immunol* 2015;194(1):125–33. DOI: 10.4049/jimmunol.1401644.
4. Takeuchi A., Saito T. CD4 CTL a cytotoxic subset of CD4⁺ T-cells, their differentiation and function. *Front Immunol* 2017;8:194. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00194.
5. Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al. Who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. *Eur J Immunol* 2013;43(11):2797–809. DOI: 10.1002/eji.201343751.
6. Тупицын Н.Н., Зейналова П.А., Френкель М.А. и др. Роль костного мозга в прогнозе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2015;4:40–7. [Tupitsyn N.N., Zeynalova P.A., Frenkel M.A. et al. The role of bone marrow in the prognosis of diffuse B-large cell lymphoma. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2015;4:40–7. (In Russ.)].
7. Тупицын Н.Н., Фалалеева Н.А., Моженкова А.В. и др. Роль костного мозга в прогнозе фолликулярной лимфомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):99–102. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-99-102. [Tupitsyn N.N., Falaleeva N.A., Mozhenkova A.V. et al. The role of bone marrow in the prognosis of follicular lymphoma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Biotherapeutic Journal 2016;15(3):99–102. (In Russ.)].
8. Фалалеева Н.А., Моженкова А.В., Османов Е.А. и др. Особенности эритропоэза больных фолликулярной лимфомой. *Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»* 2016;(3):35–8. [Falaleeva, N.A., Mozhenkova A.V., Osmanov E.A. et al. Features of erythropoiesis of patients with follicular lymphoma. *Vestnik FGBU* мацевтической химии 2015;4:40–7. [Tupitsyn N.N., Zeynalova P.A., Frenkel M.A. et al. The role of bone marrow in the prognosis of diffuse B-large cell lymphoma. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii* = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2015;4:40–7. (In Russ.)].
9. Тупицын Н.Н., Чэн Ц., Зейналова П.А. Иммунофенотипическое изучение дифференцировки эритрокариоцитов костного мозга у больных диффузной В-крупноклеточной лимфомой. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(4):52–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-52-57. [Tupitsyn N.N., Jiao C., Zeynalova P.A. Immunophenotypic study of bone marrow erythrocyte differentiation in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(4):52–7. (In Russ.)].
10. Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627.
11. Tupitsyn N.N., Mkrtchan V.A., Palladina A.D. et al. Bone marrow lymphocyte populations of innate immunity in breast cancer patients. *GJMR* 2020;20(2):20–7. DOI: 10.34257/GJMRFVOL20IS2PG21.

Вклад авторов

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи, анализ полученных данных;

П.В. Кононец, А.К. Алахвердиев: анализ рукописи;

Т.М. Джуманазаров: обзор публикаций по теме исследования, оформление рукописи;

А.Д. Палладина: получение и анализ данных, обзор публикаций;

С.В. Чулкова: получение и анализ данных, подготовка рукописи, перевод.

Authors' contributions

N.N. Tupitsyn: developing the research design, writing the manuscript, analysis of the obtained data;

P.V. Kononets, A.K. Alakhverdiyev: manuscript analysis;

T.M. Dzhumanazarov: reviewing of publications of the article's theme, manuscript design;

A.D. Palladina: obtaining and analysis of data, review of publications;

S.V. Chulkova: obtaining and analysis of data, manuscript preparation, translation.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

Т.М. Джуманазаров / T.M. Dzhumanazarov: <https://orcid.org/0000-0001-5029-1406>

А.К. Алахвердиев / A.K. Alakhverdiyev: <https://orcid.org/0000-0001-8378-2738>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.04.2020. Принята к публикации: 16.04.2020.

Article submitted: 05.04.2020. Accepted for publication: 16.04.2020.

ОЦЕНКА ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДОЦЕТАКСЕЛА В СОСТАВЕ ФОЛАТМОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ЧАСТИЦ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO*

А.А. Крашенинникова^{1,2}, В.В. Заварзина¹, Д.С. Панова¹, Н.В. Гукасова¹, С.Л. Кузнецов¹,
И.А. Тубашева¹, В.Ю. Балабаньян³, Ю.И. Полтавец¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»; Россия, 123182 Москва,
пл. Академика Курчатова, 1;

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

³ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Контакты: Анна Андреевна Крашенинникова a.a.krashenninnikova@yandex.ru

Введение. Использование субмикронных векторизованных систем доставки, которые способствуют повышению избирательности действия и уменьшению побочного токсического влияния химиотерапии, — один из перспективных подходов к созданию противоопухолевых химиопрепаратов. Разработана система доставки доцетаксела (ДОЦ) в составе полилактидгликолидных частиц (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), модифицированных додециламидом фолиевой кислоты (ДФК) (частицы PLGA-ДОЦ-ДФК).

Цель исследования — сравнительное токсикологическое исследование ДОЦ в форме частиц и в стандартной форме в остром и субхроническом экспериментах на мышах при внутривенном введении.

Материалы и методы. Исследование проведено на мышах-самках линии C57BL/6. При изучении острой токсичности препараты вводили в диапазоне доз 20, 60, 90, 120, 160 мг/кг. На протяжении 30 дней оценивали летальность, определяли массу тела, проводили патоморфологические исследования. Для изучения токсичности в условиях субхронического эксперимента препараты вводили ежедневно в течение 3 дней в разовых дозах 11 и 22 мг/кг и далее в течение 30 дней проводили необходимые исследования.

Результаты. При 1-кратном введении PLGA-ДОЦ-ДФК в дозах 20, 60, 90 мг/кг гибели животных не наблюдалось; в дозах 120 и 160 мг/кг выявлена гибель животных на 1–4-е сутки. В случае применения субстанции ДОЦ гибель животных наступала в течение суток после введения доз 60, 90, 120, 160 мг/кг. Картина интоксикации была сходной для сравниваемых препаратов и проявлялась в гиподинамии, нарушении координации движений, парезе задних конечностей, но степень их проявления была более выраженной в группах с введением ДОЦ, чем в случае введения PLGA-ДОЦ-ДФК. Было установлено, что средняя летальная доза (ЛД₅₀) для PLGA-ДОЦ-ДФК составляет 140 мг/кг, а для субстанции ДОЦ — 112 мг/кг. При субхроническом введении выявленные токсические свойства препаратов зависят от величины примененной дозы. Введение PLGA-ДОЦ-ДФК в разовой дозе 22 мг/кг вызывало летальные эффекты (2/10), обратимую задержку прироста массы и лейкопению у выживших животных, увеличение относительной массы селезенки. Применение PLGA-ДОЦ-ДФК в разовой дозе 11 мг/кг гибели не вызывало, хорошо переносилось и характеризовалось сходной токсичностью с субстанцией ДОЦ.

Заключение. На основании экспериментальных данных определены уровни токсических доз PLGA-ДОЦ-ДФК при остром и субхроническом введении. Полученные результаты позволили рекомендовать препарат для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: доцетаксел, фолатмодифицированные полимерные частицы, токсичность, мыши

Для цитирования: Крашенинникова А.А., Заварзина В.В., Панова Д.С. и др. Оценка токсикологических свойств доцетаксела в составе фолатмодифицированных полимерных частиц в эксперименте *in vivo*. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):55–64.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-55-64



ASSESSMENT OF THE TOXICOLOGICAL PROPERTIES OF DOCETAXEL LOADED FOLATE-MODIFIED POLYMER PARTICLES *IN VIVO*

A.A. Krashenninnikova^{1,2}, V.V. Zavarzina¹, D.S. Panova¹, N.V. Gukasova¹, S.L. Kuznetsov¹, I.A. Tubasheva¹,
V.Yu. Balabanyan³, Yu.I. Poltavets¹

¹National Research Center “Kurchatov Institute”; 1 Akademika Kurchatova ploshchad’, Moscow 123182, Russia;

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

³M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Introduction. One of the perspective approaches to the development of anticancer chemotherapy drugs is the use of submicron vectorized delivery systems that increase the selectivity of action and reduce the toxic side effects of chemotherapy. A delivery system of docetaxel (DOC) loaded poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) particles modified with folic acid dodecylamide (FAD) was developed (PLGA-DOC-FAD).

The aim of the research was a comparative toxicological study of DOC-loaded particles and standard docetaxel solution form in acute and subchronic experiments in mice after intravenous administration.

Materials and methods. The research was conducted in female C57BL/6 mice. During the study of acute toxicity, drugs were administered in the following dose range: 20, 60, 90, 120, 160 mg/kg. Over 30 days, mortality and body weight were evaluated, pathomorphological studies were performed. The study of toxicity in conditions of subchronic administration of medicine was conducted using three times daily administration in single doses of 11 and 22 mg/kg. Subchronic toxicity of the drugs was studied with three times daily administration in single doses of 11 and 22 mg/kg. The necessary studies were performed within 30 days.

Results. With a single injection of PLGA-DOC-FAD in doses of 20, 60, 90 mg/kg, the death of animals wasn't observed; at doses of 120 and 160 mg/kg, the death of animals was detected in 1–4 days. In the case of administration of the DOC substance, the death of animals occurred within a day after the administration of doses of 60, 90, 120, 160 mg/kg. The pattern of intoxication was similar in case of compared drugs and manifested in hypodynamia, impaired movement coordination, hind limbs paresis, though the manifestation degree thereof was more expressed in the groups with the introduction of DOC than in the case of the introduction of PLGA-DOC-FAD. It was detected that the LD_{50} for PLGA-DOC-FAD is 140 mg/kg, and for the DOC substance – 112 mg/kg. In case of subchronic administration, the detected toxic properties of drug depend on the size of the dose applied. The administration of a single dose of 22 mg/kg of PLGA-DOC-FAD caused lethal effects (2/10), reversible delay in weight gain and leucopenia in surviving animals, and an increase in the relative mass of the spleen. The use of PLGA-DOC-FAD in a single dose of 11 mg/kg didn't cause death, was well tolerated and characterized by similar toxicity with the docetaxel substance.

Conclusion. Based on experimental data, the toxic dose levels of PLGA-DOC-FAD were determined under acute and subchronic administration. The results obtained allowed us to recommend PLGA-DOC-FAD for further examination.

Key words: docetaxel, folate-modified polymer particles, toxicity, mice

For citation: Krashenninnikova A.A., Zavarzina V.V., Panova D.S. et al. Assessment of the toxicological properties of docetaxel loaded folate-modified polymer particles in vivo. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):55–64. (In Russ.).

Введение

Применение субмикронных систем доставки противоопухолевых препаратов — один из перспективных подходов к повышению эффективности химиотерапии злокачественных новообразований [1, 2]. Вариантом данного направления является создание векторизованных систем доставки лекарств, обладающих селективностью в отношении опухолевой ткани. При разработке таких систем в качестве векторных молекул часто применяют малые биомолекулы, в том числе фолиевую кислоту, рецепторы к которой высокоэкспрессированы на опухолевых клетках [3–5].

Доцетаксел (ДОЦ) — противоопухолевый препарат из группы таксанов, широко используемый в различных схемах лечения и комбинациях с другими препаратами при терапии рака молочной железы, желудка, легких, предстательной железы и т.д. [6]. Механизм его действия основан на инактивировании микротубулярного аппарата и нарушении фазы митоза в опухолевых клетках. Крайне актуальна проблема побочной токсичности ДОЦ. Препарат вызывает анемию, нейтропению, осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта, нейропатию, аллергические реакции, что приводит к ограничению его терапевтического потенциала [7]. Таким образом, существует высокая потребность в улучшении токсикологического профиля препарата. В литературе есть сведения, касающиеся получения и изучения

свойств ДОЦ в составе различных систем доставки, применение которых способствует снижению токсичности препарата [8, 9]. В ряде работ об использовании таргетных систем доставки ДОЦ в виде полимерных частиц, конъюгированных с фолиевой кислотой, показано повышение избирательности противоопухолевого действия, что свидетельствует о перспективности данного подхода [10, 11]. Ранее авторами был предложен технологичный способ получения ДОЦ в составе полимерных частиц на основе сополимера молочной и гликолиевой кислот (poly(lactic-co-glycolic acid), PLGA), модифицированных додециламидом фолиевой кислоты (ДФК) (частицы PLGA-ДОЦ-ДФК), и показаны высокая селективность и противоопухолевая активность в отношении чувствительных и резистентных опухолевых клеток [12].

Цель настоящего исследования — сравнительное токсикологическое исследование ДОЦ в форме частиц PLGA-ДОЦ-ДФК, а также в стандартной форме в остром и субхроническом экспериментах на мышах при внутривенном введении.

Материалы и методы

Получение и характеристика фолатмодифицированных полимерных частиц с ДОЦ. Получение частиц осуществляли методом прямых эмульсий [12, 13]. Для этого смешивали водную фазу (раствор поливинилового спирта) и неводную фазу, представляющую

собой раствор 3 компонентов в дихлорметане: полимерный компонент — сополимер молочной и глицеролевой кислот PLGA 50/50 (PURASORB® PDLG 5004, PURAC Biochemicals, Нидерланды), векторный компонент — ДФК и фармакологически активный компонент — ДОЦ. В качестве последнего использовали фармацевтическую субстанцию ДОЦ тригидрат (Cilupharmaceuticals, Китай, ФС 001293—001215). Объемное соотношение водной и неводной фаз составило 7 : 1. Далее с помощью ультразвукового гомогенизатора получали эмульсию типа «масло в воде», из которой удаляли дихлорметан путем испарения в атмосферу с получением суспензии частиц. К суспензии добавляли раствор хлорида натрия, замораживали и лиофилизировали в течение суток. Средний размер частиц PLGA-ДОЦ-ДФК, определенный методом динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, Malvern, Великобритания), составил $247,5 \pm 2,8$ нм. Содержание ДОЦ в частицах, определенное методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, составило $2,63 \pm 0,08$ %, эффективность включения ДОЦ в частицы — $90,2 \pm 0,7$ %. Частицы без векторного компонента PLGA-ДОЦ получали по аналогичной методике, исключая стадию добавления ДФК. Для проведения исследований лиофилизаты частиц растворяли в воде для инъекций в концентрации 10 мг/мл по ДОЦ и далее разбавляли водой до нужной дозы, предназначенной для введения животным.

Для приготовления суспензий частиц для последующего введения животным использовали стерильную воду для инъекций. В качестве препарата сравнения применяли субстанцию ДОЦ, которую растворяли в Твин 80 в концентрации 40 мг/мл, далее растворяли в водно-этанольной смеси (13 % раствор этанола) до концентрации 10 мг/мл и разбавляли физиологическим раствором до нужной дозы, предназначенной для введения животным (схема растворения в соответствии с инструкцией PRODUCT MONOGRAPH, TAXOTERE® [7]). Для проведения исследований на животных все суспензии и растворы вводимых препаратов готовили *ex tempore*.

Животные. Исследование проводилось в соответствии с правилами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в научных целях, и стандартными протоколами доклинических исследований [14]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией НИЦ «Курчатовский институт». В эксперименте использовались мыши-самки линии C57BL/6. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН и имели SPF-статус, подтвержденный сертификатом поставщика. Средняя масса тела мышей к моменту начала эксперимента составляла $20,2 \pm 0,5$ г. Перед началом эксперимента животные проходили период

физиологической, психологической и пищевой адаптации в течение 7 дней. Мыши содержались в стандартных условиях, кормление и поение осуществлялось *ad libitum*, с соблюдением полноценного пищевого рациона.

Исследования *in vivo*. Для исследования острой токсичности было сформировано 16 опытных групп мышей по 6 особей в каждой группе. Исследование включало сравнительное изучение острой токсичности PLGA-ДОЦ-ДФК, PLGA-ДОЦ и субстанции ДОЦ при 1-кратном внутривенном введении препаратов. При выборе доз опирались на данные литературы о летальных дозах (ЛД) для ДОЦ и препаратов на его основе [7, 15, 16]. Дозы для введения составили: 20, 60, 90, 120 и 160 мг/кг. Препараты вводили в боковую хвостовую вену мыши в объеме 0,4 мл. Токсическое действие препаратов оценивали по числу умерших животных, срокам их гибели, а также на основании мониторингирования общего состояния и поведения животных, клинической картины интоксикации, динамики массы тела животных, данных патоморфологических изменений в тканях и внутренних органах, выявляемых при аутопсии павших и выживших животных, эвтаназированных в конце эксперимента (макроскопическая оценка). Наблюдение за животными осуществлялось в течение 30 сут с момента введения препаратов. Определены расчетные токсические дозы ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄ и ЛД₁₀₀ каждого препарата при 1-кратном внутривенном введении с применением метода Литчфилда—Уилкоксона [17].

Изучение субхронической токсичности препаратов проводили при 3-кратном ежедневном внутривенном введении PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанции ДОЦ в разовых максимально переносимых дозах (МПД) 22 и 11 мг/кг (1/2 МПД). За МПД была принята доза, близкая к расчетной ЛД₁₀ при 1-кратном введении субстанции ДОЦ. В опытных группах животных использовали по 8 мышей, в контрольной — 10. Препараты вводили в боковую хвостовую вену мыши в объеме 0,4 мл. Контрольным животным вводили внутривенно физиологический раствор. Токсическое действие препаратов оценивали по летальности, оценке общего состояния животных, клинической картины интоксикации в период введения и после его окончания, изменениям массы тела животных, гематологическим исследованиям (определение количества лейкоцитов в крови). Результаты рассматривали в динамике в течение 30 дней с 1-го дня курсового введения. На 30-е сутки после окончания курса введений половину самок из каждой группы эвтаназировали. После эвтаназии у подопытных животных осуществляли забор печени, почек, сердца, легких, селезенки. Органы взвешивали для расчета их массовых коэффициентов.

Статистическую обработку количественных данных проводили с помощью компьютерных программ

Microsoft Office Excel и Origin. Расчет ЛД проводили с использованием метода пробит-анализа. ЛД₅₀ представлена как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Результаты измерения массы тела животных представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение; результаты изменений массы органов и уровня лейкоцитов в крови представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка. Полученные количественные данные обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента и критерия χ^2 Пирсона. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении острой токсичности на мышах при внутривенном введении ДОЦ в составе фолат-модифицированных полимерных частиц PLGA-ДОЦ-ДФК в дозах 20, 60, 90 мг/кг гибели животных выявлено не было. При введении препарата в дозах 120 и 160 мг/кг наблюдалась гибель животных на 1–4-е сутки (табл. 1). После введения препарата в высоких дозах у мышей отмечалось общее угнетение, снижение двигательной активности, нарушалась координация движений, развивался парез задних конечностей. Животные погибали на фоне выраженной гиподинамии. У выживших животных общее состояние и поведение нормализовались и соответствовали состоянию животных в контрольной группе. Как видно из табл. 1, наблюдались отличия в выживаемости мышей при введении сравниваемых препаратов в зависимости от дозы и по срокам гибели. В случае введения PLGA-ДОЦ-ДФК гибель животных наблюдалась начиная с дозы 120 мг/кг, а в случае ДОЦ — с дозы 60 мг/кг. Кроме того, летальные эффекты были более отсрочены в случае введения PLGA-ДОЦ-ДФК, чем в случае ДОЦ, после введения которого гибель животных наступала в течение 24 ч. Картина интоксикации была сходна для сравниваемых препаратов, но развитие токсических эффектов происходило быстрее, и степень их проявления на фоне максимальных доз была более выражена в группах с введением ДОЦ, чем в случае введения PLGA-ДОЦ-ДФК. Различий в картине интоксикации после введения ДОЦ в составе фолатмодифицированных полимерных частиц и немодифицированных частиц (PLGA-ДОЦ) не наблюдалось. При аутопсии умерщвленных в конце эксперимента животных, получавших максимальные дозы вводимых препаратов, отмечены признаки гастроинтестинальной токсичности (повреждения слизистой), увеличение печени и селезенки, локальная алопеция, раздражение в месте инъекции, остальные органы — без особенностей. В целом описанная клиническая картина интоксикации и вскрытия согласуется с данными литературы о токсических эффектах ДОЦ [7, 16].

Динамика изменения массы тела мышей после внутривенного введения препаратов представлена

в табл. 2. Показано, что препараты в дозах 20–60 мг/кг незначительно влияли на массу тела животных. После введения препаратов в дозах 120 и 160 мг/кг наблюдалось умеренное снижение прироста массы тела на 3–8-е сутки после введения, что связано с гастроинтестинальной токсичностью. Так, в группах с введением PLGA-ДОЦ-ДФК и PLGA-ДОЦ в дозе 160 мг/кг на 8-е сутки после введения снижение массы тела составило 16,5 и 21,4 % по сравнению с контрольной группой. Во всех группах животных наблюдалась тенденция к восстановлению массы тела к 30-м суткам наблюдения, кроме группы с введением PLGA-ДОЦ в дозе 160 мг/кг, в которой выявлена отрицательная динамика прироста массы тела.

Таблица 1. Сравнительная токсичность PLGA-ДОЦ-ДФК, PLGA-ДОЦ и субстанции ДОЦ при 1-кратном внутривенном введении мышам C57BL/6

Table 1. Comparative toxicity of PLGA-DOC-FAD, PLGA-DOC and DOC substance with a single IV administration to C57BL/6 mice

Препарат Drug	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Эффект (всего/ пало), шт. Effect (total/ dead), pcs	Срок гибели, сутки Time of death, day
PLGA-ДОЦ-ДФК PLGA-DOC-FAD	20	6/0	—
	60	6/0	—
	90	6/0	—
	120	6/5	1, 1, 2, 3, 4
	160	6/3	1, 1, 2
PLGA-ДОЦ PLGA-DOC	20	6/0	—
	60	6/1	2
	90	6/0	—
	120	6/2	1, 1
	160	6/3	1, 1, 4
Субстанция ДОЦ Substance DOC	20	6/0	—
	60	6/2	2, 2
	90	6/1	1
	120	6/6	1, 1, 1, 1, 1, 1
	160	6/4	1, 1, 1, 2
Контроль Control	0	0/6	—

Примечание. Здесь и в табл. 2–6: PLGA-ДОЦ-ДФК — полилактидгликолидные частицы, модифицированные додециламидом фолиевой кислоты; PLGA-ДОЦ — полилактидгликолидные частицы, не модифицированные додециламидом фолиевой кислоты; ДОЦ — доцетаксел.
Note. Here and in table 2–6: PLGA-DOC-FAD — poly(lactide-co-glycolide) particles modified with folic acid dodecylamide; PLGA-DOC — poly(lactide-co-glycolide) particles not modified with folic acid dodecylamide; DOC — docetaxel.

Таблица 2. Динамика изменения массы тела мышей-самок C57BL/6 после 1-кратного внутривенного введения PLGA-ДОЦ-ДФК, PLGA-ДОЦ и субстанции ДОЦ

Table 2. The dynamics of changes in body weight of female C57BL/6 mice after 1-fold IV administration of PLGA-DOC-FAD, PLGA-DOC and the substance of DOC

Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Масса тела животных после введения препарата, г Animals' body weight a day after the drug injection, g					
	Фон (0) Background (0)	3-и сутки 3 rd day	8-е сутки 8 th day	13-е сутки 13 th day	20-е сутки 20 th day	30-е сутки 30 th day
PLGA-ДОЦ-ДФК PLGA-DOC-FAD						
20	19,4 ± 0,4	19,0 ± 0,6	19,1 ± 0,7	20,4 ± 1,0	21,7 ± 1,3	22,2 ± 1,7
60	19,8 ± 0,6	19,4 ± 1,0	18,9 ± 1,4	20,5 ± 1,7	21,7 ± 1,4	22,4 ± 1,6
90	19,6 ± 1,1	18,4 ± 1,1	17,5 ± 1,0	18,0 ± 1,8	19,3 ± 2,0	19,6 ± 2,0
120	20,1 ± 0,7	18,6*	19,8*	19,6*	20*	19,7*
160	20,2 ± 0,8	18,0 ± 0,75	17,5 ± 0,6	18,2 ± 1,4	19,7 ± 1,3	19,7 ± 0,9
PLGA-ДОЦ PLGA-DOC						
20	19,6 ± 0,5	19,2 ± 0,6	19,8 ± 1,0	20,0 ± 1,0	21,0 ± 1,0	21,5 ± 0,8
60	20,6 ± 1,3	19,4 ± 1,2	18,8 ± 1,8	19,2 ± 2,0	20,7 ± 1,9	20,9 ± 1,4
90	19,7 ± 0,5	19,4 ± 1,2	20,1 ± 1,4	21,2 ± 0,6	21,8 ± 1,3	22,0 ± 1,5
120	20,9 ± 1	19,7 ± 1,9	18,6 ± 1,5	18,9 ± 1,6	20,5 ± 1,0	20,6 ± 0,7
160	20,4 ± 0,6	17,1 ± 0,3	16,2 ± 0,3	16,2 ± 0,6	16,6 ± 1,4	16,5 ± 0,3
Субстанция ДОЦ Substance DOC						
20	20,5 ± 0,3	20,0 ± 0,5	21,3 ± 0,8	21,6 ± 0,6	22,0 ± 0,8	22,5 ± 0,6
60	20,0 ± 0,4	19,7 ± 0,4	21,2 ± 0,6	20,9 ± 0,5	21,2 ± 0,7	21,0 ± 0,5
90	19,6 ± 0,9	19,4 ± 1,0	19,9 ± 1,5	20,5 ± 1,0	20,2 ± 1,2	20,1 ± 1,2
120	20,8 ± 0,7	**	**	**	**	**
160	21,0 ± 1,0	20,1 ± 2,0	21,6 ± 1,5	22,1 ± 2,0	22,7 ± 2,7	22,4 ± 2,8
Контрольная группа Control group						
	21,15 ± 0,5	21,45 ± 0,5	21,9 ± 0,5	22,4 ± 0,5	22,4 ± 0,5	22,6 ± 0,5

*Недостаточное количество животных для статистической обработки; **все животные в данной группе погибли.

*Insufficient number of animals for statistical processing; **all animals in the group died.

Получены расчетные токсические дозы препаратов при 1-кратном внутривенном введении самкам мышей C57BL/6 (табл. 3). Значение ЛД₅₀ для субстанции ДОЦ, введенной в растворителе, состав которого соответствует инструкции препарата Таксотер®, было близко данным литературы для указанного препарата [7, 15]. Расчетные токсические дозы фолат-модифицированных полимерных частиц при внутривенном введении оказались выше токсических доз субстанции ДОЦ. Так, значения ЛД₅₀, ЛД₁₆ и ЛД₁₀ для PLGA-ДОЦ-ДФК были выше по сравнению

со значениями для ДОЦ на 24,7; 81,8 и 164,6 % (в случае ЛД₁₆ и ЛД₁₀ различия статистически значимы, $p = 0,05$). Следует отметить, что ширина токсического действия (интервал между ЛД₁₀ и ЛД₅₀) достаточно невелика в случае обоих препаратов, однако для PLGA-ДОЦ-ДФК произошло увеличение терапевтической широты. Расчетные токсические дозы для частиц с ДОЦ без фолатного векторного компонента PLGA-ДОЦ оказались близки величинам токсических доз PLGA-ДОЦ-ДФК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что снижение токсичности

достигается за счет включения ДОЦ в состав полимерных частиц, как фолатмодифицированных, так и немодифицированных. Включение ДОЦ в частицы обуславливает уменьшение токсических эффектов за счет замедления его высвобождения из полимерной матрицы и исключения из состава достаточно токсичного вспомогательного компонента инъекционной лекарственной формы ДОЦ полисорбата 80, входящего в препарат Таксотер® [12]. Влияние наносомальных систем доставки на снижение общей острой токсичности описано для ряда противоопухолевых препаратов группы таксанов, включенных в состав частиц, как векторизованных, так и не векторизованных [18, 19].

В условиях субхронического эксперимента ДОЦ в составе частиц PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанцию ДОЦ вводили мышам внутривенно ежедневно 3-кратно в 2 дозах, рассчитанных исходя из МПД ДОЦ, определенной при исследовании острой токсичности на мышах при внутривенном введении: разовые дозы — 22 и 11 мг/кг. При введении ДОЦ в составе частиц PLGA-ДОЦ-ДФК в дозе 11 мг/кг гибели животных не наблюдалось. Они хорошо переносили введения, отмечалась нормальная прибавка массы тела. На всем протяжении эксперимента отклонений в поведенческих реакциях животных не отмечалось. Применение PLGA-ДОЦ-ДФК в разовой дозе, равной 22 мг/кг, к окончанию курса введений вызвало гибель 2 животных из 10. При этом выжившие самки перенесли курсовое введение по оценке общего состояния удовлетворительно. В группе с введением 22 мг/кг PLGA-ДОЦ-ДФК на 7-е сутки эксперимента наблюдалось снижение на 10,8 % массы тела по сравнению

с контрольными образцами с дальнейшим восстановлением массы тела к 15–30-м суткам наблюдения (табл. 4). При гематологическом исследовании у мышей, получавших PLGA-ДОЦ-ДФК в разовой дозе

Таблица 3. Параметры токсичности при 1-кратном внутривенном введении мышам препаратов сравнения PLGA-ДОЦ-ДФК, PLGA-ДОЦ и субстанции ДОЦ, мг/кг

Table 3. The toxicity parameters with a 1-fold IV administration of PLGA-DOC-FAD, PLGA-DOC and the substance of DOC of comparison preparations for mice, mg/kg

Расчетные токсические дозы Estimated toxic doses	PLGA-ДОЦ-ДФК PLGA-DOC-FAD	PLGA-ДОЦ PLGA-DOC	Субстанция ДОЦ Substance DOC
ЛД ₁₀ (МПД) LD ₁₀ (MTD)	58,2 ± 5,5*	57,0 ± 5,7*	22,0 ± 6,0
ЛД ₁₆ LD ₁₆	76,0 ± 12,3*	75,6 ± 12,6*	41,8 ± 13,3
ЛД ₅₀ LD ₅₀	140,0 ± 3,7	142,2 ± 3,8	112,0 ± 4,0
ЛД ₈₄ LD ₈₄	204,0 ± 7,3	208,7 ± 7,6	182,8 ± 8,0
ЛД ₁₀₀ LD ₁₀₀	265,4 ± 4,3	272,6 ± 4,4	250,5 ± 4,7

Примечание. ЛД — летальная доза; МПД — максимально переносимая доза; *различия относительно группы с введением субстанции ДОЦ статистически значимы; $p = 0,05$.

Note. LD — lethal dose; MTD — maximum tolerated dose; *differences with DOC substance group are statistically significant; $p = 0,05$.

Таблица 4. Динамика изменения массы тела мышей после 3-кратного внутривенного введения PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанции ДОЦ

Table 4. The dynamics of changes in body weight of mice after 3-fold IV administration of PLGA-DOC-FAD and the substance of DOC

Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Масса тела животных, г Animals' body weight, g				
	Фон (0) Background (0)	3-и сутки 3 rd day	7-е сутки 7 th day	15-е сутки 15 th day	30-е сутки 30 th day
PLGA-ДОЦ-ДФК PLGA-DOC-FAD					
11	21,4 ± 1,0	21,1 ± 0,8	21,9 ± 1,2	22,4 ± 1,1	21,9 ± 1,4
22	20,3 ± 1,5	19,3 ± 1,1	19,0 ± 0,5	21,0 ± 1,0	20,8 ± 0,4
Субстанция ДОЦ Substance DOC					
11	20,7 ± 0,9	20,1 ± 1,0	21,5 ± 1,1	21,0 ± 1,0	22,0 ± 0,9
22	21,1 ± 1,0	20,9 ± 1,0	21,6 ± 0,8	21,7 ± 0,9	22,0 ± 0,9
Контрольная группа Control group					
	21,1 ± 1,0	21,2 ± 0,8	21,3 ± 0,9	21,4 ± 0,6	22,3 ± 0,7

Таблица 5. Динамика изменения общего количества лейкоцитов после 3-кратного внутривенного введения PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанции ДОЦ
Table 5. The dynamics of changes in the total number of leukocytes after 3-fold IV administration of PLGA-DOC-FAD and the substance of DOC

Доза, мг/кг Dose, mg/kg	Количество лейкоцитов, тыс./мм ³ Leukocytes count, thousands/mm ³			
	Фон (0) Background (0)	5-е сутки 5 th day	20-е сутки 20 th day	30-е сутки 30 th day
PLGA-ДОЦ-ДФК PLGA-DOC-FAD				
11	8,175 ± 0,6	7,719 ± 2,5	10,34 ± 0,8	6,687 ± 0,9
22	7,958 ± 0,4	3,594 ± 0,9	7,438 ± 1,5	6,593 ± 0,7
Субстанция ДОЦ Substance DOC				
11	7,849 ± 0,7	6,25 ± 0,9	5,75 ± 0,5	7,469 ± 1,5
22	8,032 ± 0,6	7,375 ± 1,2	9,906 ± 1,6	8,75 ± 1,5
Контрольная группа Control group				
	8,238 ± 0,5	8,172 ± 0,5	8,375 ± 0,7	9,25 ± 0,8

Таблица 6. Массовые коэффициенты внутренних органов мышей на 30-е сутки после 3-кратного внутривенного введения PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанции ДОЦ
Table 6. Mass coefficients of internal organs of mice on the 30th day after 3-fold IV administration of PLGA-DOC-FAD and the substance of DOC

Орган Organ	Массовые коэффициенты внутренних органов, % Mass coefficients of internal organs %				
	PLGA-ДОЦ-ДФК PLGA-DOC-FAD		Субстанция ДОЦ Substance DOC		Контрольная группа Control group
	11 мг/кг 11 mg/kg	22 мг/кг 22 mg/kg	11 мг/кг 11 mg/kg	22 мг/кг 22 mg/kg	
Печень Liver	6,62 ± 0,37	6,42 ± 0,69	5,41 ± 0,60	5,47 ± 0,37	6,11 ± 1,21
Почки Kidneys	1,37 ± 0,04	1,46 ± 0,12	1,47 ± 0,25	1,26 ± 0,07	1,34 ± 0,14
Селезенка Spleen	0,56 ± 0,09	0,68 ± 0,02	0,37 ± 0,08	0,36 ± 0,06	0,35 ± 0,08
Легкие Lungs	0,77 ± 0,05	0,72 ± 0,09	0,74 ± 0,12	0,67 ± 0,06	0,64 ± 0,10
Сердце Heart	0,58 ± 0,02	0,61 ± 0,06	0,57 ± 0,10	0,52 ± 0,05	0,54 ± 0,06

22 мг/кг, на 5-е сутки эксперимента было выявлено снижение общего количества лейкоцитов в периферической крови на 56 % относительно контрольной группы с тенденцией к восстановлению к 20–30-м суткам наблюдения (табл. 5). При применении субстанции ДОЦ (11 мг/кг) также наблюдалось снижение уровня лейкоцитов, составившее на 20-й день эксперимента 31 % относительно контрольной группы с восстановлением показателя к 30-м суткам наблюдений. Таким образом, выявленная лейкопения носила хотя

и выраженный, но обратимый характер при применении обоих сравниваемых препаратов.

Анализ массовых коэффициентов внутренних органов мышей в группах с введением PLGA-ДОЦ-ДФК показал, что массовые коэффициенты печени, почек, легких и сердца на 30-е сутки эксперимента не отличались от показателей группы контроля. Выявлено увеличение массовых коэффициентов селезенки в группах животных, получавших PLGA-ДОЦ-ДФК, более выраженное в группе с введением дозы

22 мг/кг относительно группы контроля и группы с введением субстанции ДОЦ. Следует отметить, что выявленное в исследовании увеличение относительной массы селезенки после введения полимерных частиц коррелирует с данными других авторов и может быть связано с процессами поглощения наноразмерных частиц клетками системы моноцитарных фагоцитов, присутствующей в селезенке [20–22].

Представленные результаты показали, что в условиях субхронического применения ДОЦ в составе частиц PLGA-ДОЦ-ДФК при 3-кратном введении в разовой дозе 22 мг препарат проявляет токсические свойства, так как вызывает летальность (2/10), обратимую задержку прироста массы и лейкопению у выживших животных, увеличение относительной массы селезенки. Применение препарата в разовой дозе 11 мг/кг хорошо переносилось животными: гибели животных не вызывало, клинические проявления токсичности и изменения в поведенческих реакциях отсутствовали. Таким образом, степень токсического воздействия PLGA-ДОЦ-ДФК зависела от величины вводимой дозы. Следует отметить, что переносимость PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанции ДОЦ в режиме 3-кратного ежедневного введения в дозе 11 мг/кг была сходной, а в случае введения дозы 22 мг/кг выявлено усиление токсичности по сравнению с субстанцией. Изменение токсических свойств ДОЦ в составе частиц связано, по-видимому, с изменением биораспределения и кумулятивным действием. Таким образом, ДОЦ в составе частиц PLGA-ДОЦ-ДФК продемонстрировал приемлемый профиль токсичности. Полученные результаты позволяют предположить, что в терапевтическом диапазоне доз с оптимально подобранным режимом введения препарат не проявит токсических свойств.

Заключение

На основании данных исследования острой токсичности на мышах при 1-кратном внутривенном

введении ДОЦ в составе PLGA-ДОЦ-ДФК и субстанции ДОЦ выявлены существенные отличия между токсическими свойствами изучаемых форм ДОЦ. Установлено, что гибель мышей при применении субстанции ДОЦ наступала на 1–2-е сутки после введения доз в диапазоне 60, 90, 120, 160 мг/кг. В случае введения PLGA-ДОЦ-ДФК летальные эффекты наступали от более высоких доз (120 и 160 мг/кг) и более отсроченно – на 1–4-е сутки после введения препарата. Картина интоксикации была сходна для сравниваемых препаратов и проявлялась в гиподинамии, нарушении координации движений, парезе задних конечностей, но развитие токсических эффектов происходило быстрее, и степень их проявления была более выражена в группах с введением ДОЦ, чем в случае применения PLGA-ДОЦ-ДФК. Полученные расчетные токсические дозы для препаратов при 1-кратном внутривенном введении мышам-самкам для PLGA-ДОЦ-ДФК были выше по сравнению со значениями для ДОЦ. Для PLGA-ДОЦ-ДФК: ЛД₅₀ – 140,0 мг/кг, ЛД₁₀ – 58,2 мг/кг; для субстанции ДОЦ: ЛД₅₀ – 112,0 мг/кг, ЛД₁₀ – 22,0 мг/кг (для ЛД₁₀ различия статистически значимы, $p = 0,05$).

Изучена токсичность ДОЦ в составе частиц PLGA-ДОЦ-ДФК при 3-кратном ежедневном внутривенном введении мышам-самкам. На основании полученных данных установлено, что степень токсического воздействия PLGA-ДОЦ-ДФК зависела от величины дозы. Введение препарата в разовой дозе 22 мг вызывало летальные эффекты (2/10), обратимую задержку прироста массы и лейкопению у выживших животных, увеличение относительной массы селезенки. Применение PLGA-ДОЦ-ДФК в разовой дозе 11 мг/кг гибели не вызывало, хорошо переносилось животными и характеризовалось сходной токсичностью с субстанцией ДОЦ. Таким образом, результаты настоящего исследования позволяют рекомендовать разработанный препарат ДОЦ в составе фолатмодифицированных полимерных частиц для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Prabhu R.H., Patravale V.B., Joshi M.D. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int J Nanomedicine* 2015;10:1001–18. DOI: 10.2147/IJN.S56932.
2. Doppalapudi S., Jain A., Domb A.J., Khan W. Biodegradable polymers for targeted delivery of anti-cancer drugs. *Expert Opin Drug Deliv* 2016;13(6):891–909. DOI: 10.1517/17425247.2016.1156671.
3. Bahrami B., Mohammadnia-Afrouzi M., Bakhshaei P. et al. Folate-conjugated nanoparticles as a potent therapeutic approach in targeted cancer therapy. *Tumour Biol* 2015;36(8):5727–42. DOI: 10.1007/s13277-015-3706-6.
4. Санжаков М.А., Игнатов Д.В., Прозоровский В.Н. и др. Синтез адресного конъюгата для фосфолипидной системы транспорта лекарств. *Биомедицинская химия* 2014;60(6): 713–6. DOI: 10.18097/pbmc20146006713. [Sanzhakov M.A., Ignatov D.V., Prozorovskiy V.N. et al. Development of Targeted Drug Delivery System: Synthesis of Conjugates of Address Fragment (RA-COOH) With Ligand (R-NH₂). *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical chemistry* 2014;60(6):713–6. (In Russ.).]
5. Suvorov N.V., Mironov A.F., Grin M.A. Folic acid and its derivatives for targeted photodynamic therapy of cancer. *Rus Chem Bulletin* 2017;66(11):1982–2008. DOI: 10.1007/s11172-017-1973-7.
6. Montero A., Fossella F., Hortobagyi G., Valero V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol* 2005;6(4):229–39. DOI: 10.1016/S1470-2045(05)70094-2.

7. PRODUCT MONOGRAPH TAXOTERE® (docetaxel for injection). Sano-fi-Aventis Canada Inc. Laval (Québec), 2017. Available by: URL: <https://www.products.sanofi.ca/en/taxotere.pdf>.
8. Su C.Y., Liu J.J., Ho Y.S. et al. Development and characterization of docetaxel-loaded lecithin-stabilized micellar drug delivery system (L_αMDDs) for improving the therapeutic efficacy and reducing systemic toxicity. *Eur J Pharm Biopharm* 2018;123:9–19. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.11.006.
9. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Yabbarov N.G. et al. The docetaxel polymeric form and its antitumor activity. *Russian J Bioorganic Chem* 2017;43:278–85. DOI: 10.1134/S1068162017030116.
10. Hu L., Pang S., Hu Q. et al. Enhanced antitumor efficacy of folate targeted nanoparticles co-loaded with docetaxel and curcumin. *Biomed Pharmacother* 2015;75:26–32. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.08.036.
11. Esmaili F., Ghahremani M.H., Ostad S.N. et al. Folate-receptor-targeted delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *J Drug Target* 2008;16(5):415–23. DOI: 10.1080/10611860802088630.
12. Poltavets Y.I., Zhirnik A.S., Zavarzina V.V. et al. *In vitro* anticancer activity of folate-modified docetaxel-loaded PLGA nanoparticles against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Nanotechnology* 2019;10(2). DOI: 10.1186/s12645-019-0048-x.
13. Полтавец Ю.И., Воронцов Е.А., Заварзина В.В. и др. Полимерный комплекс для молекулярно-прицельной терапии и способ его получения. Патент РФ № 2 675 810 C1 от 19.12.2017. [Poltavets Yu.I., Vorontsov E.A., Zavarzina V.V. et al. Polymeric complex for molecular targeted therapy and method for its obtaining. RU 2 675 810 C1, 19.12.2017. (In Russ.)].
14. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986;123.
15. Gao H., Pang Z., Pan S. et al. Antiglioma effect and safety of docetaxel-loaded nanoemulsion. *Arch Pharm Res* 2012;35(2):333–41. DOI: 10.1007/s12272-012-0214-8.
16. Bissery M.C., Guénard D., Guéritte-Voegelein F., Lavelle F. Experimental Antitumor Activity of Taxotere (RP 56976, NSC 628503), a Taxol Analogue. *Cancer Res* 1991;51(18):4845–52.
17. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л.: Государственное издательство медицинской литературы (Медгиз), 1963. С. 81–106. [Belen'kij M.L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect. Leningrad: State Publishing House of Medical Literature (Medgiz) 1963. P. 81–106. (In Russ.)].
18. Sun Y., Zhao Y., Teng S. et al. Folic acid receptor-targeted human serum albumin nanoparticle formulation of cabazitaxel for tumor therapy. *Int J Nanomedicine* 2018;14:135–48. DOI: 10.2147/IJN.S181296.
19. Lv W., Cheng L., Li B. Development and evaluation of a novel TPGS-mediated paclitaxel-loaded PLGA-mPEG nanoparticle for the treatment of ovarian cancer. *Chem Pharm Bull* 2015;63(2):68–74. DOI: 10.1248/cpb.c14-00423.
20. Demoy M., Andreux J.P., Weingarten C. et al. Spleen capture of nanoparticles: influence of animal species and surface characteristics. *Pharm Res* 1999;16(1):37–41. DOI: 10.1023/A:1018858409737.
21. Трещалин И.Д., Переверзева Э.Р., Бодягин Д.А. и др. Сравнительное экспериментальное токсикологическое исследование доxorубина и его наносомальных лекарственных форм. *Российский биотерапевтический журнал* 2008;7(3):24–33. [Treshchalin I.D., Pereverzeva E.R., Bodyagin D.A. et al. Comparative experimental toxicological study of doxorubicin and nanoparticle formulations. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2008;7(3):24–33. (In Russ.)].
22. Peracchia M.T., Fattal E., Desmaële D. et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J Control Release* 1999;60(1):121–8. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00063-2.

Вклад авторов

А.А. Крашенинникова: дизайн и проведение исследований *in vivo* — изучение острой и субхронической токсичности, статистическая обработка данных, анализ результатов;
 В.В. Заварзина: получение и характеристика фолатмодифицированных полимерных частиц с доцетакселом;
 Д.С. Панова: проведение исследований *in vivo* — изучение острой и субхронической токсичности, статистическая обработка данных;
 Н.В. Гукасова: разработка дизайна и проведение исследований *in vivo* — изучение острой и субхронической токсичности, анализ результатов;
 С.Л. Кузнецов, И.А. Тубашева, Ю.И. Полтавец: получение и характеристика фолатмодифицированных полимерных частиц с доцетакселом;
 В.Ю. Балабаньян: разработка дизайна исследования, анализ результатов.

Authors' contributions

A.A. Krashenninnikova: study design and *in vivo* studies of acute and subchronic toxicity, statistical data processing, results analysis;
 V.V. Zavarzina: preparing and characterizing docetaxel-loaded folate-modified polymer particles;
 D.S. Panova: *in vivo* studies of acute and subchronic toxicity, statistical data processing;
 N.V. Gukasova: study design and *in vivo* studies of acute and subchronic toxicity, results analysis;
 S.L. Kuznetsov, I.A. Tubasheva, Yu.I. Poltavets: preparing and characterizing docetaxel-loaded folate-modified polymer particles;
 V.Yu. Balabanyan: study design, results analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Крашенинникова / A.A. Krashenninnikova: <https://orcid.org/0000-0002-7985-9314>
 В.В. Заварзина / V.V. Zavarzina: <https://orcid.org/0000-0002-9550-4206>
 Д.С. Панова / D.S. Panova: <https://orcid.org/0000-0001-7421-6961>
 Н.В. Гукасова / N.V. Gukasova: <https://orcid.org/0000-0001-7163-4527>
 С.Л. Кузнецов / S.L. Kuznetsov: <https://orcid.org/0000-0002-6290-5142>
 И.А. Тубашева / I.A. Tubasheva: <https://orcid.org/0000-0002-9461-4219>

В.Ю. Балабаньян / V.Yu. Balabanyan: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>

Ю.И. Полтавец / Yu.I. Poltavets: <https://orcid.org/0000-0002-2803-0426>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках Программы деятельности НИЦ «Курчатовский институт» и Соглашения № 14.607.21.0198 (RFMEFI60717X0198) с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации.

Financing. The study was supported by the Scientific Program of the NRC “Kurchatov institute” and Agreement No 14.607.21.0198 (RFMEFI60717X0198) of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования от 25.05.2018 НГ №1/109 пр. одобрен комитетом по биомедицинской этике Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». 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 the rules of bioethics. The study protocol 25.05.2018 НГ No 1/109 was approved by the bio-medical ethics committee of National Research Center “Kurchatov institute”. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 24.10.2019. Принята к публикации: 03.03.2020.

Article submitted: 24.10.2019. Accepted for publication: 03.03.2020.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СУБХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ АКАДЕЗИНА НА КРЫСАХ

Н.П. Ермакова¹, И.Б. Меркулова¹, О.И. Коняева¹, В.А. Чалей¹, Т.В. Абрамова¹, В.М. Бухман¹,
С.В. Яроцкий², К.В. Лобанов², Н.Ю. Кульбачевская¹

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

²ФГБУ «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»; Россия, 117545 Москва, 1-й Дорожный проезд, 1

Контакты: Надежда Павловна Ермакова ne518@yandex.ru

Введение. В Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина проведены доклинические токсикологические исследования лиофилизированной лекарственной формы лекарственного средства на основе акадезина — нового противоопухолевого препарата.

Цель исследования — изучение субхронической токсичности лекарственного средства на основе акадезина на крысах для оценки его токсического действия.

Материалы и методы. Исследование проведено на 40 неинбредных беспородных крысах-самцах. Препарат вводили внутрибрюшинно ежедневно 15-кратно в суммарных дозах 750, 1150 и 2300 мг/кг. В течение всего срока наблюдения (30 сут) проводили клинко-лабораторные исследования. Патоморфологическое исследование проводили на 1-е и 30-е сутки наблюдения.

Результаты. Установлено, что лекарственное средство на основе акадезина при многократном введении крысам во всех исследованных дозах не вызывало изменений показателей периферической крови животных, морфологических изменений во всех изученных органах и тканях животных (кроме почек), функциональных изменений в состоянии печени, сердца, почек и желудочно-кишечного тракта. Однако морфологически выявлены изменения в почках при применении препарата в суммарной дозе 1150 мг/кг на 1-е и на 30-е сутки наблюдения, а в суммарной дозе 2300 мг/кг — только на 30-е сутки наблюдения.

Заключение. Выявленное токсическое действие лекарственного средства на основе акадезина на почки крыс является дозозависимым. При применении препарата в суммарной дозе 750 мг/кг, которая в 60 раз превышает однократную терапевтическую дозу для крыс (12,5 мг/кг), токсические проявления полностью отсутствовали в течение всего срока наблюдения. Это позволило рекомендовать лекарственное средство на основе акадезина для дальнейшего исследования.

Ключевые слова: лекарственное средство на основе акадезина, доклиническое исследование, токсичность, крысы

Для цитирования: Ермакова Н.П., Меркулова И.Б., Коняева О.И. и др. Доклиническое изучение субхронической токсичности лекарственного средства на основе акадезина на крысах. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):65–73.

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-65-73



PRECLINICAL STUDY OF SUBCHRONIC TOXICITY OF THE DRUG ON THE BASIS OF ACADÉSINE IN RATS

N.P. Ermakova¹, I.B. Merkulova¹, O.I. Konyaeva¹, V.A. Chaley¹, T.V. Abramova¹, V.M. Bukhman¹,
S.V. Yarotsky², K.V. Lobanov², N.Yu. Kulbacherskaya¹

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

²State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of the National Research Center
“Kurchatov Institute”; 1st Dorozhnyy proezd, Moscow 117545, Russia

Introduction. At the national medical research center of oncology N.N. Blokhin preclinical toxicological studies of a lyophilized dosage form of a drug based on acadésine, a new antitumor drug, were conducted.

The aim of the study to study the subchronic toxicity of the drug on the basis of acadésine in rats to evaluate its toxicity.

Materials and methods. The study was conducted on 40 noninbred male mongrel rats. The drug was administered intraperitoneal daily 15-fold in total doses of 750, 1150 and 2300 mg/kg. Clinical and laboratory tests were performed during the entire observation period (30 days). The pathomorphological study was performed on the 1st and 30th day of observation.

Results. It was found that the drug based on acadésine, when applied repeatedly to rats in all the studied doses, did not cause changes in the indicators of peripheral blood of animals, morphological changes in all the studied organs and tissues of animals (except the kidneys),

functional changes in the state of the liver, heart, kidneys and gastrointestinal tract. However, morphologically revealed changes in the kidneys when using the drug in the total dose of 1150 mg/kg on the 1st and 30th day of observation, and in the total dose of 2300 mg/kg only on the 30th day of observation.

Conclusion. The detected toxic effect of the drug based on acadesine on the kidneys of rats is dose-dependent. When using the drug in the course of the course at a total dose of 750 mg/kg, which is 60 times higher than the single therapeutic dose for rats (12.5 mg/kg), toxic manifestations were completely absent during the entire period of observation. This allowed us to recommend a drug based on acadesine for further research.

Key words: drug based on acadesine, preclinical study, toxicity, rats

For citation: Ermakova N.P., Merkulova I.B., Konyaeva O.I. et al. Preclinical study of subchronic toxicity of the drug on the basis of acadesine in rats. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):65–73. (In Russ.).

Введение

Создание новых противоопухолевых препаратов — одна из самых актуальных проблем в современной онкологии. В последнее время в клинической практике появились таргетные биотерапевтические препараты, направленные на определенные молекулярные мишени — моноклональные антитела, ингибиторы факторов роста, тирозинкиназ, протеинкиназ и других ферментов и белков, большинство которых не убивают злокачественные опухолевые клетки, а замедляют интенсивность их деления или повышают степень их дифференцировки. В результате перехода злокачественного образования в хроническую форму пациент может прожить еще несколько лет без снижения качества жизни.

Акадезин — противоопухолевый препарат, разработанный в Государственном научно-исследовательском институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов методом лабораторного получения субстанции на основе рекомбинантного штамма-продуцента — бактерий *Bacillus subtilis* (сенной палочки, обычной почвенной бактерии) [1]. Акадезин (АИКАР, 5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибофуранозид) давно известен биохимикам: это один из предшественников аденозина пуриновых нуклеотидов, из которых образуются нуклеиновые кислоты (аденозинтрифосфат и гуанозинтрифосфат) — универсальные энергетические носители в любой клетке организма [2]. В доклинических исследованиях было показано, что применение акадезина индуцирует неапоптотическую гибель опухолевых клеток, в том числе с фенотипом лекарственной устойчивости, обусловленной экспрессией Р-гликопротеина и инактивацией функции белка p53 [3]. Действие акадезина в первую очередь опосредовано селективной активацией 5'АМФ-активируемой протеинкиназы (activated protein kinase), клеточной протеинкиназы, контролирующей энергетический баланс внутри клетки. У акадезина отсутствуют побочные эффекты, поскольку он является естественным метаболитом.

Препарат вызывает большое внимание исследователей, так как он ограничивает пролиферацию опухолевых клеток, оказывает противолейкозное

действие при лечении острых и хронических лейкозов, нормализует обмен липидов и углеводов, кроме того, выявлено такое его свойство, как предупреждение сахарного диабета 2-го типа [4–9]. Все эти качества обусловили огромный интерес к дальнейшему изучению акадезина. Он важен для противоопухолевой терапии благодаря уникальному механизму действия: это соединение вызывает сложную гибель клеток с участием механизма некроза [10]. Лекарственное средство (ЛС) с противоопухолевой активностью на основе акадезина, получаемое путем микробиологического синтеза, — это новый антинеопластический препарат для терапии рефрактерной В-клеточной лейкемии, имеющей мишенью АМФ-зависимую протеинкиназу при минимальной токсичности для других клеток организма [11].

Изучение акадезина было проведено в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. В лаборатории разработки лекарственных форм создана парентеральная лекарственная форма «Акадезин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 300 мг» [12, 13]. Противоопухолевая активность ЛС на основе акадезина изучена в лаборатории экспериментальной химиотерапии [14, 15]. В лаборатории фармакологии и токсикологии проведено доклиническое токсикологическое исследование препарата, результаты которого частично представлены в данной статье.

Цель исследования — изучение на крысах субхронической токсичности ЛС на основе акадезина для оценки его токсического действия.

Задачи исследования — характеристика повреждающего действия препарата при его ежедневном в течение 15 дней внутрибрюшинном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, определение уровней токсических доз, исследование обратимости токсического действия.

Материалы и методы

Изучение проводили на крысах в соответствии с российскими и международными требованиями [16, 17].

Для данной работы было использовано 40 здоровых неинбредных беспородных крыс-самцов, полученных из разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Содержались животные в стандартных условиях вивария.

Препарат вводили животным внутрибрюшинно ежедневно в течение 15 дней в суммарных дозах, соответствующих 2 максимально переносимым дозам (2300 мг/кг), 1 максимально переносимой дозе (1150 мг/кг) и 1/2 максимально переносимой дозы (750 мг/кг). Рассчитывали дозы, основываясь на данных, полученных в результате изучения острой токсичности на крысах. Препарат — лиофилизированная форма ЛС на основе акадизина — содержит 300 мг активного вещества во флаконе. Для получения рекомендованной концентрации (37,5 мг/мл) содержимое флакона растворяли в 8,0 мл воды для инъекций. На основании показателя массы тела животного в соответствии с дозой рассчитывали объем вводимого раствора.

Изучали влияние препарата на периферическую кровь, функциональное состояние желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы.

У крыс определяли уровень эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина, лейкоцитов и лейкоцитарную формулу. Для этого из хвостовой вены самцов брали кровь в объеме 20 мкл в пробирки со специальным разбавителем и анализировали на автоматизированном гематологическом анализаторе МЕК-6450K (Nihon Konden, Япония). Сравнивали полученные результаты с данными контрольных животных и с фоновыми показателями. Исследования проводили на 3-и сутки (фон) и после последнего введения препарата на 3, 7, 14, 21 и 30-е сутки наблюдения. Биологический материал — кровь для биохимического исследования — брали на 1-е и 30-е сутки наблюдения. При биохимическом исследовании сыворотки крови животных определялись следующие показатели: аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза, креатинин, мочевины, общий билирубин, глюкоза, общий белок, альбумин. С помощью электрокардиографии оценивали функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. Электрокардиограмму у животных регистрировали за 3 дня (фон) до начала введения препарата и на 3, 15 и 30-е сутки после последнего введения. Для работы использовали электрокардиограф SCHILLER Cardiovit AT-1 (SCHILLER, Швейцария) при скорости протяжки ленты 50 мм/с. Анализ электрокардиограмм животных проводили в соответствии с общепринятыми методиками [17]. Животных выводили из эксперимента на 1-е и 30-е сутки наблюдения.

Для гистологического исследования брали участки головного мозга, сердца, легких, щитовидной железы, печени, поджелудочной железы, желудка, селезенки, лимфатических узлов брыжейки, тонкого и толстого кишечника, надпочечников, почек, мочевого пузыря,

тимуса, семенников, костного мозга (из бедренной кости). Материал подвергали общепринятой гистологической обработке [18]. Для работы использовали микроскоп Leica DM1000 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с программным обеспечением управления настройками и захвата изображения. Анализировали гистологические препараты и фотографировали при увеличении 100 и 400.

Методы статистической обработки данных. Полученные данные были обработаны статистически с помощью компьютерных программ Microsoft Office Excel и BioStat Professional. Достоверные различия принимали при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

По результатам проведенных исследований показано, что после ежедневного в течение 15 дней внутрибрюшинного введения ЛС на основе акадизина во всех изученных дозах не было отмечено изменений поведенческих реакций, внешних проявлений токсичности и гибели животных. У крыс сохранялись аппетит и двигательная активность. Не отмечали снижения массы тела животных при всех вводимых дозах по сравнению с контрольной группой на протяжении всего срока наблюдения (рис. 1).

Установлено, что исследуемый препарат после 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного применения не вызывал изменений показателей в периферической крови на всех сроках наблюдения во всех исследованных дозах. Не отмечено изменений и в лейкоцитарной формуле животных по сравнению с данными животных контрольной группы.

Установлено, что ЛС на основе акадизина не оказывало влияния на функции печени на всех сроках наблюдения во всех изученных дозах. Показатели уровней альбумина, общего белка, активности аспартатаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и лактатдегидрогеназы, а также

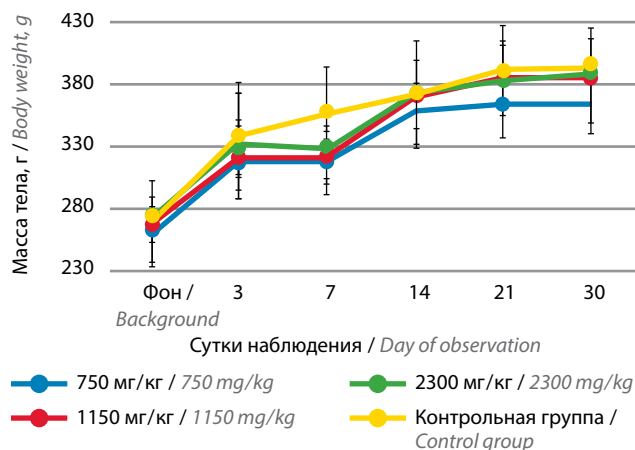


Рис. 1. Динамика массы тела крыс

Fig. 1. Dynamics of rat body weight

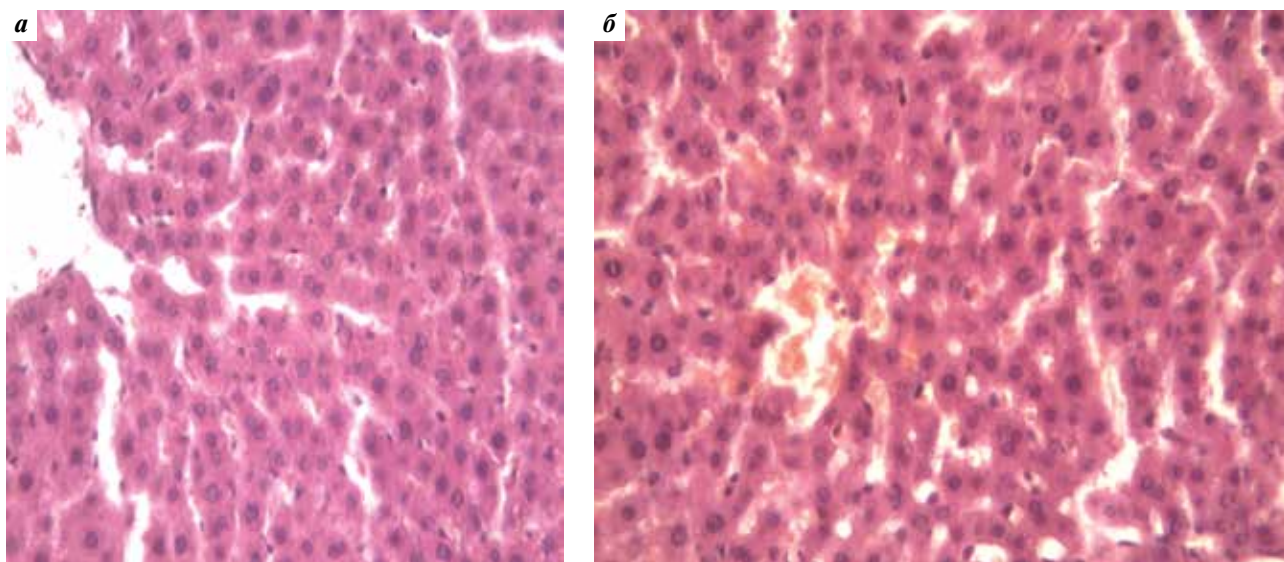


Рис. 2. Печень крыс (окраска гематоксилином и эозином): а — акадесин в суммарной дозе 2300 мг/кг, 1-е сутки наблюдения; морфологическая картина печени не нарушена; б — интактный контроль ($\times 400$)

Fig. 2. The liver of the rat (hematoxylin and eosin coloring): а — acadesin in a total dose of 2300 mg/kg, 1 day of observation; the morphological picture of the liver is not disturbed; б — intact control of ($\times 400$)

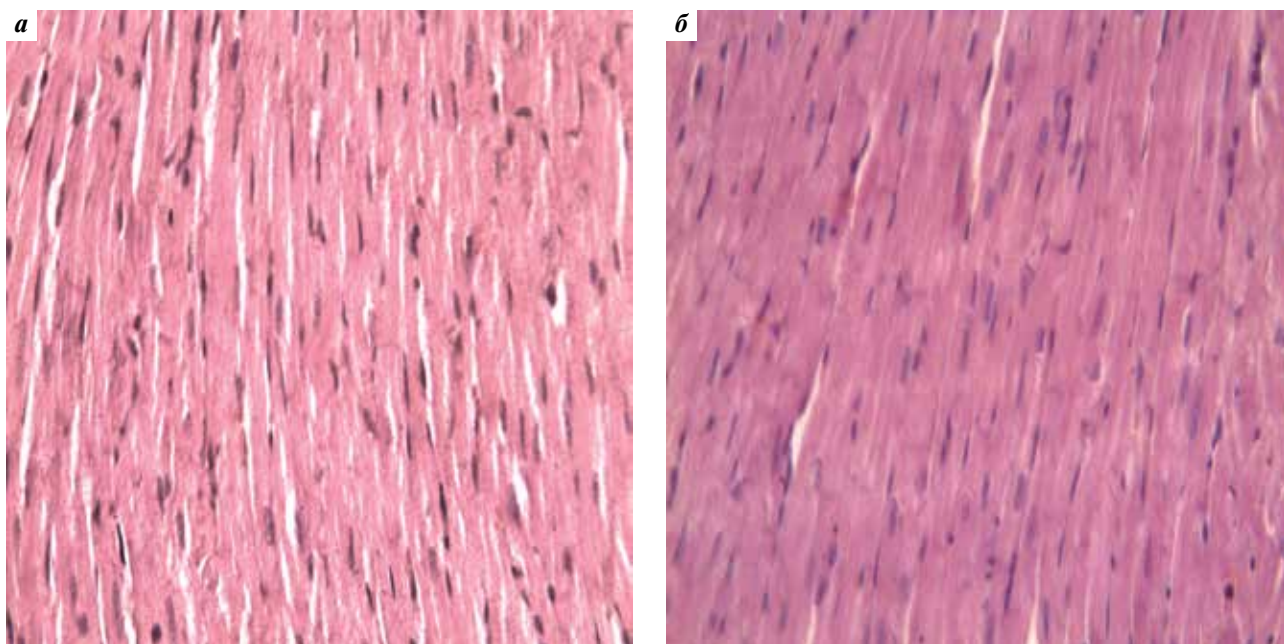


Рис. 3. Сердце (миокард) крысы (окраска гематоксилином и эозином): а — акадесин в суммарной дозе 2300 мг/кг, 1-е сутки наблюдения; структура мышечных волокон не нарушена; б — интактный контроль ($\times 400$)

Fig. 3. Heart (myocardium) of a rat (hematoxylin and eosin coloring): а — acadesin in a total dose of 2300 mg/kg, 1 day of observation; the structure of muscle fibers is not broken; б — intact control ($\times 400$)

уровень билирубина в сыворотке крови животных находились на уровне показателей контрольных животных и в пределах физиологической нормы для крыс.

Не обнаружено макроскопических и гистологических изменений в печени на 1-е и 30-е сутки наблюдения (рис. 2а). После применения препарата во всех изучаемых дозах морфологическая картина

печени крыс не отличалась от морфологической картины печени крыс контрольной группы (рис. 2б).

Исследование функций сердца не выявило количественных и качественных изменений показателей временных интервалов электрокардиограмм животных на всех сроках наблюдения. В сердце крыс не обнаружено патоморфологических изменений на 1-е

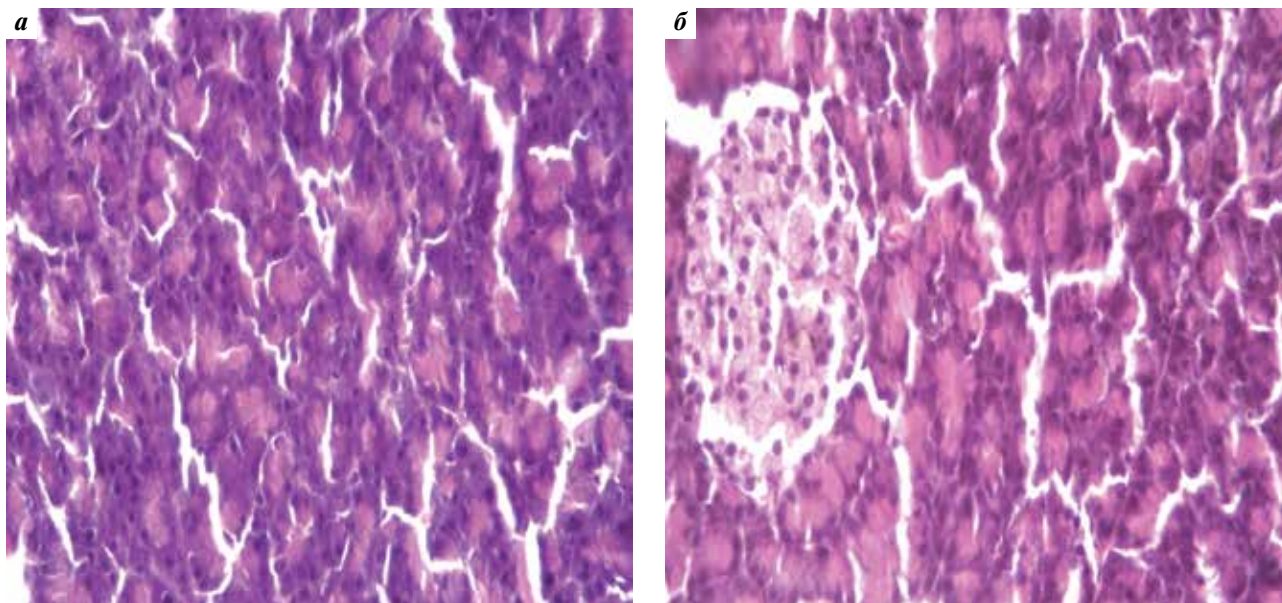


Рис. 4. Поджелудочная железа крысы (окраска гематоксилином и эозином): а — акадезин в суммарной дозе 2300 мг/кг, 1-е сутки наблюдения; морфологическая картина поджелудочной железы не нарушена; б — интактный контроль ($\times 400$)

Fig. 4. Pancreas of the rat (hematoxylin and eosin coloring): а — acadesin in a total dose of 2300 mg/kg, 1 day of observation; the morphological picture of the pancreas is not violated; б — intact control ($\times 400$)

и 30-е сутки наблюдения (рис. 3а). После применения препарата морфологическая картина миокарда крыс не отличалась от морфологической картины миокарда крыс контрольной группы (рис. 3б).

В поджелудочной железе не обнаружено макроскопических и гистологических изменений на 1-е и 30-е сутки наблюдения (рис. 4а). После применения препарата морфологическая картина поджелудочной железы крыс, получавших акадезин во всех изучаемых дозах, не отличалась от морфологической картины поджелудочной железы крыс контрольной группы (рис. 4б). Колебания уровня глюкозы в сыворотке крови находились в пределах физиологической нормы для данного вида животных.

Установлено, что ЛС на основе акадезина во всех изученных дозах не влияло на функциональное состояние почек: показатели уровней креатинина и мочевины в сыворотке крови животных не отличались от биохимических показателей крыс контрольной группы, статистической разницы не выявлено (см. таблицу). Препарат не оказывал влияния на суточный диурез и не вызывал изменений анализов мочи крыс.

Макроскопическое и гистологическое изучение внутренних органов крыс на 1-е и 30-е сутки после окончания 15-кратного ежедневного внутрибрюшинного применения ЛС на основе акадезина показало, что препарат во всех исследованных дозах не оказывает повреждающего действия на внутренние органы животных: головной мозг, сердце, легкие, печень, поджелудочную железу, мочевой пузырь, желудок, тонкий и толстый кишечник, лимфатические

узлы брыжейки, тимус, селезенку, костный мозг, семенники, надпочечники, щитовидную железу. Морфологическая картина в них соответствовала контрольной группе. Исключение составили только почки. На 1-е сутки после окончания применения акадезина в суммарной дозе 1150 мг/кг у некоторых крыс в почках были обнаружены очаги изменений в виде вакуольной дистрофии клеток эпителия отдельных извитых канальцев (рис. 5а) по сравнению с морфологической картиной почек контрольных крыс (рис. 5б).

На 30-е сутки после применения ЛС на основе акадезина в суммарной дозе 1150 мг/кг в почках крыс в единичных случаях сохраняются участки извитых канальцев с признаками вакуольной и зернистой дистрофии (рис. 6а). Кроме того, у некоторых крыс в корковом веществе обнаружены очажки воспалительной мононуклеарной инфильтрации и деструкции прилежащих клеток стенки извитых канальцев (рис. 6б) по сравнению с морфологической картиной почек контрольных крыс (рис. 6в).

Следует отметить, что на 1-е сутки после применения препарата в суммарной дозе 2300 мг/кг морфологические изменения в почках крыс были нечетко выражены. Эта независимость от дозы может быть связана с индивидуальной особенностью чувствительности каждого животного и вариабельностью частоты осложнений, которые могут не развиваться или развиваться в разные сроки после введения препарата. Однако на 30-е сутки после применения акадезина в этой же дозе в почках некоторых крыс были четко выражены морфологические изменения в виде

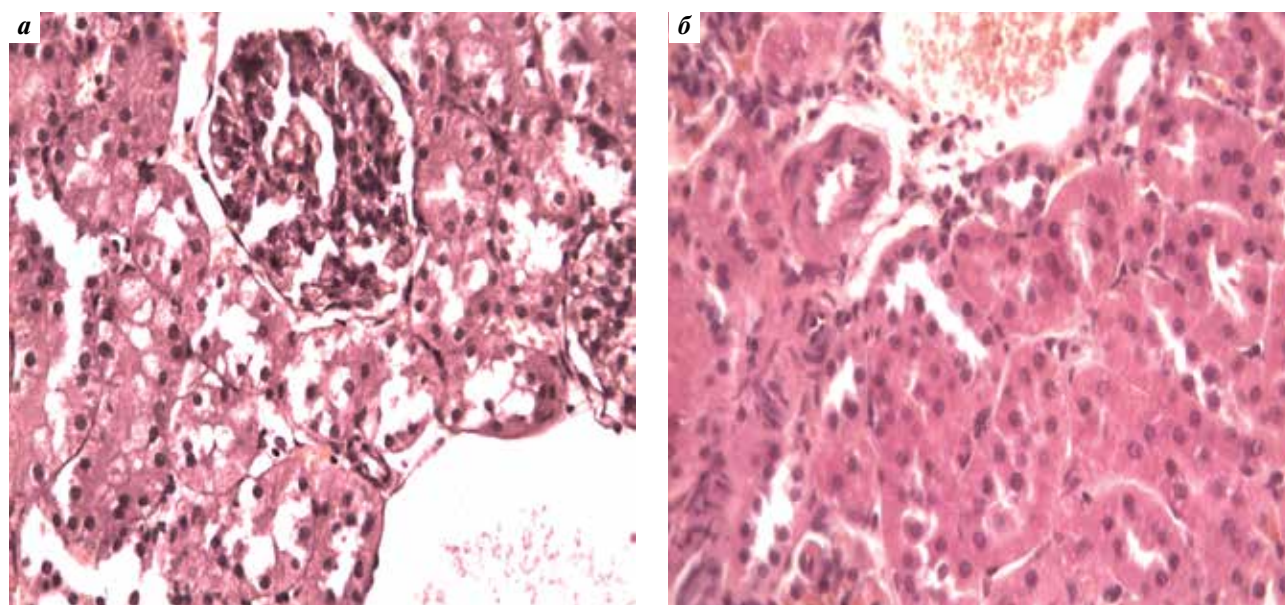


Рис. 5. Почка крысы (корковое вещество) (окраска гематоксилином и эозином): а — 1-е сутки после окончания применения акадесина в суммарной дозе 1150 мг/кг. Участок извитых канальцев с признаками вакуольной и зернистой дистрофии эпителиальных клеток; б — intact-контроль ($\times 400$)

Fig. 5. Rat kidney (cortical substance) (hematoxylin and eosin coloring): а — 1 day after the end of the use of acadesin in a total dose of 1150 mg/kg. Section of convoluted tubules with signs of vacuolar and granular dystrophy of epithelial cells; б — intact control ($\times 400$)

Биохимические показатели крови неинbredных крыс-самцов после 15-кратного внутрибрюшинного ежедневного введения формы лекарственного средства на основе акадесина

Biochemical blood parameters of non-harmless male rats after 15-fold intraperitoneal daily administration of the medicinal form of the drug based on acadesin

Доза разовая/суммарная, мг/кг Dose pink/total, mg/kg	Показатель Indicator	1-е сутки 1 st day	30-е сутки 30 st day
50/750	Мочевина, ммоль/л Urea, mmol/l	$7,9 \pm 1,1$	$8,3 \pm 1,1$
77/1150		$8,4 \pm 0,6$	$6,7 \pm 0,8$
153/2300		$8,7 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,8$
Контрольная группа Control group		$9,6 \pm 1,4$	$6,5 \pm 0,6$
50/750	Креатинин, ммоль/л Creatinine, mmol/l	$36,4 \pm 3,8$	$46,0 \pm 3,4$
77/1150		$37,0 \pm 3,9$	$41,2 \pm 3,0$
153/2300		$42,0 \pm 3,5$	$37,2 \pm 2,2$
Контрольная группа Control group		$37,2 \pm 2,2$	$42,2 \pm 2,9$

вакуольной и зернистой дистрофии некоторых извитых канальцев (рис. 6а).

Заключение

Согласно полученным результатам изменений показателей периферической крови животных, функциональных изменений в работе органов желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы,

печени, почек, поджелудочной железы не отмечено. Также не было выявлено морфологических изменений во всех изученных органах и тканях животных, кроме необратимых изменений почек у крыс, получивших высокие дозы препарата. Морфологически нефротоксичность была отмечена только у животных, получавших максимальные суммарные дозы препарата, превышающие 1-кратную терапевтическую дозу

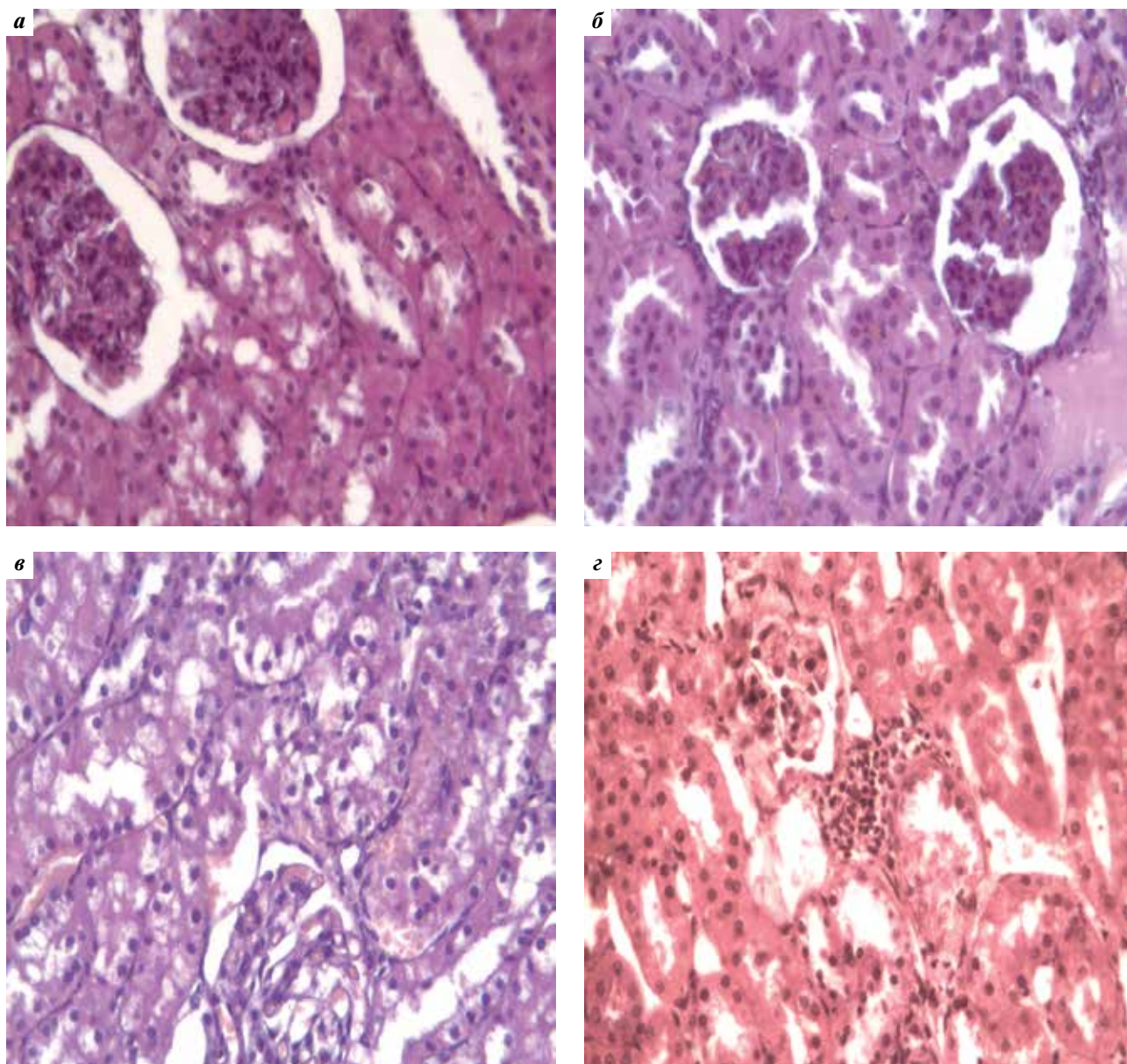


Рис. 6. Почка крысы (корковое вещество), 30-е сутки наблюдения (окраска гематоксилином и эозином): а — акадесин в дозе 1150 мг/кг — эпителиальные клетки извитых канальцев с признаками вакуольной и зернистой дистрофии; б — акадесин в дозе 1150 мг/кг — мононуклеарный инфильтрат рядом с сосудистым клубочком, дистрофические изменения прилежащих эпителиальных клеток извитых канальцев; в — акадесин в дозе 2300 мг/кг — участок извитых канальцев с признаками вакуольной и зернистой дистрофии эпителиальных клеток; г — интактный контроль ($\times 400$)

Fig. 6. Rat kidney (cortical substance) 30 days of observation (hematoxylin and eosin coloring): а — acadesine at a dose of 1150 mg/kg epithelial cells of the convoluted tubules with signs of vacuolar and granular dystrophy; б — acadesine at a dose of 1150 mg/kg — mononuclear infiltration near the vascular glomerulus, degenerative changes in adjacent epithelial cells of the convoluted tubules; в — acadesine at a dose of 2300 mg/kg — plot convoluted tubules with signs of vacuolar and granular dystrophy of epithelial cells; г — intact control ($\times 400$)

для крыс в 120 и 240 раз. Эти дозы были охарактеризованы как высокие токсические дозы, равные 2300 и 1150 мг/кг, вызывающие необратимые морфологические изменения в почках крыс.

Морфологически нефротоксичность не была определена у животных, получавших минимальную ис-

следуемую суммарную дозу препарата, которая была охарактеризована как высокая нетоксическая доза (750 мг/кг), в 60 раз превышающая 1-кратную терапевтическую дозу для крыс (12,5 мг/кг). Это позволило рекомендовать ЛС на основе акадесина для дальнейшего исследования.

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

1. Лобанов К.В., Эрраис Лопес Л., Королькова Н.В. и др. Реконструкция пуринового метаболизма у *Bacillus subtilis* с целью получения штамма-продуцента AICAR — нового препарата широкого терапевтического применения. *Acta Naturae* 2011;2(9):83–93. [Lobanov K.V., Arrais Lopez L., Korolkova N.V. et al. Reconstruction of purine metabolism in *Bacillus subtilis* with the aim of obtaining strain-producer of AICAR — a new drug of a wide therapeutic use. *Acta Naturae* 2011;2(9):83–93. (In Russ.)].
2. Северин Е.С., Алейникова Т.Л., Осипов Е.В., Силаева С.А. Биологическая химия. М.: Медицинское информационное агентство, 2008. С. 253–8. [Severin E.S., Aleynikova T.L., Osipov E.V., Silaeva S.A. *Biological Chemistry*. Moscow: Medical News Agency, 2008. Pp. 253–8. (In Russ.)].
3. Глазунова В.А., Лобанов К.В., Шакулов Р.С. и др. Акадесин вызывает неапоптотическую гибель опухолевых клеток. *Acta Naturae* 2013;5(3):78–82. DOI: 10.32607/20758251-2013-5-3-74-78. [Glazunova V.A., Lobanov K.V., Shakulov R.S. et al. Acadesine triggers non-apoptotic death in tumor cells. *Acta Naturae* 2013;5(3):78–82. (In Russ.)].
4. Swinnen J.V., Beckers A., Brusselmans K. et al. Mimicry of a cellular low energy status blocks tumor cell anabolism and suppresses the malignant phenotype. *Cancer Res* 2005;65(6):2441–8. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3025.
5. Sengupta T.K., Leclerc G.M., Hsieh-Kinzer T.T. Cytotoxic effect of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR) on childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells: implication for targeted therapy. *Mol Cancer* 2007;6(46):1–12. DOI: 10.1186/1476-4598-6-46.
6. Campás C.C., Lopez J.M., Santidrián A.F. et al. Acadesine activates AMPK and induces apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells but not in T-lymphocytes. *Blood* 2003;101:3674–80. DOI: 10.1182/blood-2002-07-2339.
7. Gaidhu M.P., Feduc S., Anthony N.M. et al. Prolonged AICAR-induced AMP-kinase activation promotes energy dissipation in white adipocytes: novel mechanisms integrating HSL and ATGL. *J Lipid Res* 2009;50:704–15. DOI: 10.1194/jlr.M800480-JLR200.
8. Rutter G.A., da Silva Xavier G., Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J* 2003;375(Pt. 1):1–16. DOI: 10.1042/BJ20030048.
9. Pold R., Jensen L.S., Jessen N. et al. Long-term AICAR administration and exercise prevents diabetes in ZDF rats. *Diabetes* 2005;54(4):928–34. DOI: 10.2337/diabetes.54.4.928.
10. Глазунова В.А., Миронов А.С., Шакулов Р.С. и др. АИКАР — противоопухолевый препарат широкого спектра действия. Тезисы. Онкологический журнал общественного объединения «Белорусское онкологическое общество» 2012;6:16. [Glazunova V.A., Mironov A.S., Shakulov R.S. et al. AICAR — antitumor drug of a wide spectrum of action. Abstracts. *Onkologicheskii zhurnal obshchestvennogo ob'yedineniya "Belorusskoye onkologicheskoye obshchestvo"* 2012;6:16. (In Russ.)].
11. Van Den Neste E., Cazin B., Janssens A. et al. Acadesine for patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): a multicenter phase I/II study. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013;71(3):581–91. DOI: 10.1007/s00280-012-2033-5.
12. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции из пуринового нуклеозида АКВ-12. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):33–9. [Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of technology for injectable dosage form based on the national substance of purine nucleoside AKV-12. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(3):33–9. (In Russ.)].
13. Игнатьева Е.В., Дмитричева Н.А., Ярцева И.В. Количественное определение пуринового нуклеозида АКВ-12 в моделях лекарственной формы. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):36. [Ignatyeva E.V., Dmitrieva N.A., Yartseva I.V. et al. Quantification of purine nucleoside AKV-12 in models of dosage forms. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(2):36. (In Russ.)].
14. Лобанов К.В., Шакуров Р.С., Глазунова В.А. и др. Биосинтетический акадесин — основа для создания перспективного противоопухолевого препарата. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):33. [Lobanov K.V., Shakurov R.S., Glazunova V.A. et al. Biosynthetic acadesine the basis for the creation of a promising anticancer drug. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2012;11(2):33. (In Russ.)].
15. Лобанов К.В., Шакуров Р.С., Яроцкий С.В. и др. Доклиническое изучение биосинтетического акадесина. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):54–4. [Lobanov K.V., Shakurov R.S., Yarotsky S.V. et al. Pre-clinical study of biosynthetic acadesine. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(2):54–4. (In Russ.)].
16. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. 2-е изд., доп. М.: МВД, 2008. 196 с. [Gus'kova T.A. *Toxicology of medicinal products*. Ed. 2nd, add. M.: MVD, 2008. 196 p. (In Russ.)].
17. Ермакова Н.П., Меркулова И.Б., Коняева О.И. и др. Влияние препарата ЛХС-1208 на сердечно-сосудистую систему. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(3):70–80. [Ermakova N.P., Merkulova I.B., Konyayeva O.I. et al. Influence of the drug LHS-1208 on the cardiovascular system. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(3):70–80. (In Russ.)].
18. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: Медицина, 1982. [Volkova O.V., Eletsky Yu.K. *Fundamental histology with histological technique*. Ed. 2nd, revision and add. Moscow: Medicine, 1982. (In Russ.)].

Вклад авторов

Н.П. Ермакова: получение данных для анализа, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;

В.А. Чалей, И.Б. Меркулова, Т.В. Абрамова: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

В. М. Бухман: анализ полученных данных;

С.В. Яроцкий, К.В. Лобанов: участие в окончательном утверждении версии, которая сдается в печать.

Contribution of authors

N.P. Ermakova: getting data for analysis, reviewing publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;

N.Yu. Kulbachevskaya, O.I. Konyaeva: development of the research design, analysis of the obtained data;

V.A. Chaley, I.B. Merkulova, T.V. Abramova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

V.M. Buchman: analysis of the received data;

S.V. Yarotsky, K.V. Lobanov: participated in the final approval of the version to be printed.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Б. Меркулова / I.B. Merkulova: <https://orcid.org/0000-0001-7461-3422>

О.И. Коняева / O.I. Konyaeva: <https://orcid.org/0000-0002-3814-5630>

В.А. Чалей / V.A. Chaley: <https://orcid.org/0000-0001-7867-2868>

В.М. Бухман / V.M. Bukhman: <https://orcid.org/0000-0002-7062-798X>

Н.Ю. Кульбачевская / N.Yu. Kulbachevskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4214-3475>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования № 10 (11.03.2013 г.) одобрен комитетом по биомедицинской этике Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Исследование проведено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study protocol № 10 (11.03 2013) was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 29.01.2020. Принята к публикации: 03.03.2020.

Article submitted: 29.01.2020. Accepted for publication: 03.03.2020.

Информация для авторов

При направлении статьи в редакцию журнала «Российский биотерапевтический журнал» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

Редакция просит авторов в подготовке рукописей руководствоваться изложенными ниже правилами. Рукописи, оформленные без соблюдения данных правил, редакцией рассматриваться не будут.

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором выполнена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

Присланные статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат» и принимаются в случае удовлетворительного результата (определяемого для каждой из статей в индивидуальном порядке по соотношению оригинальных фрагментов текста, заимствованных фрагментов и наличия оформленных ссылок).

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- 1) название статьи прописными буквами (шрифт **жирный**);
- 2) инициалы и фамилии всех авторов (шрифт **обычный**);
- 3) место работы каждого из авторов, адрес учреждения с указанием индекса (шрифт *курсив*);
- 4) ORCID авторов;
- 5) адрес электронной почты ответственного за связь автора (шрифт *курсив*).

Данные, указанные в пунктах 1–3, должны быть предоставлены на русском и английском языках.

Пример:

ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

И.И. Иванов¹, П.П. Петров²

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

²ФГБУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Контакты: Иван Иванович Иванов chem_analysis@rnc.ru

THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEUTIC JOURNAL»

I.I. Ivanov¹, P.P. Petrov²

¹N.N. Blokhin NMRCO; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115478, Russia;

²FSBSI "G.F. Gauze Research Institute of search for new antibiotics"; 11 Bolshaya Pirogovskaya St, Moscow, 119435, Russia

Последняя страница должна содержать:

- 1) Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью;
 - занимаемая должность;
 - ученая степень, ученое звание;
 - контактный телефон;
 - рабочий адрес с указанием индекса;
 - адрес электронной почты.

2) Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт — Times New Roman, размер 12, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы.

Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам)

Обзор литературы — не более 15 страниц;

оригинальная статья — не более 12 страниц;

краткие сообщения — не более 4 страниц.

Большой объем статьи допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции.

5. Резюме и ключевые слова

Ко всем видам статей на второй странице должно быть приложено резюме на русском и английском языках. Слова «резюме» и «abstract» не указываются. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики. Для оригинальных статей резюме обязательно должно содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы).
- цель;
- результаты;

Объем резюме — 200–250 слов. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются **ключевые слова** на русском и английском языке в количестве 3–10.

6. Структура статей

Оригинальная статья и краткое сообщение экспериментального или клинического характера должны содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы);
- при наличии финансирования исследования указать его источник (грант и т.д.).
- благодарности (раздел не является обязательным).
- цель;
- результаты и обсуждение;
- конфликт интересов;

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера должны включать следующие разделы:

- введение;
- разделы по отдельным обсуждаемым вопросам;
- заключение (выводы).

Введение. Краткий обзор состояния вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации, при этом необходимости проведения исследования.

Цель. 1–3 предложения о том, какую проблему или гипотезу решает автор и с какой целью.

Материалы и методы. Подробное изложение методик исследования, аппаратуры, критериев отбора участников, их число и характеристики, способы и принципы распределения на группы, дизайн исследования, методы статистического анализа. Описанные методы исследования должны гарантировать возможность воспроизведения результатов. При перечислении использованной аппаратуры и препаратов в скобках указываются производитель и страна; при перечислении используемых в ходе работы лекарственных препаратов и химических веществ — их международное непатентованное (общепринятое) название, дозы, пути введения.

В конце статьи о проведенном исследовании указать, решением какого этического комитета оно одобрено, номер и дату протокола исследования, а также факт подписания испытуемыми информированного согласия.

Результаты. Должны быть представлены в логической последовательности, отражать данные описанного выше исследования с указаниями на графики, таблицы и рисунки. Допускается сопоставление полученных результатов с данными других исследователей. Возможен включение обоснованных рекомендаций для клинической практики и применения полученных данных в предстоящих исследованиях. Следует избегать повторения сведений из раздела «Введение». Результаты представляются четко, в виде коротких описаний.

Заключение. Должно быть кратким и лаконичным. Подведение итога проделанной работы и гипотеза авторов о значении полученных данных — в рамках патогенеза, лечения, диагностики; перспективы использования полученных данных.

7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например: (табл. 1), (рис. 1) или на рис. 1 представлены. . . , которые должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Схемы, графики, диаграммы, таблицы могут быть собраны в общие файлы по типу иллюстративного материала с началом каждого с новой страницы. Например: все таблицы собраны в отдельный от статьи файл, где каждая новая таблица начинается с новой страницы. Если в этой же статье есть диаграммы, то они будут составлять следующий файл, где будут собраны исключительно диаграммы, и каждая из них будет размещена на отдельном листе документа. Файлы иллюстративного материала должны позволять воспроизвести высокое качество изображения в электронной и печатной версии журнала. Если иллюстративный материал ранее был опубликован в других изданиях, автор обязан предоставить в редакцию разрешение правообладателя на публикацию данного изображения в другом журнале, в противном случае это будет считаться плагиатом и к публикации принято не будет. Количество иллюстраций должно соответствовать объему предоставляемой информации, избыточность иллюстраций может привести к возвращению авторам статьи для доработки на предмет сокращения. Данные таблицы не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в формате TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм). Глаза пациентов или здоровых испытуемых на фотографиях должны быть закрыты черным прямоугольником, в случае его отсутствия автор должен предоставить в редакцию письменное разрешение пациента на публикацию.

Рисунки, графики, схемы, диаграммы представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel. При невозможности представления в данном формате необходимо связаться с редакцией.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита — «а», «б» и т.д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т.д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписном подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Названия рисунков должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Необходимо указывать применявшийся для анализа статистический метод и соответствующее значение достоверности (р). В случае размера таблиц больше, чем на лист А4, они представляются в виде отдельного файла doc, docx, rtf.

Названия таблиц должны быть переведены на английский язык.

Все **формулы** должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Использованные автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ). Если исследование проводилось на приборах, дающих показатели в других единицах, необходимо перевести их в систему СИ с указанием коэффициента пересчета или компьютерной программы в разделе «Материалы и методы».

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, рак предстательной железы (РПЖ)). Список использованных сокращений приводится после списка литературы. Не следует параллельно использовать термин и его сокращение.

Название генов пишется курсивом, название белков — обычным шрифтом.

9. Список литературы

Не менее 50 процентов источников из списка литературы должны быть опубликованы за последние 5 лет, в том числе в журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science*, *Scopus*, *Science Index*.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по мере цитирования в тексте статьи, но не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например: [5], [7, 8], [7–9]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 25 источников, в обзорах литературы — не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они упомянуты. Ссылки на неопубликованные работы, учебники, учебные пособия, нормативные и архивные материалы, статистические сборники, ГОСТы, распоряжения, анонимные источники, публикации в СМИ, монографии, авторефераты и диссертации и т.д. не допускаются.

В цитируемой литературе нужно указывать источники с DOI (Digital Object Identifier, подробнее на сайте www.crossref.org) при наличии и PMID (PubMed identifier, подробнее на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ссылки на источники литературы должны быть оформлены следующим образом: для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

Для каждого русскоязычного источника должен приводиться перевод на английский язык (можно проверить на сайте elibrary.ru). При отсутствии перевода основных сведений в первоисточнике необходима транслитерация ссылки на английский язык (рекомендуем обращаться на сайт translit.net (стандарт транслитерации – BSL)).

Статья в журнале

Фамилия И.О. авторов. Название статьи. Название журнала год: том (номер выпуска): страницы (повторяющиеся цифры страниц не указывать, например: 185–7).

Примеры:

Srigley J.R., Delahunt B., Eble J.N. et al. The International society of urological pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2013;37 (10):1469–89. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318299fd1.

Михайленко Б.С., Алексеев Б.Я., Ефремов Г.Д., Каприн А.Д. Генетические особенности несветлоклеточного рака почки. *Онкоурология* 2016;12(3):14–21. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-14-21. [Mikhaylenko B.S., Alekseev B.Y., Efremov G.D., Kaprin A.D. Genetic characteristics of the non-clear cell renal cancer. *Cancer Urology* 2016;12 (3):14–21. (In Russ.).]

Монографии, сборники тезисов

Фамилия И.О. авторов. Полное название книги. Место издания: название издательства; год издания; номера страниц или общее количество страниц.

Примеры:

Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Калинин С.А. Лечение гормонорезистентного рака предстательной железы. В кн.: Материалы конференции «Онкологическая урология: от научных исследований к клинической практике (современные возможности лечения опухолей предстательной железы, мочевого пузыря и почки)». М., 2004. С. 28–31. [Matveev B.P., Buharkin B.V., Kalinin S.A. Treatment of the hormone resistant prostate cancer. In the book: Materials of the conference «Oncologic urology: from scientific studies to clinical practice (modern opportunities for the treatment of prostate, bladder and kidney tumors). Moscow, 2004. P. 28–31. (In Russ.).]

Каприн А.Д., Нестеров П.В., Костин А.А. и др. Особенности хирургического этапа лечения пациентов, страдающих раком мочевого пузыря с синдромом нижних мочевых путей. Материалы I конгресса Рос. общества онкоурологов: тез. докл. М., 2006. С. 87–88. [Kaprin A.D., Nesterov P.V., Kostin A.A. et al. Peculiarities of the surgical stage of the treatment of patients with bladder cancer with the syndrome of lower urinary tracts. Materials of the I congress of the Russian Oncourologists Society: report abstract. Moscow, 2006. P. 87–88. (In Russ.).]

Патенты

Фамилия И.О. изобретателя, заявителя, патентовладельца. Название изобретения. Обозначение вида документа, название страны, номер, дата публикации (регистрационный номер заявки, дата подачи).

Пример:

Колс Ян. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей. Патент США №5093330 от 03.03.1992 г. [Kols Jan (BE) Administration of Midostaurin for treating gastrointestinal stromal tumours. RU2410098C2. (In Russ.).]

При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

10. Этические вопросы

• Авторство

Право называться автором имеют лица, которые:

- 1) внесли значительный вклад в концепцию и дизайн исследования или в анализ и интерпретацию данных;
- 2) активно участвовали в подготовке текста статьи или внесении принципиальных изменений;
- 3) участвовали в окончательном утверждении версии, которая сдается в печать;
- 4) готовы принять на себя ответственность за содержание статьи.

Исключительно обеспечение финансирования или подбор материала для статьи не оправдывает включения в состав авторской группы. Общее руководство исследовательским коллективом также не признается достаточным для авторства.

Редакторы вправе запросить информацию о вкладе каждого из авторов в написание статьи и опубликовать ее.

Возможные варианты участия авторов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи и др.

Пример:

А.М. Иванов: разработка дизайна исследования;

В.С. Петров, Г.П. Сидоров: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

М.М. Иванова: написание текста рукописи;

О.Д. Сидорова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, не оказавшие помощь в проведении исследования по сбору, анализу и интерпретации данных, предоставлению материалов и инструментов, должны быть перечислены с их согласия в разделе «Благодарности».

• Конфликт интересов

В конце статьи необходимо указать наличие конфликта интересов для всех авторов. Конфликт интересов подразумевает наличие каких-либо связей и/или личной заинтересованности, которые потенциально могут повлиять на результаты, интерпретацию полученных данных, объективное их восприятие, в частности финансовые отношения и сотрудничество с какими-либо организациями (например, получение гонораров, образовательных грантов, участие в экспертных советах, членство, трудовые отношения, консультационная работа, владение магазином в частной собственности или другие интересы) или нефинансовая заинтересованность (например, личные или профессиональные взаимоотношения, знакомства и пр.), касающиеся рассматриваемых в статье вопросов и/или материалов.

В случае отсутствия конфликта интересов в конце статьи следует констатировать следующее:

Для статьи 1 автора/2 и более авторов

Конфликт интересов. Автор/авторы заявляет/заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author/authors declares/declare no conflict of interest.

• Источник финансирования

Информация о наличии или отсутствии финансирования указывается для всех статей. Пример оформления для статьи с авторским исследованием:

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке <...>.

Статьи, в которых содержится информация, не касающаяся непосредственно исследования, оформляются следующим образом:

Финансирование. Работа выполнена при поддержке <...>.

• Информированное согласие пациентов

Данный раздел необходим при публикации статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев. Авторы должны предоставить в редакцию письменное информированное согласие больного на распространение информации и сообщить об этом в статье:

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

• Соблюдение прав животных при проведении исследования

Пример оформления раздела:

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.

При несоответствии рукописи перечисленным требованиям, в рассмотрении статьи авторам будет отказано.

Общие положения

• Оплата публикации

Все статьи принимаются к печати бесплатно.

• Авторские права

Авторы, публикующие статьи в данном журнале, соглашаются на следующее:

Авторы сохраняют за собой авторские права и предоставляют журналу право первой публикации работы, которая по истечении 6 месяцев после публикации автоматически лицензируется на условиях Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

Авторы имеют право размещать свою работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или на персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

• Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.

Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной. Корреспонденция с рецензентом ведётся через ответственного секретаря. После окончательного решения о принятии или отклонении работы все авторы получают электронное информационное письмо с уведомлением о прочтении.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

При обнаружении автором ошибок в статье до момента публикации или в случае, когда редактор сообщает автору, что получил сведения от третьей стороны о существенных ошибках в статье, автор обязан взаимодействовать с редактором журнала с целью скорейшего изъятия статьи из вёрстки и ее исправления.

Если ошибки обнаружены после выхода номера журнала, автор также обязан взаимодействовать с редактором и следовать его инструкциям по решению данного вопроса в индивидуальном порядке.

Авторы могут присылать свои материалы по электронной почте на адреса:

biotherapy_rbj@mail.ru или **rbjournal@ronc.ru**

Также статью можно подать через редакционную систему на сайте журнала.

11. Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. Эта статья ранее не была опубликована, а также не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале (или дано объяснение этого в Комментариях для редактора).

2. Файл отправляемой статьи представлен в формате документа OpenOffice, Microsoft Word, RTF или WordPerfect.

3. Приведены полные интернет-адреса (URL) для ссылок там, где это возможно.

4. Текст набран с полуторным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 12 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание (за исключением интернет-адресов).

5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Руководстве для авторов, расположенном на странице «о журнале».

6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то выполнены требования документа Обеспечение слепого рецензирования.

