

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2020 • том 19 • № 3

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

3

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

3 ^{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. № 3. 1–68.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2020
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» – 81679.
Отпечатано в типографии
ООО «Буки Веди».
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

3 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 "Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal".

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal. 2020. Volume 19. No 3. 1–68.

© PH "ABV-Press", 2020
Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Buki Vedi LLC.
1,000 copies
<https://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/>
<https://bioterapevt.elpub.ru>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Г.М. Волгарева

**Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы.
Часть 3. Три уровня профилактики и контроля рака шейки матки 6**

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

Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (часть 2) 12

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

Особенности технологии производства лекарственных жевательных резинок 21

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*С.В. Чулкова, Н.Н. Тупицын, Т.М. Джуманазаров, А.Д. Палладина, Н.А. Купрышина,
О.А. Чернышева, А.К. Аллахвердиев, О.П. Колбацкая, П.В. Кононец*

**Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге
больных немелкоклеточным раком легкого 29**

Т.А. Сидорова, Э.Ш. Соломко, Ю.А. Хоченкова, А.А. Прокофьева, Д.А. Хоченков

**Значение базальной экспрессии гемоксигеназы-1 для чувствительности
клеток меланомы человека к окислительному стрессу *in vitro*. 38**

О.И. Кит, С.Ю. Филиппова, А.О. Ситковская, В.В. Позднякова, О.В. Хохлова

**Влияние способа стерилизации на пролиферацию и жизнеспособность инкапсулированных
в альгинатный гель клеток культуры MOLT-4 46**

*А.А. Башарина, Т.А. Богуш, Е.А. Рукавишников, Е.А. Богуш, С.А. Калужный,
Н.О. Вихлянцева, В.С. Косоруков*

**Сходимость и временная стабильность количественной оценки экспрессии
белка β III-тубулина в ткани солидных опухолей 52**

И.Д. Трещалин, В.А. Голибродо, М.И. Трещалин, А.Н. Тевяшова, Э.Р. Переверзева

Доклиническое изучение токсичности нового противогрибкового препарата амфамид 57

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

А.В. Пономарев, В.А. Мисюрин, М.А. Барышникова

**Влияние концентрации антител HLA-DR на оценку количества CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток
в крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом 65**

REVIEWS

G.M. Volgareva

Papillomaviral carcinogenesis. significant achievements and specific challenges.

Part 3. Three levels of cervical cancer prevention and control 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 2) 12

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

Special aspects of the technology of medicated chewing gum production 21

ORIGINAL REPORTS

*S.V. Chulkova, N.N. Tupitsyn, T.M. Djumanazarov, A.D. Palladina, N.A. Kupryshina,
O.A. Chernysheva, A.K. Allakhverdiev, O.P. Kolbatskaya, P.V. Kononetz*

**Detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients
with non-small cell lung cancer 29**

T.A. Sidorova, E.Sh. Solomko, Yu.A. Khochenkova, A.A. Prokofieva, D.A. Khochenkov

**The value of basal expression level of hemoxygenase-1 for sensitivity of human melanoma
cells to oxidative stress *in vitro*. 38**

O.I. Kit, S.Yu. Filippova, A.O. Sitkovskaya, V.V. Pozdnyakova, O.V. Khokhlova

**Influence of the sterilization method on the proliferation and viability of MOLT-4 cells
encapsulated in alginate gel 46**

*A.A. Basharina, T.A. Bogush, E.A. Rukavishnikova, E.A. Bogush, S.A. Kaliuzhny,
N.O. Vikhlyantseva, V.S. Kosorukov*

**The intra-assay precision and time stability of quantitative β III-tubulin expression asseesment
in solid tumor tissue 52**

I.D. Treschalin, V.A. Golibrodo, M.I. Treschalin, A.N. Tevyashova, E.R. Pereverzeva

Preclinical toxicity study of the new antifungal drug amphotericin 57

BRIEF REPORT

A.V. Ponomarev, V.A. Misyurin, M.A. Baryshnikova

**Effect of HLA-DR antibody concentration on estimation of the number of CD14⁺HLA-DR^{low/-}-cells
in the blood of patients with b-cell chronic lymphocytic leukemia 65**

ПАПИЛЛОМАВИРУСНЫЙ КАНЦЕРОГЕНЕЗ. ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И НЕКОТОРЫЕ ПРОБЛЕМЫ. ЧАСТЬ 3. ТРИ УРОВНЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ РАКА ШЕЙКИ МАТКИ*

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

Для предупреждения рака шейки матки, распространенного онкологического заболевания женщин, вызываемого онкогенными вирусами папилломы человека, созданы эффективные профилактические вакцины. Всемирная организация здравоохранения разработала программу борьбы с этим заболеванием, включающую профилактические прививки подростков, скрининг предраковых нарушений эпителия шейки матки, а также лечение опухоли, если она возникла. Совершенствуется диагностика рака шейки матки, ведется разработка терапевтических вакцин против вируса папилломы человека. В обзоре рассмотрены основные успехи в области предупреждения рака шейки матки, а также ряд нерешенных проблем.

Ключевые слова: рак шейки матки, предупреждение, диагностика, терапевтические вакцины

Для цитирования: Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 3. Три уровня профилактики и лечения рака шейки матки. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):6–11.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-6-11



PAPILLOMAVIRAL CARCINOGENESIS. SIGNIFICANT ACHIEVEMENTS AND SPECIFIC CHALLENGES. PART 3. THREE LEVELS OF CERVICAL CANCER PREVENTION AND TREATMENT*

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

Efficient prophylactic vaccines have been developed to prevent cervical cancer, a frequent female oncological disease caused by carcinogenic human papillomaviruses. World Health Organization worked out the program for prophylaxis of cervical cancer and control of the disease. It includes preventive adolescent vaccinations, screening of precancerous cervical lesions in women as well as cervical cancer treatment if originated. Cervical cancer diagnostics is being improved, development of therapeutic human papillomaviruses vaccines is in progress. The review deals with major achievements and certain challenges in the field of cervical cancer prevention.

Key words: cervical cancer, prevention, diagnostics, therapeutic vaccines

For citation: Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Significant achievements and specific challenges. Part 3. Three levels of cervical cancer prevention and treatment. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):6–11. (In Russ.).

*Часть 1 см.: 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.

Часть 2 см.: 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.

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

Part 2 see: Volgareva G.M. Papillomaviral carcinogenesis. Major achievements and certain challenges. Part 2. HPV-associated cancers in Russia. Preventive HPV vaccines. Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):31–8.

Три рубежа борьбы с раком шейки матки

Рак шейки матки (РШМ) — предотвратимое заболевание, однако это одна из основных причин смерти женщин от злокачественных новообразований в мире.

Подавляющее большинство женщин и мужчин, заражаясь при половых контактах онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ), в дальнейшем избавляются от этой инфекции. У некоторых из зараженных женщин предраковые повреждения эпителия шейки матки и РШМ развиваются на фоне хронической инфекции онкогенными ВПЧ, одним или одновременно несколькими типами этих вирусов. Латентный период между заражением вирусом и выявлением раковой опухоли может длиться 10–20 лет и более [1].

Полная программа предупреждения РШМ и контроля за заболеваемостью данной формой рака и смертностью от него, согласно рекомендации Всемирной организации здравоохранения, включает действия на 3 рубежах:

- первичная профилактика (вакцинация подростков в возрасте 9–13 лет до начала половой жизни);
- вторичная профилактика (доступность скрининга и лечение в случае, если выявлен предрак шейки матки);
- лечение РШМ (хирургическое вмешательство, химиотерапия, лучевая терапия), а также оказание паллиативной помощи больным [2].

Введение девочкам до полового дебюта одной из 3 доступных на сегодня профилактических вакцин не защищает их от последующего инфицирования абсолютно всеми типами онкогенных ВПЧ. Вакцинации молодых женщин, практикуемые во многих странах и предупреждающие новые случаи заражения, не излечивают от уже возможно имеющейся у этих женщин ВПЧ-инфекции. В связи с этим провакцинированные девочки и женщины в дальнейшем наряду с невакцинированными должны проходить скрининг дисплазий и РШМ.

Скрининг включает визуальный осмотр, цитологический мазок и ВПЧ-тестирование. В случае положительного результата скрининга пациентке должно быть оказано лечение (электрическая, лазерная, радиоволновая или криохирургия).

В России в соответствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 1 ноября 2012 г. № 572н «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология» (за исключением использования вспомогательных репродуктивных технологий)» женщинам 1-й и 2-й групп здоровья (практически здоровые женщины, не нуждающиеся в диспансерном наблюдении, и женщины с риском возникновения патологии репродуктивной системы) рекомендуются профилактические осмотры 1 раз в год. В соответ-

ствии с приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 3 февраля 2015 г. № 36ан «Об утверждении порядка проведения диспансеризации определенных групп взрослого населения» проведение цитологического исследования мазка шейки матки и цервикального канала рекомендуется с частотой 1 раз в 3 года пациенткам с 21 года до 69 лет.

Кроме этого, рекомендуется придерживаться следующего подхода к цервикальному скринингу:

- 21 год — начало скрининга;
- 21–29 лет — проведение цитологии не реже 1 раза в 3 года;
- 30–69 лет — анализ на цитологию и ВПЧ не реже 1 раза в 5 лет;
- 69 лет — конец скрининга (при условии предыдущего адекватного скрининга и при отсутствии в течение 20 лет умеренных дисплазий, CIN II).

Отечественная программа профилактики РШМ изложена в письме Министерства здравоохранения Российской Федерации от 2 ноября 2017 г. № 15–4/10/2–7676 о направлении клинических рекомендаций (протокола лечения) «Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака» [3]. Ознакомиться с его полным содержанием можно по адресу: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71716538/>.

Клеточный белок p16^{INK4a} как суррогатный маркер рака шейки матки

Наметившаяся в последние десятилетия в развитых странах тенденция к снижению показателей заболеваемости РШМ и смертности от него обусловлена главным образом проведением в этих странах массового скрининга, позволяющего диагностировать ранние формы рака и предрака.

Основным скрининговым тестом в этом случае остается применяемый уже более 70 лет цитологический мазок, предложенный G.N. Papanicolaou [4] и известный как Пап-тест. Цитологическое исследование сегодня используется и при оценке эффективности профилактических ВПЧ-вакцинаций [5, 6]. Однако иногда этот тест дает как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. В 1-м случае это влечет за собой необоснованное хирургическое вмешательство, психоэмоциональные стрессы для пациенток и неоправданные экономические затраты, во 2-м — запоздалое выявление опухоли, хуже поддающейся лечению. Более трудоемкое, чем приготовление и анализ цитологического мазка, гистологическое исследование (диагностическая биопсия) эффективно тоже не в 100 % случаев, поскольку по объективным причинам заключения нескольких гистологов, анализирующих один и тот же материал, иногда не совпадают [7].

В этих условиях оказалась актуальной разработка дополнительных тестов для диагностики РШМ с определением места этих тестов в системе уже имеющихся. Внимание нескольких групп исследователей, в том числе и наше, в качестве потенциального маркера неопластических изменений в клетках эпителия шейки матки привлек белок p16^{INK4a} [8–10], ингибитор циклинзависимых киназ CDK4/6, кодируемый геном-супрессором опухолевого роста *CDKN2A* [11]. Этот ген — один из главных элементов регуляторного пути *CDK-RB-E2F*: связываясь с CDK4/6, его белковый продукт p16^{INK4a} препятствует фосфорилированию белка pRB, последний продолжает связывать транскрипционные факторы E2F, и клетка задерживается на стадии G1, не переходя в S-фазу. *CDKN2A* в опухолях различных локализаций подвергается гомозиготным делециям, инактивируется вследствие точковых мутаций, гиперметилирования, при этом белок p16^{INK4a} не экспрессируется [12]. Особенность РШМ состоит в том, что онкобелок E7 ВПЧ типов высокого риска инактивирует белок pRB [13]. Регуляторный путь *CDK-RB-E2F* оказывается выведенным из строя, а статус гена-супрессора *CDKN2A* и его белкового продукта становится неважен клетке, поскольку их функция осуществлялась выше в цепи передачи сигнала от произошедшей поломки, и вне зависимости от их статуса клетка с инактивированным pRB беспрепятственно минует контрольную точку клеточного цикла G1/S. Функционально активный pRB оказывает негативное воздействие на экспрессию *CDKN2A* на уровне транскрипции [14].

Иммуногистохимическое (иммуноцитохимическое) исследование экспрессии белка p16^{INK4a} оказалось перспективным дополнительным методом ранней диагностики диспластических и неопластических

изменений в эпителии шейки матки, позволяющим уменьшить долю ложноотрицательных результатов традиционного Пап-теста [7–10].

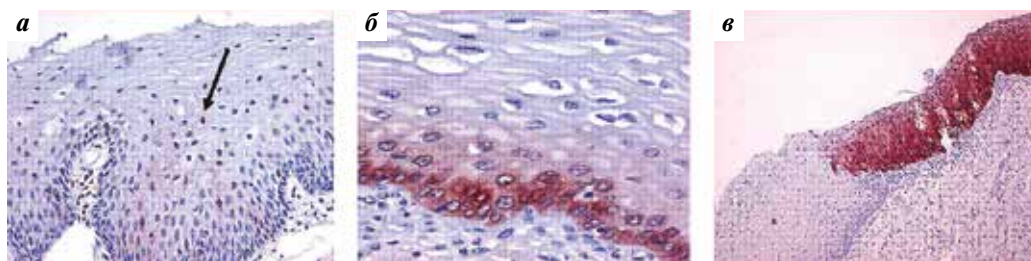
На рисунке представлены результаты детекции клеточного белка p16^{INK4a} в дисплазиях шейки матки в иммуногистохимическом тесте.

В настоящее время этот тест успешно используется для уточнения диагноза и тактики лечения у женщин с подтвержденной инфекцией цервикального эпителия онкогенными ВПЧ и аномальными клетками в цитологическом мазке [15–17].

О разработке терапевтических вакцин

Предсуществовавшая в организме на момент введения профилактической вакцины ВПЧ-инфекция не излечивается с помощью этой процедуры, поскольку в зараженной клетке базального эпителия структурный белок вируса L1, мишень нейтрализующих антител, не экспрессируется. Для индивидумов, уже инфицированных ВПЧ, профилактическая вакцина окажется полезной только в плане защиты от повторных заражений (см. «О вакцинациях «вдогонку» [18]), но не для удаления клеток, несущих геном вируса.

Создание терапевтических ВПЧ-вакцин — крайне актуальная задача в первую очередь для стран с невысоким уровнем экономического развития, где не проводится или проводится с недостаточным охватом населения профилактическая ВПЧ-вакцинация, отсутствует скрининг предраковых дисплазий шейки матки у женщин и где ВПЧ-инфекция нередко проявляется лишь в виде раковой опухоли. Разработка таких препаратов ведется, некоторые из них проходят клинические испытания. Однако на сегодня ни один из этих препаратов в практику пока не внедрен.



Выявление клеточного белка p16^{INK4a} в дисплазиях шейки матки в иммуногистохимическом тесте: а — экспрессия вирусных генов в CIN I ограничена только дифференцированными клетками, в базальном и парабазальном слоях гиперэкспрессии p16^{INK4a} не наблюдается, в этом повреждении продуцируется вирус (стрелкой указан койлоцит — клетка с увеличенным ядром, возникшая вследствие цитопатического действия вируса; отражает активную фазу размножения вируса), однако процесс трансформации еще не начался; б — CIN II, начался процесс трансформации: на нерегулируемую экспрессию E6/E7 указывает гиперэкспрессия p16^{INK4a} в базальном и парабазальном клеточных слоях; в — в ходе прогрессии к тяжелой дисплазии (CIN III) p16^{INK4a}-положительные клетки распространяются в промежуточные и поверхностные слои эпителия

Detection of cellular protein p16^{INK4a} in cervical dysplasias by means of immunohistochemistry: a — viral genes' expression in CIN I is limited only to differentiated cells, p16^{INK4a} is not overexpressed in basal and parabasal layers, virus is replicated in the injury (the arrow indicates koilocyte — a cell with an enlarged nucleus, appearing as a result of viral cytopathic action; reflects the active phase of viral replication), though transformation has not begun yet; б — CIN II, transformation has begun: p16^{INK4a} overexpression in basal and parabasal cell layers indicates unregulated E6/E7 expression; в — while progressing to severe dysplasia (CIN III), p16^{INK4a}-positive cells spread to the intermediate and superficial layers of the epithelium

Идеальными мишенями для разработки терапевтических ВПЧ-вакцин признаны онкогены *E6* и *E7* ВПЧ типов высокого риска, поскольку они постоянно экспрессируются в ВПЧ-индуцированных тяжелых дисплазиях и карциномах. Замедление прогрессии этих новообразований и спонтанный клиренс наблюдаются при выраженном клеточном иммунном ответе, обеспечиваемом Т-хелперами, а также цитотоксическими Т-лимфоцитами, CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетками соответственно [19, 20].

Значимую роль в распознавании клеток, зараженных ВПЧ, играют присутствующие в эпителии антигенпрезентирующие дендритные клетки, которые стимулируют CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки. Основанные на дендритных клетках терапевтические ВПЧ-вакцины представляют собой либо клетки, нагруженные ВПЧ-специфическим белковым антигеном, либо клетки, в которые были трансдуцированы соответствующие гены ВПЧ, начинающие экспрессироваться в этих клетках, — подготовленная таким образом дендритная вакцина вводится пациенту [21, 22]. Однако основанные на дендритных клетках терапевтические ВПЧ-вакцины имеют ряд ограничений: необходимость получения от каждого конкретного пациента достаточного количества дендритных клеток и, как следствие, высокую зависимость данной технологии от методик культивирования клеток *in vitro*, большие затраты труда и времени на приготовление индивидуального препарата, высокую стоимость и т. д. Перечисленные обстоятельства дают основание специалистам сомневаться в практической значимости этих разработок для проведения широкомасштабных терапевтических ВПЧ-вакцинаций [23].

Приведем 2 примера терапевтических ВПЧ-вакцин, в настоящее время находящихся в III фазе клинических испытаний. Живая аттенуированная вакцина на основе бактерии *Listeria monocytogenes*, секретирующая E7 ВПЧ типа 16, при внутривенном введении оказалась сравнительно безопасной и вызывала уменьшение размеров опухоли у некоторых больных инвазивным РШМ. ДНК-вакцина, представляющая собой плазмиду, включающую гены *E6* и *E7* ВПЧ типов 16 и 18, вводилась внутримышечно пациенткам с тяжелыми дисплазиями шейки матки, после чего по месту инъекции давался небольшой электрический разряд (так называемая электропорация *in vivo*). Процедура оказалась хорошо переносимой, у пациенток было отмечено образование ВПЧ-специфических CD8⁺-Т-клеток [23].

Заключение

Важнейшим результатом работ, посвященных папилломавирусному канцерогенезу, стало создание профилактических вакцин: 2-валентной церварикс, 4-валентной гардасил и 9-валентной Gardasil 9. Эти

препараты безопасны, иммуногенны и эффективны в отношении ВПЧ-инфекций и состояний, предшествующих РШМ.

Получение ответов на некоторые вопросы, связанные с применением этих вакцин, потребует многолетних наблюдений. Так, оценка реальной эффективности этих вакцин в отношении собственно РШМ пока не может быть дана, поскольку латентный период между ВПЧ-инфицированием цервикального эпителия и возникновением рака может составлять несколько десятилетий. По предварительным оценкам, церварикс и гардасил при введении их девочкам до начала сексуальных контактов предупредят до 70 % случаев РШМ, а Gardasil 9 — около 90 %.

Пока неясно, насколько длительно сохраняются в организме вакцинированных антитела к ВПЧ и не понадобятся ли по прошествии ряда лет повторные прививки.

Открытым остается и вопрос, не произойдет ли в будущем на уровне популяции замещение одних типов онкогенных ВПЧ другими, на сегодня минорными и поэтому не вошедшими ни в одну из созданных вакцин, если удастся достигнуть широкого охвата населения профилактическими ВПЧ-вакцинациями.

Комплекс проблем встает перед врачами и биологами с установлением того факта, что в некоторых семьях имеет место вертикальная передача онкогенных ВПЧ от родителей новорожденным детям. Такие дети образуют группу повышенного риска развития ВПЧ-ассоциированных карцином головы и шеи, а также аногенитальной сферы. Очевидно, что важно активно выявлять таких детей, совершенствовать методы наблюдения за ними в клинике, исследовать особенности формирования у них иммунитета к ВПЧ-инфекциям, проверять, насколько эффективной окажется профилактическая вакцинация этих детей, изучать их заболеваемость другими инфекционными болезнями.

Целесообразность включения той или иной прививки в национальный календарь вакцинаций находится в компетенции органов здравоохранения и определяется среди прочего финансовыми возможностями. Уместно в связи с этим упомянуть, что, согласно экспертным оценкам, стоимость комплексного лечения 1 случая РШМ в России составляет около 1,1 млн руб.

Профилактическая вакцинация не избавляет от предсуществующей инфекции онкогенными ВПЧ. Создание терапевтических вакцин против ассоциированных с онкогенными ВПЧ заболеваний остается крайне актуальной задачей. В настоящее время несколько терапевтических ВПЧ-вакцин проходят клинические испытания.

В соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения для снижения заболеваемости и смертности от ВПЧ-ассоциированных

болезней профилактическую ВПЧ-вакцинацию следует сопровождать программами скрининга, целесообразно включение в национальный календарь прививок вакцинации подростков обоих полов.

Полная программа предупреждения РШМ и контроля за заболеваемостью данной распространенной формой рака и смертностью от него, согласно рекомендации Всемирной организации здравоохранения, включает первичную профилактику (вакцинация подростков в возрасте 9–13 лет до начала половой жизни), вторичную профилактику (доступность скрининга и лечение, если выявлен предрак шейки матки), лечение РШМ (хирургическое вмешательство, химиотерапия, лучевая терапия) и оказание паллиативной помощи больным.

В России наблюдается тревожная тенденция: за период 2005–2015 гг. увеличились показатели за-

болеваемости женщин РШМ и смертности от него, в возрастной группе 30–39 лет смертность от РШМ вышла на 1-е место среди всех причин смерти женщин от злокачественных новообразований. В этот период возросла также заболеваемость некоторыми другими ВПЧ-ассоциированными формами аногенитального рака и рака головы и шеи.

Для контроля за распространением ВПЧ-инфекции в популяции и снижения уровня заболеваемости ВПЧ-ассоциированными формами рака, в первую очередь РШМ, и смертности от этих онкологических заболеваний в России весьма актуально включение профилактической ВПЧ-вакцинации в национальный календарь прививок, а также внедрение в практику здравоохранения программ скрининга РШМ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- World Health Organization. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human Papillomaviruses. V. 90. Lyon, 2007.
- WHO. Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. 2nd edn; Geneva, 2014. 394 p. Available by: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/144785/9789241548953_eng.pdf;jsessionid=8FBB1D11A1D2A2B688F33202B9EEBC48?sequence=1.
- Адамян Л.В., Артымук Н.В., Ашрафян Л.А. и др. Письмо Министерства здравоохранения РФ от 2 ноября 2017 г. № 15-4/10/2-7676 о направлении клинических рекомендаций (протокола лечения) «Доброкачественные и предраковые заболевания шейки матки с позиции профилактики рака». 2017. Доступно по: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71716538/>. [Adamyanyan L.V., Artymuk N.V., Ashrafyan L.A. et al. Letter of the Ministry of Health of the Russian Federation of November 2, 2017, No 15-4/10/2-7676 on prescription of clinical recommendations (treatment protocol) "Benign and precancerous cervical diseases with the attitude to cancer prevention". 2017. (In Russ.). Available by: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/71716538/>.
- Papanicolaou G.N. A new procedure for staining vaginal smears. *Science* 1942;95(2469):438–9. DOI: 10.1126/science.95.2469.438.
- El-Zein M., Richardson L., Franco E.L. Cervical cancer screening of HPV vaccinated populations: cytology, molecular testing, both or none. *J Clin Virol* 2016;76(Suppl. 1):62–8. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.11.020.
- Canfell K., Caruana M., Gebski V. et al. Cervical screening with primary HPV testing or cytology in a population of women in which those aged 33 years or younger had previously been offered HPV vaccination: Results of the Compass pilot randomised trial. *PloS Med* 2017;14(9):1002388. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002388.
- Klaes R., Benner A., Friedrich T. et al. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2002;26(11):1389–99. DOI: 10.1097/0000478-200211000-00001.
- Sano T., Oyama T., Kashiwabara K. et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol* 1998;153(6):1741–8. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65689-1.
- Klaes R., Friedrich T., Spitkovsky D. et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92(2):276–84. DOI: 10.1002/ijc.1174.
- Volgareva G., Zavalishina L., Andreeva Yu. et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004;4:58. DOI: 10.1186/1471-2407-4-58.
- Serrano M., Hannon G., Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK₄. *Nature* 1993;366(6456):704–7. DOI: 10.1038/366704a0.
- Ruas M., Peters G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta* 1998;1378(2):115–77. DOI: 10.1016/S0304-419X(98)00017-1.
- Dyson N., Howley P.M., Münger K., Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243(4893):934–7. DOI: 10.1126/science.2537532.
- Lowe S.W., Sherr C.J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(1):77–83. DOI: 10.1016/S0959-437X(02)00013-8.
- Kishore V., Patil A.G. Expression of p16INK4A protein in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of uterine cervix. *J Clin Diagn Res* 2017;11(9):17–20. DOI: 10.7860/JCDR/2017/29394.10644.
- Yu L.L., Guo H.Q., Lei X.Q. et al. p16/Ki-67 co-expression associates high risk human papillomavirus persistence and cervical histopathology: a 3-year cohort study in China. *Oncotarget* 2016;7(40):64810–9. DOI: 10.18632/oncotarget.11705.
- Sun H., Shen K., Cao D. Progress in immunocytochemical staining for cervical cancer screening. *Cancer Manag Res* 2019;11:1817–27. DOI: 10.2147/CMAR.S195349.
- Волгарева Г.М. Папилломавирусный канцерогенез. Основные достижения и некоторые проблемы. Часть 2. ВПЧ-ассоциированные формы рака

- в России. Профилактические вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):31–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-31-38. [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.)].
19. Thomas K.J., Smith K.L., Youde S.J. et al. HPV16 E6 29–38-specific T cells kill cervical carcinoma cells despite partial evasion of T-cell effector function. *Int J Cancer* 2008; 122(12): 2791–9. DOI: 10.1002/ijc.23475.
20. Van der Burg S.H., Melief C.J. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Curr Opin Immunol* 2011;23(2):252–7. DOI: 10.1016/j.coi.2010.12.010.
21. Santin A.D., Bellone S., Roman J.J. et al. Therapeutic vaccines for cervical cancer: dendritic cell-based immunotherapy. *Curr Pharm Des* 2005;11(27):3485–500. DOI: 10.2174/138161205774414565.
22. Palucka K., Banchereau J. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity* 2013;39(1):38–48. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.07.004.
23. Chabeda A., Yanez R.J.R., Lamprecht R. et al. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Res* 2018;5:46–58. DOI: 10.1016/j.pvr.2017.12.006.

ORCID авторов/ORCID of authors

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

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 03.04.2019. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 03.04.2019. Accepted for publication: 30.06.2020.

ФИТОАДАПТОГЕНЫ В БИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ И ГЕРИАТРИИ (ЧАСТЬ 2)*

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

Фитоадаптогены (женьшень, элеутерококк, родиола розовая, аралия и др.) обладают широким спектром биологической активности, поддерживая организм в состоянии неспецифически повышенной сопротивляемости к стрессовым воздействиям. Во 2-й части обзора приводятся сведения о нормализующем влиянии фитоадаптогенов на сердечно-сосудистую систему. Проводится анализ современных данных о противоопухолевых свойствах фитоадаптогенов в отношении влияния на возникновение и развитие опухолей, метастазирование, рецидивирование, развитие цитостатической болезни, подтверждающий перспективу их использования в создании препаратов для профилактики и биотерапии опухолевых заболеваний.

Ключевые слова: адаптогены, женьшень, элеутерококк, профилактическая онкология, геропротекторы, иммуномодуляторы, противоопухолевая терапия

Для цитирования: Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии. (Часть 2). Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):12–20.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-12-20



PHYTOADAPTOGENS IN THE TUMOURS BIOTHERAPY AND GERIATRICS (PART 2)*

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

Phytoadaptogens (ginseng, eleutherococcus, rhodiola rosea, aralia, etc.) have a wide spectrum of biological activity, supporting the body in a state of nonspecific increased resistance to stress. The second part of the review provides information of the phytoadaptogens normalizing effects on the cardiovascular system. Analyzes current data on the antitumor properties of phytoadaptogens in relation to the effect on the onset and development of tumours, metastasis, recurrence, development of cytostatic disease, confirming the prospect of their using in drugs for prevention and biotherapy of tumour diseases.

Key words: adaptogens, ginseng, eleutherococcus, preventive oncology, geroprotectors, immunomodulators, antitumour therapy

For citation: Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Phytoadaptogens in the tumors biotherapy and geriatrics. (Part 2). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):12–20. (In Russ.).

Введение

В 1-й части обзора описаны антистрессорные, иммуно- и гормонотонизирующие, нейропротекторные, а также улучшающие когнитивную деятельность человека свойства фитоадаптогенов (ФА).

Показано их синхронизирующее влияние на биоритмы. Наряду с этим при воздействии на интегративные физиологические показатели нельзя забывать о благоприятном влиянии ФА на работу сердца.

*Часть 1 см.: Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):13–21.
Past 1 see: Phytoadaptogens in the tumours biotherapy and geriatrics (Part 1). Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):13–21.

Фитоадаптогены и сердечно-сосудистая система

При изучении ФА были показаны их модуляторные, типичные адаптогенные свойства в отношении сердечной деятельности. Например, при физической нагрузке, провоцирующей тахикардию, препараты женьшеня, элеутерококка и левзеи помогали нормализовать сердечный ритм и восстановить работоспособность [1]. Применение ФА (настойки родиолы или элеутерококка) у лиц с пониженным систолическим давлением приводило к его повышению, а на фоне повышенного давления давало гипотензивный эффект [2]. Выяснилось, что адаптогены, препятствуя проникновению кальция внутрь клеток гладкой мускулатуры кровеносных сосудов, ослабляют их сужение, что и приводит к нормализации давления [3].

Причины, влияющие на разнонаправленное действие ФА, в данном случае могут быть разными. В частности, входящие в состав женьшеня гинзенозиды Rg1 и Rb расширяют сосуды, повышая в сосудистой стенке продукцию оксида азота, а за счет усиления экспрессии фактора роста эндотелия сосудов активизируют ангиогенез и процессы неоваскуляризации [4]. Гинзенозиды Rg3 и Rh2, наоборот, сужают сосуды, тормозят ангиогенез, индуцируя эндотелиальную дисфункцию [5]. Сочетание в растении веществ с обратными эффектами, вероятно, может служить молекулярной базой модуляторного влияния женьшеня на сердечно-сосудистую систему [6, 7].

Препараты многих ФА оказывают кардиопротекторное действие, уменьшая нарушения ритма сердца [1]. ФА существенно ослабляют ухудшение коронарного кровоснабжения и возникающую гипоксию (которая активирует процессы перекисного окисления липидов с последующей деструкцией клеточных элементов). В частности, схизандрин из лимонника защищал миокард от кардиотоксичности противоопухолевого антибиотика доксорубина, снижая оксидантный стресс и повреждение кардиомиоцитов [8]. Гинзенозиды Rb, Ro, Re вызывали антиоксидантный эффект, предупреждая гибель кардиомиоцитов, вызываемую перекисью водорода или антибиотиком антимицином, за счет связывания пероксидных и гидроксильных радикалов [9]. Кардиопротекторное влияние ФА обусловлено повышением устойчивости миокарда к адренергическим воздействиям. Их усиление оказывается причиной стрессиндуцированного повреждения сердечной мышцы, а активация адренорецепторов сопровождается ишемией. Поэтому эмоциональный стресс усиливает некротические явления миокарда, одновременно провоцируя аритмию. ФА проявляют антиадренергические свойства с подавлением синтеза циклического аденозинмонофосфата аденилатциклазой, при этом не являясь β -адреноблокаторами [8]. Вероятно, ФА опосредованно влияют на аденилатциклазу, включая карди-

альные опиатные рецепторы через продукцию опиоидных пептидов, в частности β -эндорфина [10]. Антиаритмические свойства ФА связаны в конечном итоге со снижением внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция.

Между тем не одну сотню лет ФА рекомендуют в качестве антидиабетических средств из-за усиления выработки β -эндорфина, активации μ -опиатных рецепторов и последующего повышения экспрессии белка-транспортера глюкозы [11]. Антитромботические свойства ФА связывают с увеличением синтеза активаторов плазминогена (без изменения генной экспрессии активатора урокиназного типа), с торможением агрегации тромбоцитов, индуцированным коллагеном или аденозинтрифосфатом [1].

Таким образом, накопленные к настоящему моменту факты позволяют предполагать вероятность положительного воздействия ФА при ишемических патологиях сердца, сосудистых расстройствах, нарушениях сердечного ритма и реологических свойств крови.

Выявленные в экспериментальных и клинических исследованиях антистрессорные, иммуно- и гормономодулирующие, нейропротекторные, а также улучшающие когнитивную деятельность человека свойства адаптогенов при синхронизирующем воздействии на биоритмы и сердечную деятельность во многом объясняют интерес онкологов к этим препаратам.

Противоопухолевые возможности фитоадаптогенов

Фитоадаптогены издавна используют в восточной медицине для борьбы с возрастными патологиями, к которым принадлежат и онкологические заболевания. ФА можно рассматривать в качестве средств профилактики и предупреждения онкологических заболеваний, что указывает на их специфическую адаптогенную активность. Кроме того, они обладают противоопухолевыми свойствами, поэтому, вероятно, можно говорить о лечебных возможностях ФА.

Изучая проблему противоопухолевой терапии применительно к ФА, Н.В. Лазарев сформулировал концепцию о состоянии неспецифически повышенной сопротивляемости как основе лечебного эффекта ФА при разных патологиях, оправдывая положения восточной медицины об универсальности их действия. В старости, когда онкологические заболевания возникают чаще, можно констатировать повышенную чувствительность к разным неблагоприятным воздействиям. С этих позиций, поддерживая состояние неспецифически повышенной сопротивляемости с помощью ряда механизмов, ФА обеспечивают резистентность организма к онкологическим заболеваниям. Таким образом, в результате адаптогенного

эффекта можно предотвратить дезадаптационные нарушения физиологических функций и предупредить болезни адаптации, к которым принадлежит и злокачественный рост [2].

Действительно, с первых работ учеников Н.В. Лазарева и И.И. Брехмана получены результаты, указывающие на способность комплексных, галеновых препаратов женьшеня, элеутерококка, левзеи, родиолы и других оказывать профилактический противоопухолевый эффект в эксперименте. Они, например, замедляли возникновение рецидивов и метастазов меланомы В16 и аденокарциномы Эрлиха у мышей, повышали выживаемость животных и препятствовали росту индуцированных (N-нитрозоэтилмочевиной) опухолей спинного и головного мозга. У крыс тормозили возникновение индуцированной бензантраценом саркомы [6]. Вероятно, в основе антибластомного эффекта независимо от ситуации лежат одни и те же механизмы.

Адаптация в рамках состояния неспецифически повышенной сопротивляемости к неблагоприятному стрессорному влиянию для предупреждения его отрицательных последствий достигается за счет мобилизации работы связанных между собой защитных систем: нервной, эндокринной и иммунной. Для профилактики и комплексного лечения онкозаболеваний существенной представляется способность ФА обеспечивать стабилизацию психофизиологических, эндокринных и иммунологических показателей.

Стандартная реакция на стресс также приводит к мобилизации гипоталамо-адренокортикальной системы и повышению плазменного уровня глюкокортикоидов. Вместе с тем долгий стресс с выраженным гиперкортицизмом сопровождается ускорением метастазирования злокачественных новообразований в эксперименте. У различных ФА выявлено адаптогенное модулирующее воздействие на эндокринную ось гипоталамус – надпочечники. Составной частью профилактического влияния ФА на развитие опухолей является вмешательство в иммунный статус. Стресс связан со снижением иммунной реактивности: с инволюцией тимуса и селезенки, нарушениями субпопуляций лимфоцитов, лимитированием гуморального иммунитета. Все это облегчает злокачественный рост.

Фитоадаптогены, в основном комплексно, могут напрямую вмешиваться в процессы роста и метастазирования опухолей. Это может быть реализовано с помощью цитотоксических эффектов их биологически активных веществ с ускорением гибели и подавлением пролиферации опухолевых клеток при лимитировании ангиогенеза и воспалительных реакций, а также защиты здоровых тканей от токсического влияния опухолей. С учетом этих свойств ФА оптимизируют специфическую и снижают побочную активность традиционных противоопухолевых препаратов [12].

Ограничение роста опухолей и метастазов. Апоптоз

Фитоадаптогены способны задерживать опухолевый процесс за счет ускорения программированной гибели опухолевых клеток. Являясь естественным механизмом поддержания нормального клеточного состава тканей при неадекватном торможении в случае нарушений, апоптоз выливается уже в онкологическую проблему из-за поломки программы ликвидации быстро растущих клеток. Проапоптозная активность обнаружена у гинзенозидов Rd, Rg3, Rh2, а также у комплексных галеновых препаратов женьшеня, родиолы и других ФА в отношении опухолевых клеток шейки матки (Hela), карциномы предстательной железы (LNCaP), человеческой нейробластомы (SK-N-BE), эритролейкемии, миелоидной лейкемии человека (K-562 и HL-60) и лейкемии. При этом наблюдали конденсацию хроматина, фрагментацию ДНК при усилении экспрессии проапоптозного белка Вах и снижении антиапоптозных белков Bcl-2, а также повышении ферментативной активности каспаз (а именно каспазы 3), которые обеспечивают конечную фазу гибели клеток. Усиление апоптоза сопровождалось повышением активности лактатдегидрогеназы и цитотоксичности натуральных киллеров [13].

Следует отметить, что метаболиты некоторых гинзенозидов (Rb1, Rb2, Rc), подобные 20 (S) – протопанаксадиолу, в которые они трансформируются в кишечнике с помощью микрофлоры, по активности воздействия на апоптоз могут превышать исходные соединения. Вместе с тем причиной индукции апоптоза с помощью ФА может быть запуск митохондриальных нарушений. Некоторые гинзенозиды (Rh2, Rg3) способствуют апоптотической смерти клеток гепатомы человека (линии SK-HEP-1), рака яичника (линия HO-8910), рака толстой кишки с помощью усиления деполяризации мембран митохондрий с последующим выбросом цитохрома с транслокацией белка Вах, а также подавления белков семейства фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/Akt) и ингибитора белков апоптоза (IAP), запуская активацию каспаз 3 и 9 [14, 15]. Наряду с этим возможно воздействие ФА на апоптоз *in vivo*. Повторное внутривенное введение крысам экстракта женьшеня приводило к ограничению пролиферации клеток аденокарциномы A549 с усилением признаков апоптоза [16]. Предоперационное введение гинзенозида в течение недели ослабляло клинические признаки болезни, а послеоперационное исследование морфологического материала показало возрастание количества апоптозных клеток [6].

В современных исследованиях, посвященных проблемам онкологии, большое внимание уделяется механизмам регуляции активности эукариотического фактора транскрипции NF-κB, а также фактора

транскрипции активатора протеина 1 (AP-1), которые ответственны за c-jun, c-fos и другую онкогенную трансактивацию [17–19]. Многие авторы полагают, что противоопухолевая активность ФА, в том числе экстракта женьшеня, его полисахаридов, гинзенозидов (Rb1, Rc, Re, Rg1, Rg3 и ИН-901), их метаболитов (образующихся в результате жизнедеятельности бактерий кишечника) опосредована подавлением активации факторов транскрипции (NF-κB и AP-1), а также экспрессии циклооксигеназы 2-го типа. Вместе с тем выявлено, что активные вещества, например из индийского женьшеня, подавляют активацию NF-κB и NF-κB-регулируемую экспрессию соответствующих генов, что может объяснить способность адаптогенов усиливать апоптоз и подавлять инвазию при метастазировании опухолевых клеток [20].

Между тем антиапоптозные эффекты ФА показаны для нейронов и клеток крови (повышение экспрессии гена антиапоптозных белков Bcl-2 и Bcl-XL, ограничение проапоптозного белка Bax, подавление каспаз и нормализация мембранного потенциала митохондрий) [21, 22]. Действительно, логично, что ограничение апоптоза в данном случае подтверждает представления о способности ФА поддерживать гомеостаз организма и действовать протективно в отношении мозга и клеток крови: защищать мозг от нейродегенеративных заболеваний, а кровь — от нарушений в колониеобразующих клетках костного мозга человека.

Ангиогенез

Фитоадаптогены способны задерживать ангиогенез опухоли. В частности, гинзенозид Rg3 может ограничивать продукцию сосудистого эндотелиального и фибробластного ростовых факторов, блокируя пролиферацию эпителиальных клеток пупочной вены человека в культуре, тормозя новообразование сосудов [23]. Вместе с тем Rg3 усиливал активность циклофосфамида, низкие дозы которого лимитировали васкуляризацию легочной карциномы Льюис у мышей. При этом снижалась устойчивость опухоли к цитостатику и повышалась выживаемость животных [24]. Гинзенозид Rb1 тормозил ангиогенез *in vitro* и *in vivo*, усиливая транскрипцию и секрецию антиангиогенного протеина из пигментного эпителия (PEDF). Активации последнего способствует экспрессия β-эстрогенных рецепторов, специфическим агонистом которых и является Rb1 [25]. Кроме того, снижая экспрессию сосудистых ростовых факторов, в частности фактора роста эндотелия сосудов, основного фактора роста фибробластов (BFGF), адаптогены обеспечивают антиметастатическое и антиангиогенное действие на опухоль [26, 27]. Антиангиогенные свойства женьшеня в отношении опухолей широко обсуждаются

в научной литературе. Молекулярными мишенями гинзенозидов могут служить ядерные рецепторы стероидных гормонов [28].

Фитоадаптогены-иммуномодуляторы

Фитоадаптогены могут повреждать клетки опухоли, например, за счет усиления продукции ряда цитокинов. Так, добавление ФА в культуру клеток лимфомы животных или к антигенстимулированным мононуклеарам из крови человека подавляло пролиферацию клеток опухоли с повышением экспрессии фактора некроза опухоли, продукции интерлейкина 1, 2 и интерферонов (ИФН) [29]. Введение мышам *per os* отдельных гинзенозидов Rh2, Rg1, Rd увеличивало число Т-лимфоцитов, снижая уровень интерлейкина 6, вызванного стрессом [30]. Аппликация Rg3 и метаболита сапонинов протопанаксадиола на кожу мышей с индуцированной опухолью подавляла рост новообразований, лимитируя экспрессию циклооксигеназы 2-го типа и транскрипционного фактора NF-κB [31].

Одним из «пионеров» иммунокоррекции с применением ФА в клинической онкологии был профессор В.А. Купин. При раке желудка и молочной железы у больных лучевая терапия на фоне высоких доз экстракта элеутерококка в меньшей степени подавляла иммунный статус и число лейкоцитов крови. Показано, что экстракты женьшеня, его полисахариды и гинзенозиды — протопанаксатриолы, панаксатриолы, а также Rh1, Rh20, R-Rh1, F1 — стимулируют продукцию оксида азота, интерлейкинов 4, 12, ИФН-γ иммунокомпетентными клетками [2, 32, 33].

Продемонстрирована возможность и определены условия коррекции межклеточной адгезии в ткани-мишени и реакциях клеточного иммунитета в процессе спонтанного гепатоканцерогенеза экспериментальных животных при воздействии экстракта из корневища родиолы розовой. Коррекция играет существенную роль в снижении частоты возникновения и торможении роста эпителиальных опухолей [34].

Показана возможность коррекции взаимной адгезивности клеток уротелия, экспрессии молекул лейкоцитарных интегринов и клеточного иммунитета с помощью препарата родиолы розовой у больных раком мочевого пузыря после трансуретральной резекции. У больных, принимавших препарат в среднем 14,6 мес, частота рецидивов после лечения снизилась в 2,4 раза (7,5 %) по сравнению с таковой до лечения (18 %) [35, 36].

Стимуляция адаптогенами выработки ИФН — одна из точек приложения их действия. Повышение активности НК-клеток, вероятно, одно из проявлений интерферогенного действия адаптогенов. С учетом того, что ИФН активирует и макрофаги, которые,

в свою очередь, стимулируют антигензависимые Т-лимфоциты, можно объяснить картину иммуномодуляции, которую наблюдают при использовании адаптогенов [37–39].

Обобщая известные свойства адаптогенов, можно сделать вывод об их сходстве с ИФН- α , касающемся таких его эффектов, как иммуномодуляция (стимуляция НК-клеток, цитотоксических лимфоцитов), антипролиферативная активность в отношении опухолевых клеток, регуляция клеточной дифференцировки, биомодуляция активности цитостатиков, преодоление лекарственной резистентности и др. Вместе с тем ИФН вызывает дозозависимый токсический эффект. Экстракты же ФА нетоксичны, при этом нивелируют вышеперечисленные нарушения в силу своего антистрессорного действия.

Другие механизмы

Фитоадаптогены могут воздействовать на матричные металлопротеиназы, которые, повреждая внеклеточный матрикс, способствуют инвазии опухолей в окружающие ткани. Препараты женьшеня, например, подавляют активность матричных металлопротеиназ за счет воздействия на рецепторы адреналовых глюкокортикоидов в тканях. При структурном сходстве с дексаметазоном они активизируют ядерную транслокацию глюкокортикоидных рецепторов, тормозя инвазию опухолевых клеток. Гинзенозиды Rh1 и Rh2 индуцируют дифференцировку клеток тератокарциномы F9 у мышей при участии тех же гормональных рецепторов [28].

При введении мышам Rg3 гинзенозида после инокуляции опухолевых клеток наблюдали подавление инвазии клеток меланомы (B16), а также торможение развития метастазов в легкие [40]. Кроме того, выявлено, что гинзенозиды Rh2, Rg1 и Rg3 подавляют пролиферацию клеток рака предстательной железы (линия LNCaP) за счет угнетения антигенактивируемых протеиназ [41].

Фитоадаптогены защищают клетки здоровых тканей, снижая токсические свойства злокачественных клеток. Усиленная продукция свободнорадикальных и перекисных соединений вследствие оксидантного стресса создает предпосылки для повышенного роста и метастазирования опухолей. ФА являются антиоксидантами [42]. Гинзенозид панаксатриол усиливал активность антиоксидантных ферментов клеток культуры кератиноцитов после ультрафиолетового облучения более эффективно, чем признанный антиоксидант витамин Е. Наряду с этим экстракты других адаптогенов, в частности элеутерококка и лимонника, угнетали процессы перекисного окисления липидов в печени после инокуляции раковых клеток человека, а также снижали токсическое действие четыреххлористого углерода (усиление перекисного окисления

липидов), угнетая активность глутатионредуктазы и супероксиддисмутазы [43]. С антиоксидантными свойствами связывают и антимутагенную активность ФА, что важно для первичной профилактики рака [44].

Усиление эффективности химиолучевой терапии

Таким образом, ФА сочетают противоопухолевые эффекты вместе с усилением резистентности здоровых тканей к повреждению. Это оправдывает их использование параллельно с цитостатической терапией в онкологии. Независимо от принадлежности противоопухолевых средств к различным фармакологическим группам результат такой комбинации одинаков: ФА усиливают эффективность химиолучевой терапии и ограничивают выраженность их побочных реакций. Так, комбинация циклофосфана с гинзенозидом Rg3 приводила к большему подавлению скорости роста и размеров перевитой мышам опухоли рака яичников (SKOV-3), а также ограничению ангиогенеза при снижении экспрессии фактора роста эндотелия сосудов [45]. Вместе с тем гинзенозид Rg2 при введении животным с перевиваемыми опухолями (карцинома легких Льюис, меланома) лимитировал токсичность циклофосфана для здоровых тканей, ослабляя оксидативный стресс в периферических лимфоцитах и клетках костного мозга, также повышая активность антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы) и содержание глутатиона в плазме крови [46]. Гинзенозиды Rh2, Rg5 и их метаболиты ингибировали экспрессию белка лекарственной устойчивости рака молочной железы [47]. Экстракт красного женьшеня усиливал эффективность сорафениба при раке почки, подавляя активность онкогена c-Jun [48]. Сочетание циклофосфана с экстрактом родиолы усиливало противоопухолевую и антиметастатическую активность цитостатика. Наряду с этим родиола оказывала протекторный эффект на здоровые ткани, ограничивая торможение в них синтеза ДНК [12]. Применение другого алкилирующего цитостатика цисплатина с экстрактом женьшеня, а также с гинзенозидами Rb3, Rd и Re повышало антипролиферативный эффект на модели карциномы молочной железы (MCF-7), снижая частоту рвотных актов у крыс. При этом в клетках почек был менее выражен апоптоз (фрагментация ДНК). В связи с этим ФА можно рекомендовать для профилактики нефротоксичности при химиотерапии [49]. Экстракт женьшеня, а также гинзенозиды Rb1 и Rg1 усиливали цитотоксическое действие 5-фторурацила на модели культуры клеток колоректального рака человека (SW480) с повышенной индукцией апоптоза [50]. Введение схизандрина из лимонника в культуру клеток карциномы печени или рака молочной железы (MCF-7) вместе с доксорубицином повышало уровень апоптоза опухолевых

клеток за счет активации каспазы 9 и подавления потенциала митохондриальных мембран. Также при этой комбинации снижалась кардиотоксичность доксорубина без усиления апоптоза в культуре кардиомиоцитов крыс [51].

Экстракты женьшеня, левзеи, лимонника, родолы лимитировали иммуносупрессию, увеличивая число Т-лимфоцитов и уровня иммуноглобулинов у женщин на поздних стадиях эпителиального рака яичников при введении цитостатиков цисплатина и циклофосфана [52].

Эффект усиления химиотерапевтического воздействия на опухоль ФА может быть следующим. Биологически активные вещества ФА имеют большее сродство к белку множественной лекарственной устойчивости по сравнению с цитостатиками. Поэтому, например, гинзенозиды Rg3, Rh2 могут «окупировать» белок множественной лекарственной устойчивости (который «качает» их по кругу из опухолевой клетки и назад вместо цитостатиков), что задерживает химиопрепараты в опухолевых клетках, способствуя их элиминации [53]. В связи с вышеизложенным можно полагать целесообразным использовать оптимизирующие свойства ФА при комбинированной терапии опухолей [54].

Важное свойство ФА — нейпротекторная активность [55, 56]. Известно, что повышение уровня катехоламинов (прежде всего дофамина, который подавляется при старении) увеличивает среднюю продолжительность жизни и снижает частоту развития опухолей. ФА, в частности женьшень и элеутерококк, предотвращают дегенерацию дофаминергических нейронов [57, 58]. В связи с этим нейпротекторная активность ФА дополняет картину их значимости для онкологии.

Коррекция фитоадаптогенами адгезионных взаимодействий при опухолевом росте

Противоопухолевые эффекты адаптогенов объясняют их способностью регулировать межклеточную адгезию, усиливая процессы дифференцировки тканей и иммунологическую реактивность организма. В опухолях они таким образом стимулируют редифференцировку, или обратную трансформацию, приводя к деканцерогенезу. Влияя на опухолевые клетки в таком направлении, адаптогены снижают темпы их пролиферации и, соответственно, тормозят опухолевый рост [59, 60]. Адаптогены опосредуют усиление на опухолевых клетках экспрессии адгезивных лигандов для эффекторов иммунитета, ослабляя «ускользание» опухоли от иммунологического надзора. Повышая экспрессию адгезионных молекул ICAM-1, ФА активизируют «спящие» на опухолевых клетках рецепторы апоптоза, что приводит опухолевые клетки к самоэлиминации [61].

Иными словами, ФА обладают широким спектром биологического действия. Это может быть обусловлено структурной и функциональной связью этих веществ со стероидами. Подобно стероидным гормонам, они являются жирорастворимыми сигнальными молекулами, обладающими высокой биологической активностью.

В итоге выявлено, что число, место связывания сахаров (глюкоза, мальтоза, фруктоза, сахароза) и гидроксильных групп влияет на фармакологическую активность гинзенозидов, обеспечивая для каждого вещества определенное свойство: Rg1 — усиление гуморального и клеточно-опосредованного иммунитета; Rh2, Rb1, Rb2, Rc — антипролиферативная активность в отношении опухолевых клеток; Rh1, Rh2, Rh3, Rg3 — индукция дифференцировки и коррекция гомо- и гетеротипических адгезионных взаимодействий; Rg3, Rd1-K — антиметастатическая активность, преодоление множественной лекарственной устойчивости; Rh — усиление корректорной активности ДНК-полимеразы (антимутагенность); RcM1 — индукция апоптоза в опухолевых клетках; Rb1, Rg1, Rg3 — подавление ангиогенеза опухоли; Rb1, Rb2, Re, Rg1 — повышение активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы); Rb1 — предотвращение апоптической гибели нейронов (стимуляция экспрессии антиапоптического фактора Bcl-xL *in vitro* и *in vivo*) [62].

Вместе с тем известно, что растительные соединения фенольной природы, в том числе флавоноиды, фенологликозиды, тритерпеновые гликозиды (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, салидрозид, схизандрин, олеаноловая кислота, глицирризиновая кислота и др.), которые представляют собой биологически активные вещества ФА, относят к узкобороздочным лигандам ДНК. Поскольку в качестве таковых эти вещества могут оказывать прямое или опосредованное действие на процессы репарации ДНК, проявляя антиканцерогенные эффекты, данные соединения можно считать эффективными в составе препаратов для профилактики и терапии онкологических заболеваний [63, 64].

Таким образом, экспериментальный и клинический материал, свидетельствующий о профилактических свойствах ФА в отношении влияния на возникновение опухолей, их развитие, метастазирование, рецидивирование, развитие цитостатической болезни, подтверждает перспективу использования ФА в создании препаратов для биотерапии, в том числе иммунотерапии и профилактики опухолевых заболеваний, а также комбинированной терапии и реабилитации онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gan X.T., Karmazyn M. Cardio-protection by ginseng: experimental and clinical evidence and underlying mechanisms. *Can J Physiol Pharmacol* 2018;96(9):859–68. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0192.
- 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.)].
- Nakaya Y., Mawatari K., Takahashi A. et al. The phytoestrogen ginsenoside Re activates potassium channels of vascular smooth muscle cells through PI3K/Akt and nitric oxide pathways. *J Med Invest* 2007;(54):381–4. DOI: 10.2152/jmi.54.381.
- Nabavi S.F., Sureda A., Habtemariam S., Nabavi S.M. Ginsenoside Rd and ischemic stroke; a short review of literatures. *J Gin Res* 2015;39(4):299–303. DOI: 10.1016/j.jgr.2015.02.002.
- Yue P.J., Mak N.K., Cheng J.K. et al. Pharmacogenomics and the Yin/Yang actions of ginseng: anti-tumor, angiomodulating and steroid-like activities of ginsenosides. *Chin Med* 2007;(2):6–10. DOI: 10.1186/1749-8546-2-6.
- Арушанян Э.Б., Бейер Э.В. Растительные адаптогены. Ставрополь: СтГМУ, 2009. 232 с. [Arushanyan E.B., Beyer E.V. Plant adaptogens. Stavropol': StSMU, 2009. 232 p. (In Russ.)].
- Zhang Y., Zhou L., Zhang X. et al. Ginsenoside-Rd attenuates TRPM7 and ASIC1a but promotes ASIC2a expression in rats after focal cerebral ischemia. *Neurol Sci* 2012;33(5):1125–31. DOI: 10.1007/s10072-011-0916-6.
- Chen P.S., Liu J., Meng H.Y. et al. Beneficial effects of Schisandrin B on the cardiac structure and function in a mice model of myocardial infarction. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2017;45(11):963–70. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2017.11.013.
- Xie J.T., Shao Z.H., Vanden Hoek T. Antioxidant effects of ginsenoside Re in cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2006;533(3):201–7. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.01.001.
- Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н., Арбузов А.Г. и др. Кардиопротекторные, инотропные и антиаритмические свойства комплексного адаптогенного препарата Тонизид. Экспериментальная и клиническая фармакология 2008;(3):15–22. DOI: 10.30906/0869-2092-2008-71-3-15-22. [Lishmanov Yu.B., Maslov L.N., Arbuzov A.G. et al. Complex adaptogen drug Tonizid attenuates myocardial contractility dysfunction and prevents the appearance of irreversible cardiomyocyte damage during ischemia and reperfusion in isolated heart. *Ekspierimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya* = Experimental and Clinical Pharmacology 2008;(3):15–22. (In Russ.)].
- Zhou P., Xie W., He S. et al. Ginsenoside Rb1 as an Anti-diabetic agent and its underlying mechanism analysis. *Cells* 2019;8(3):1110–5. DOI: 10.3390/cells8030204.
- Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растения в комплексной терапии опухолей. М.: Издательство ПАМН, 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.)].
- Xia T., Wang Y.N., Zhou C.X. et al. Ginsenoside Rh2 and Rg3 inhibit cell proliferation and induce apoptosis by increasing mitochondrial reactive oxygen species in human leukemia Jurkat cells. *Mol Med Rep* 2017;15(6):3591–8. DOI: 10.3892/mmr.2017.6459.
- Gum S.I., Rahman M.K., Won J.S. et al. A Distinctive Pattern of *Beauveria bassiana* – biotransformed ginsenoside products triggers mitochondria/FasL-mediated apoptosis in colon cancer cells. *Phytother Res* 2016;30(1):136–43. DOI: 10.1002/ptr.5513.
- Wang J.-H., Nao J.-F., Zhang M., He P. 20(S)-ginsenoside Rg3 promotes apoptosis in human ovarian cancer HO-8910 cells through PI3K/Akt and XIAP pathways. *Tumour Biol* 2014;35(12):11985–94. DOI: 10.1007/s13277-014-2497-5.
- Wang J., Ren Y.L. Experimental study of the effects on proliferation and apoptosis of A₅₄₉ cell line adrenocarcinoma of the lung with compatibility of Radix ex Rhizoma ginseng and Fatces Trogopterori. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 2006;31(7):585–8.
- Tian L., Shen D., Li X. et al. Ginsenoside Rg3 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4. *Oncotarget* 2016;7(2):1619–32. DOI: 10.18632/oncotarget.6451.
- Liu T., Zhao L., Hou H. et al. Ginsenoside 20(S)-Rg3 suppresses ovarian cancer migration via hypoxia-inducible factor 1 alpha and nuclear factor-kappa B signals. *Tumour Biol* 2017;39(5):1010428317692225. DOI: 10.1177/1010428317692225.
- Lu S., Luo Y., Zhou P. et al. Ginsenoside compound K protects human umbilical vein endothelial cells against oxidized low-density lipoprotein-induced injury via inhibition of nuclear factor-κB, p38, and JNK MAPK pathways. *J Ginseng Res* 2019;43(1):95–104. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.09.004.
- Wang N., Wan J.B., Chan S.W. et al. Comparative study on saponin fractions from *Panax notoginseng* inhibiting inflammation-induced endothelial adhesion molecule expression and monocyte adhesion. *Chin Med* 2011;(6):37. DOI: 10.1186/1749-8546-6-37.
- Hu J., Gu Y., Fan W. Rgl protects rat bone marrow stem cells against hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through the PI3K/Akt pathway. *Mol Med Rep* 2016;14(1):406–12. DOI: 10.3892/mmr.2016.5238.
- Zhou P., Xie W., Sun Y. et al. Ginsenoside Rb1 and mitochondria: a short review of the literature. *Mol Cell Probes* 2019;43:1–5. DOI: 10.1016/j.mcp.2018.12.001.
- Yue P.Y., Wong D.Y., Wu P.K. et al. The angiosuppressive effects of 20 (R)-ginsenoside Rg3. *Biochem Pharmacol* 2006;72(4):437–45. DOI: 10.1016/j.bcp.2006.04.034.
- Liu X., Zhang Z., Liu J. et al. Ginsenoside Rg3 improves cyclophosphamide-induced immunocompetence in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 2019;72:98–111. DOI: 10.1016/j.intimp.2019.04.003.
- Leung K.W., Cheung L.W., Pon Y.L. et al. Ginsenoside Rbl inhibits tube-like structure formation on endothelial cells by regulating pigment epithelium-derived factor through the oestrogen β-receptor. *Br J Pharmacol* 2007;152(2):207–15. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707359.
- Zhang E., Shi H., Yang L. et al. Ginsenoside Rd regulates the Akt/mTOR/p70S6K signaling cascade and suppresses angiogenesis and breast tumor growth. *Oncol Rep* 2017;38(1):359–67. DOI: 10.3892/or.2017.5652.
- Meng L., Ji R., Dong X. et al. Antitumor activity of ginsenoside Rg3 in melanoma through downregulation of the ERK and Akt pathways. *Int J Oncol* 2019;54(6):2069–79. DOI: 10.3892/ijo.2019.4787.

28. Dai D., Zhang C.F., Williams S. et al. Ginseng on cancer: potential role in modulating inflammation – mediated angiogenesis. *Am J Chin Med* 2017;45(1):13–22. DOI: 10.1142/S0192415X17500021.
29. Vinh L.B., Park J.U., Duy L.X. et al. Ginsenosides from Korean red ginseng modulate T cell function via the regulation of NF-AT-mediated IL-2 production. *Food Sci Biotechnol* 2018;28(1):237–42. DOI: 10.1007/s10068-018-0428-8.
30. Kim D.H., Moon Y.S., Lee T.H. et al. The inhibitory effect of ginseng saponines on the stress-induced plasma interleukin-6 level in mice. *Neurosci Lett* 2003;353(1):13–6. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.08.070.
31. Lee J.Y., Shin J.W., Chung K.S. et al. Antitumor promotional effects of a novel intestinal bacterial metabolite (IH-901) derived from the protopanaxadiol-type ginsenosides in mouse skin. *Carcinogenesis* 2005;26(2):359–67. DOI: 10.1093/carcin/bgh313.
32. Zhou X., Shi H., Jiang G. et al. Antitumor activities of ginseng polysaccharide in C57BL/6 mice with Lewis lung carcinoma. *Tumour Biol* 2014;35(12):12561–6. DOI: 10.1007/s13277-014-2576-7.
33. Meng Q., Pan J., Liu Y. et al. Antitumor effects of polysaccharide extracted from *Acanthopanax senticosus* and cell-mediated immunity. *Exp Ther Med* 2018;15(2):1694–701. DOI: 10.3892/etm.2017.5568.
34. Бочарова О.А., Серебрякова Р.В., Бодрова Н.Б. Профилактический эффект *Rhodiola rosea* на спонтанное опухолеобразование в печени на модели высококорактовой линии мышей. Вестник Российской академии медицинских наук 1994;(5):41–3. [Bocharova O.A., Serebryakova R.V., Bodrova N.B. Preventive effect of *Rhodiola rosea* in spontaneous liver carcinogenesis in a mice model of high-tumor strain. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* = *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences* 1994;(5):41–3. (In Russ.)].
35. Бочарова О.А., Серебрякова Р.В., Голубева В.А. и др. Изменение механической интеграции клеток переходного эпителия и иммунного статуса больных с опухолями мочевого пузыря. Урология и нефрология 1994;(3):76–80. [Bocharova O.A., Serebryakova R.V., Golubeva V.A. et al. Mechanical integration changes of transitional epithelial cells and the immune status of patients with bladder tumors. *Urologiya i nefrologiya* = *Urology and Nephrology* 1994;(3):76–80. (In Russ.)].
36. Бочарова О.А., Матвеев Б.П., Барышников А.Ю. и др. Влияние экстракта *Rhodiola rosea* на частоту рецидивов поверхностного рака мочевого пузыря у людей. Урология и нефрология 1995;(2):46–7. [Bocharova O.A., Matveev B.P., Baryshnikov A.Yu. et al. The effect of *Rhodiola rosea* extract on the recurrence rate of superficial bladder cancer. *Urologiya i nefrologiya* = *Urology and Nephrology* 1995;(2):46–7. (In Russ.)].
37. Choi J.G., Jin Y.H., Lee H. et al. Protective effect of Panax notoginseng root water extract against influenza A virus infection by enhancing antiviral interferon-mediated immune responses and natural killer cell activity. *Front Immunol* 2017;8:1542. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01542.
38. He L.X., Ren J.W., Liu R. et al. Ginseng (*Panax ginseng* Meyer) oligopeptides regulate innate and adaptive immune responses in mice via increased macrophage phagocytosis capacity, NK cell activity and Th cells secretion. *Food Funct* 2017;8(10):3523–32. DOI: 10.1039/c7fo00957g.
39. Chen L.X., Qi Y.L., Qi Z. et al. A Comparative study on the effects of different parts of Panax ginseng on the immune activity of cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Molecules* 2019;24(6):1096. DOI: 10.3390/molecules24061096.
40. Karra A.G., Konstantinou M., Tzortziou M. et al. Potential dissociative glucocorticoid receptor activity for protopanaxadiol and protopanatriol. *Int J Mol Sci* 2018;20(1):94. DOI: 10.3390/ijms20010094.
41. Kim H.S., Lee E.H., Ko S.R. et al. Effects of ginsenosides Rg3 and Rh2 on the proliferation of prostate cancer cells. *Arch Pharmacol Res* 2004;27(4):429–35. DOI: 10.1007/bf02980085.
42. Seo B.Y., Choi M.J., Kim J.S., Park E. Comparative analysis of ginsenoside profiles: antioxidant, antiproliferative, and antigenotoxic activities of ginseng extracts of fine and main roots. *Prev Nutr Food Sci* 2019;24(2):128–35. DOI: 10.3746/pnf.2019.24.2.128.
43. Kim H.G., Jang S.S., Lee J.S. et al. Panax ginseng Meyer prevents radiation-induced liver injury via modulation of oxidative stress and apoptosis. *J Ginseng Res* 2017;41(2):159–68. DOI: 10.1016/j.jgr.2016.02.006.
44. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. Генетика 2013;49(12):1364–9. [Kurenay O.N., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogen antimutagenesis in yeast cells of *saccharomyces*. *Genetika* = *Russian Journal of Genetics* 2013;49(12):1364–9. (In Russ.)].
45. Xu L., Wang X.Y., Liu S.L., Zhang J.-T. Two forms of long-term potentiation induced by different compounds. *J Asian Nat Prod Res* 2007;9(3–5):217–22. DOI: 10.1080/10286020500532066.
46. Zhang Q.H., Wu C.F., Duan L. Protective effects of total saponins from stem and leaf of Panax ginseng against cyclophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse marrow bone cells and peripheral lymphocytes cells. *Food Chem Toxicol* 2008;46(1):293–302. DOI: 10.1016/j.fct.2007.08.025.
47. Jin J., Shahi S., Kang H.K. et al. Metabolites of ginsenosides as novel BCRP inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;345(4):1308–14. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.152.
48. Kim C., Lee J.H., Baek S.H. et al. Korean Red Ginseng Extract Enhances the anticancer effects of sorafenib through abrogation of CREB and c-Jun activation in renal cell carcinoma. *Phytother Res* 2017;31(7):1078–89. DOI: 10.1002/ptr.5829.
49. Aung H.H., Mehendale S.R., Wang C.Z. et al. Cisplatin's tumoricidal effect on human breast carcinoma MCF7 cells was not attenuated by American ginseng. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;59(3):369–74. DOI: 10.1007/s00280-006-0278-6.
50. Wang C.J., Xie J.T., Zhang B. et al. Chemopreventive effects of Panax notoginseng and its major constituents on SW480 human colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 2007;31(5):1149–56. DOI: 10.3892/ijo.31.5.1149.
51. Li L., Lu Q., Shen Y., Hu X. Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. *Biochem Pharmacol* 2006;71(5):584–95. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.11.026.
52. Kormosh N., Laktionov K., Antoshechkina M. Effect of a combination of extract from several plants on cell-mediated and humoral immunity of patients with advanced ovarian cancer. *Phytother Res* 2006;20(5):424–5. DOI: 10.1002/ptr.1889.
53. Ma J., Gao G., Lu H. et al. Reversal effect of ginsenoside Rh2 on oxaliplatin-resistant colon cancer cells and its mechanism. *Exp Ther Med* 2019;18(1):630–6. DOI: 10.3892/etm.2019.7604.
54. Kim H.S., Kim M.K., Lee M. et al. Effect of Red Ginseng on genotoxicity and health-related quality of life after adjuvant chemotherapy in patients with epithelial ovarian cancer: a randomized,

- double blind, placebo-controlled trial. *Nutrients* 2017;9(7):772. DOI: 10.3390/nu9070772.
55. Liu J., He J., Huang L. et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rb1 on hippocampal neuronal injury and neurite outgrowth. *Neural Regen Res* 2014;9(9):943–50. DOI: 10.4103/1673-5374.133137.
 56. Kim K.H., Lee D., Lee H.L. et al. Beneficial effects of *Panax ginseng* for the treatment and prevention of neurodegenerative diseases: past findings and future directions. *J Ginseng Res* 2018;42(3):239–47. DOI: 10.1016/j.jgr.2017.03.011.
 57. 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.
 58. Wang G.L., Wang Y.P., Zheng J.Y., Zhang L.X. 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.
 59. Бочарова О.А., Фигурин Л.М., Серебрякова Р.В. и др. Коррекция препаратом *Rhodiola rosea* адгезии клеток уротелия и иммунного статуса у больных поверхностным раком мочевого пузыря. *Иммунология* 1997;18(1):51–5. [Bocharova O.A., Figurin L.M., Serebryakova R.V. et al. *Rhodiola rosea* in correction of urothelial cells adhesion and immune status in patients with superficial cancer of the bladder. *Immunologiya = Immunology* 1997;18(1):67–70. (In Russ.)].
 60. Shanmugam M.K., Lee J.H., Chai E.Z. et al. Cancer prevention and therapy through the modulation of transcription factors by bioactive natural compounds. *Semin Cancer Biol* 2016;(40, 41):35–47. DOI: 10.1016/j.semcancer.2016.03.005.
 61. Yan Z., Yang R., Jiang Y. et al. Induction of apoptosis in human promyelocytic leukemia HL60 cells by panaxynol and panaxydol. *Molecules* 2011;16(7):5561–73. DOI: 10.3390/molecules16075561.
 62. Qi L.W., Wang C.Z., Yuan C.S. Ginsenosides from American ginseng: chemical and pharmacological diversity. *Phytochemistry* 2011;72(8):689–99. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.02.012.
 63. Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Якубовская М.Г. Механизмы антиканцерогенного действия флавоноидов. *Успехи молекулярной онкологии* 2014;(1):56–68. [Belitskij G.A., Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. The mechanisms of flavonoids anticancer action. *Uspekhi molekulyarnoj onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2014;(1):56–68. (In Russ.)].
 64. Nekkanti S., Tokala R., Shankaraiah N. Targeting DNA minor groove by hybrid molecules as anticancer agents. *Curr Med Chem* 2017;24(26):2887–907. DOI: 10.2174/0929867324666170523102730.

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 text, the analysis of the manuscript;
R.V. Karpova, E.V. Bocharov: review of publications on the topic of the article, writing the text;
A.A. Verzhinskaya, M.A. Baryshnikova, I.V. Kazeev, V.G. Kucheryanu: review of publications on the topic of the article;
M.V. Kiselevskiy: the analysis of the manuscript.

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 к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 20.11.2019. Accepted for publication: 30.06.2020.

ОСОБЕННОСТИ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ЛЕКАРСТВЕННЫХ ЖЕВАТЕЛЬНЫХ РЕЗИНОК

Е.В. Бlynская¹, С.В. Тишков¹, К.В. Алексеев^{1,2}, В.В. Бueva¹, А.А. Иванов¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»;

Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

²ЧУОО ВО «Медицинский университет «Реавиз»; Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатырская, 2, стр. 2

Контакты: Сергей Валерьевич Тишков sergey-tishkov@ya.ru

Резинки жевательные лекарственные представляют собой твердые дозированные лекарственные формы, предназначенные для жевания в течение определенного периода времени без последующего проглатывания для оказания местного и системного действия. В данной статье описаны основные технологии получения резинок жевательных лекарственных, проведены анализ и сопоставление технологических аспектов производства. Кроме того, указаны преимущества и недостатки различных применяемых технологий, особенности применения в фармацевтической технологии, а также дополнительные технологические приемы создания модификаций высвобождения лекарственных средств из резинок жевательных лекарственных. Сделан вывод о перспективности применения различных технологий получения резинок жевательных и методов совершенствования отдельных этапов технологического процесса.

Ключевые слова: резинки жевательные лекарственные, технологии получения, метод плавления, прямое прессование

Для цитирования: Бlynская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. и др. Особенности технологии производства лекарственных жевательных резинок. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):21–8.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-21-28



SPECIAL ASPECTS OF THE TECHNOLOGY OF MEDICATED CHEWING GUM PRODUCTION

E. V. Blynskaya¹, S. V. Tishkov¹, K. V. Alekseev^{1,2}, V. V. Bueva¹, A. A. Ivanov¹

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

²“Reaviz” Medical University; Build 2, 2 Krasnobogatyrskaya St., Moscow 107564, Russia

Chewing gum medicines are solid dosage forms intended for chewing for a certain period of time without subsequent ingestion to provide local and systemic effects. This article describes the basic technologies for producing chewing gum medicinal products, analyzes and compares the technological aspects of production. In addition, the advantages and disadvantages of the various technologies used, the features of the use in pharmaceutical technology, as well as additional technological methods for creating modifications of the release of drugs from chewing gum medicinal gums are given. It is concluded that the application of various technologies for the production of chewing gums and the methods for improving individual stages of the process are promising.

Key words: chewing gum medicinal, production technology, melting method, direct compression

For citation: Blynskaya E. V., Tishkov S. V., Alekseev K. V. et al. Special aspects of the technology of medicated chewing gum production. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):21–8. (In Russ.).

Введение

Резинка жевательная лекарственная (РЖЛ) — относительно новая твердая дозированная лекарственная форма (ЛФ), содержащая основу жевательной резинки (гуммиоснову) с фармацевтической субстанцией (ФС) и предназначенная для жевания в течение определенного периода времени без последующего проглатывания с целью оказания местного действия в полости рта и глотке или системного действия [1]. Благодаря многим характерным преимуществам РЖЛ все чаще рассматривается как альтернатива находя-

щимся на рынке ФС и оригинальным лекарственным средствам (ЛС). Данная ЛФ приемлема в педиатрии и среди других групп пациентов, ведущих активный образ жизни [2, 3]. Один из существенных плюсов РЖЛ заключается в том, что она находится в ротовой полости продолжительное время, высвобождение ФС происходит преимущественно под действием жевательных движений пациента и, соответственно, может контролироваться им. Огромное значение жевательных резинок для местного применения обусловлено возможностью создания определенной концентрации

ФС в ротовой полости более продолжительное время по сравнению с таблетками, диспергируемыми в полости рта, жевательными таблетками, растворами для полости рта и другими жидкими ЛФ [4, 5]. Следует учитывать также необходимость расширения ассортимента существующих лекарственных препаратов (ЛП) с ЛФ, не применяемыми ранее для продления или получения патентной защиты на ЛС [6].

В настоящее время совершенствуются технологии производства РЖЛ, что облегчает разработку новых ЛП, увеличивает количество ФС, применяемых с помощью данной ЛФ, а также позволяет изготавливать жевательные резинки с заранее заданными потребительскими свойствами и модифицированным высвобождением. Используется несколько основных технологий производства РЖЛ, отличающихся температурными и механическими воздействиями на ФС и имеющих свои особенности применения, преимущества и недостатки.

Цель статьи — описание, анализ и сопоставление технологий получения РЖЛ и методов модификации высвобождения данной ЛФ, сравнение их преимуществ и недостатков, особенностей применения в фармацевтической технологии и при масштабировании производства.

Разработка составов резинок жевательных лекарственных

Резинка жевательная лекарственная состоит из ядра и сахарной или пленочной оболочки, ядро содержит вспомогательные вещества (ВВ), представленные в таблице [7].

Зачастую ядро РЖЛ имеет массу около 1 г. На него наносят покрытие в виде пленки полимера, воска, объемного подсластителя (полиолы) или более толстого слоя сахара. Основа жевательной резинки состоит из эластомеров (гуммиоснова), смол, жиров, эмульгаторов, наполнителей и иногда антиоксидантов.

Существует ряд различных коммерческих основ жевательных резинок натурального и синтетического происхождения, каждая из которых имеет различные характеристики. Все основы жевательной резинки нерастворимы в слюне и определяют важнейшие характеристики РЖЛ, включая текстуру, высвобождение, стабильность, и технологические условия производства. Кроме того, свойства готовой ЛФ зависят от количества гуммиосновы и баланса ВВ, описанных в таблице [8].

Процесс получения резинок жевательных лекарственных

Большинство РЖЛ изготавливают с использованием технологических процессов, характерных для

Компоненты резинок жевательных лекарственных

Chewing gum components

Компонент Component	Фармацевтические субстанции и вспомогательные вещества Pharmaceutical substances and excipients	Содержание в общей массе компонентов, % % of total mass
Фармацевтические субстанции Pharmaceutical substances	Витамины, оральные контрацептивы, никотин, минералы, анальгетики, антациды, миорелаксанты, антигистаминные, противоотечные, анестетики, противокашлевые, антибиотики и др. Vitamins, oral contraceptives, nicotine, minerals, analgesics, antacids, muscle relaxants, antihistamines, decongestants, anesthetics, antitussives, antibiotics, etc.	Максимум ~50 Maximum ~50
Ароматизаторы Flavors	Цитрусовые, мята перечная, анис, винтергриновое масло и синтетические ароматизаторы Citrus, peppermint, anise, wintergreen oil and synthetic flavors	1–5
Подсластители Sweeteners	Сорбит, маннит, аспартам, сахарин и др. Sorbitol, mannitol, aspartame, saccharin, etc.	30–75
Основа жевательной резинки Chewing gum base	Синтетическая (бутадиен-стирольный каучук, полиэтилен и поливинилацетат) и натуральная (чикл, нисперо, розадинья, желутонг, перилла, лечи капси, сорва и др.) Synthetic (styrene-butadiene rubber, polyethylene and polyvinyl acetate) and natural one (chicle, nispero, rosaidinha, jelutong, perilla, lechi-capsi, sorva, etc.)	20–40
Красители Colorants	Диоксид титана, натуральные пищевые красители и красители, подходящие для фармацевтического применения Titanium dioxide, natural food colorings and colorants suitable for pharmaceutical use	<1
Другие вспомогательные вещества Other excipients	Пластификаторы, эластомеры, эмульгаторы (лецитин), наполнители, текстурные агенты (тальк), покрытия и связующие агенты, пленкообразователи и др. Plasticizers, elastomers, emulsifiers (lecithin), fillers, texturing agents (talc), coatings and binding agents, film formers, etc.	0,5–5

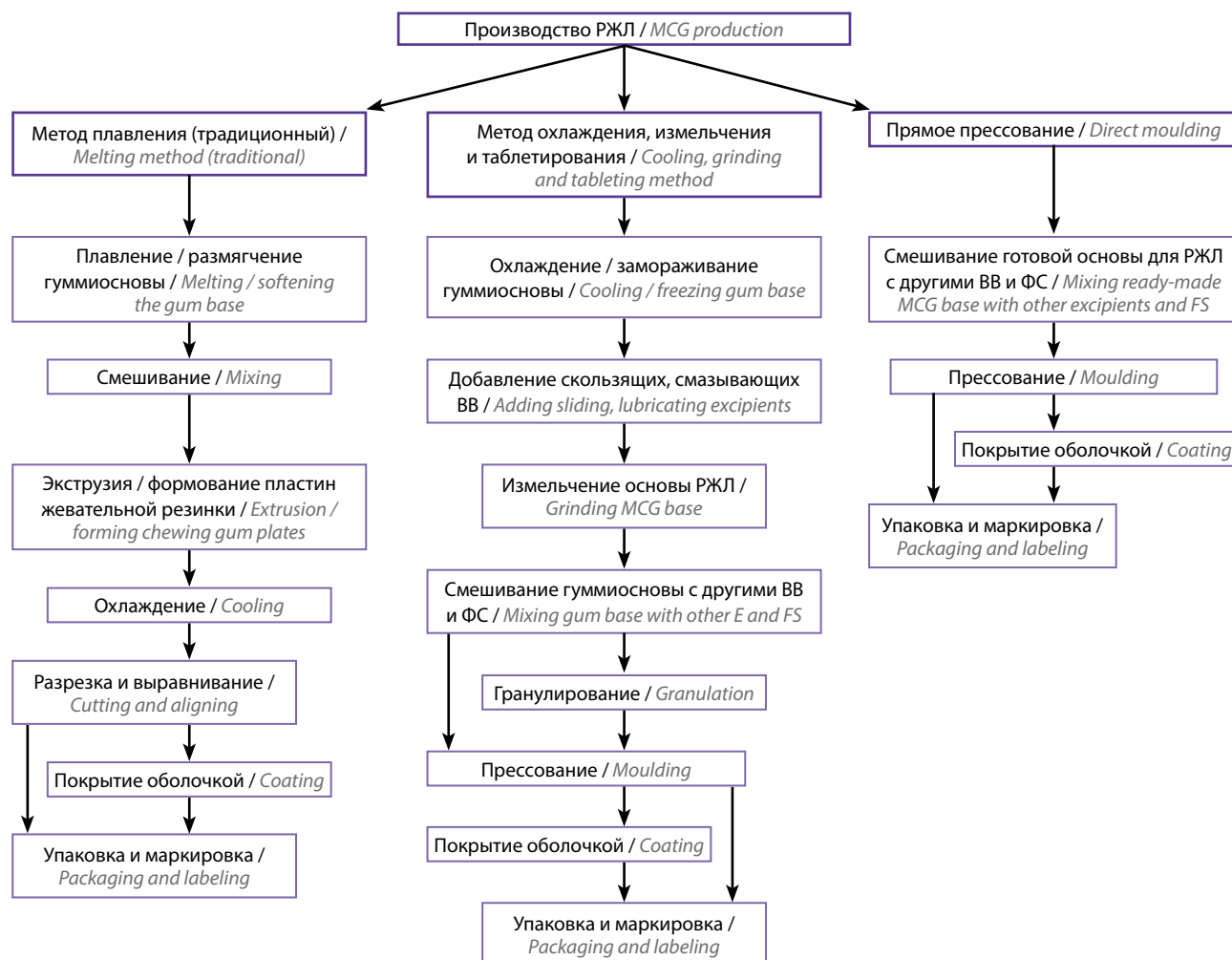


Рис. 1. Технологические схемы методов производства резинок жевательных лекарственных (РЖЛ); ВВ – вспомогательные вещества; ФС – фармацевтическая субстанция

Fig. 1. Technological schemes for medicated chewing gum (MCG); E – excipients; FS – pharmaceutical substance

кондитерских видов жевательной резинки, а технология производства – барьер для выхода на рынок многих фармацевтических компаний-производителей генериков, ограничивающий конкуренцию. РЖЛ изготавливают одним из 3 основных методов (рис. 1) [7, 9]:

- плавление (традиционное);
- охлаждение, измельчение и таблетирование;
- прямое прессование.

Выделяют также дополнительные методы получения РЖЛ с жидким внутренним наполнителем и модификацию высвобождения ФС из ЛФ с помощью комплексообразования с ионообменной смолой или циклодекстрином, а также микрокапсулирования.

Выбор метода зависит от типа жевательной резинки, ФС, ВВ и стабильности состава.

Метод плавления (традиционный)

Типичный традиционный процесс производства РЖЛ начинается с нагревания твердой основы жева-

тельной резинки, синтетические полимеры которой размягчаются или расплавляются при температурах плавления от 50 до 90 °С. На данном технологическом этапе используют котлы с паровой рубашкой или горячей водой для получения однородной жидкости, обладающей надлежащими вязкоупругими характеристиками (рис. 2) [10].

На последующих этапах смешивания температуру поддерживают близкой к точке размягчения (между температурами стеклования и плавления) для сохранения эластичного состояния жидкости гуммиосновы, которая должна быть смешана с другими ВВ и ФС в течение определенного промежутка времени, с последующим добавлением ароматизаторов в конце представленного этапа технологического процесса до получения гомогенной смеси РЖЛ. Описанные процессы осуществляются в экструдерах (рис. 3) и продолжают на следующих участках производства с помощью охлаждающего транспортера, в котором происходит

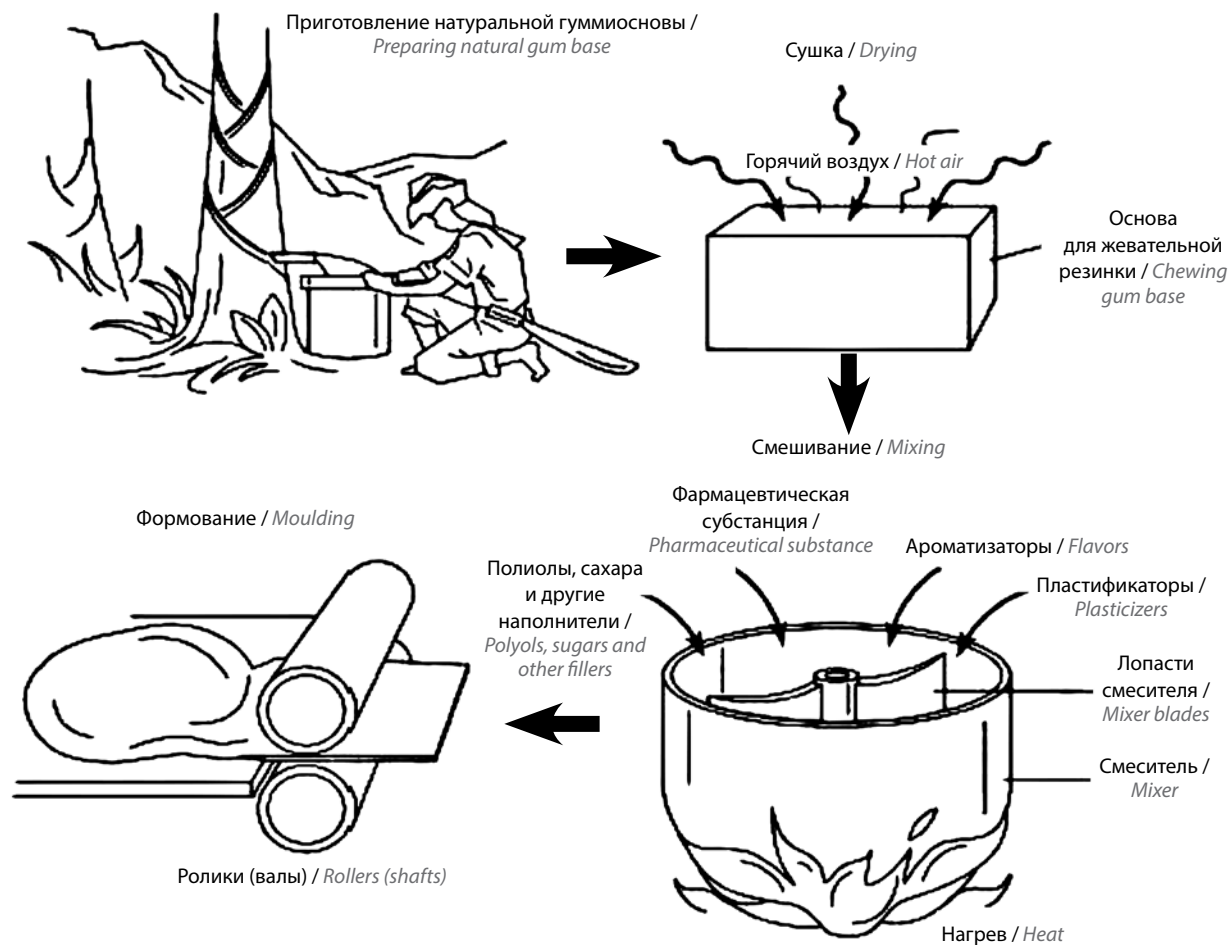


Рис. 2. Схематичное изображение традиционного метода (плавления) производства резинок жевательных лекарственных [11]

Fig. 2. Schematic traditional method (melting) of medicated chewing gum production [11]

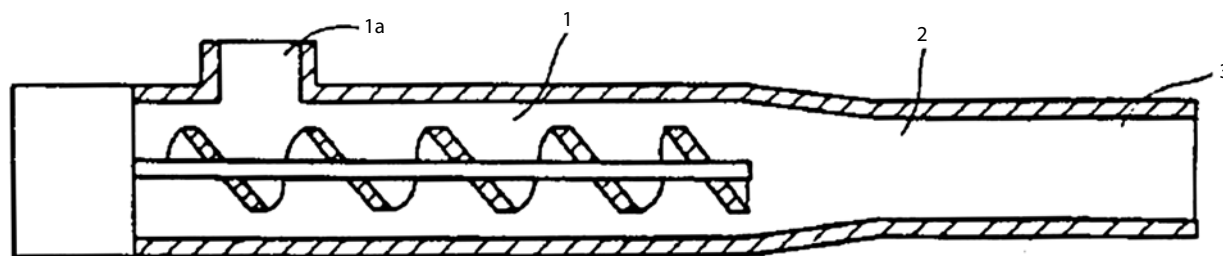


Рис. 3. Экструдер в поперечном разрезе с условными обозначениями, описанными в тексте

Fig. 3. The extruder in cross section with the symbols described in the text

уменьшение температуры вязкоупругой массы и изменяются свойства жевательной резинки, такие как эластичность и упругость. Во время охлаждения температура контролируется и понижается для формирования жевательной резинки в надрезанные пластины или жгуты, которые затем перемещаются через ряд роликов для выравнивания и сглаживания их текстуры. Затем жгуты разрезают на равные части, пластины или подушечки с твердостью по Шору от 16 до 20 ед., тип ОО (метод используется для измерения твердости низко модульных материалов), которые

далее покрывают сахарным сиропом. На последних стадиях технологического процесса жевательную резинку с сахарной оболочкой покрывают тонким слоем воска и готовят для упаковки и маркировки [12].

Для процесса экструзии используют устройство, продемонстрированное на рис. 3 (экструзионная формовочная машина (1)), имеющее впускное отверстие (1a) для подачи разогретой основы жевательной резинки и выпускной канал или патрубок (3) фильеры (2); экструдер имеет лопасти, приводимые в движение двигателем. С помощью показанных лопастей

для экструзионного формования жевательная резинка выдавливается в выходной патрубок (3) фильтры (2) под давлением. Скорость смешивания ингредиентов и последующего охлаждения взаимно влияют друг на друга и на скорость экструзии РЖЛ, поэтому представленные процессы необходимо контролировать надлежащим образом [13].

Метод охлаждения, измельчения и таблетирования

При применении данного способа производства основу жевательной резинки сначала расплавляют, а затем добавляют в смеситель, содержащий некоторые другие ингредиенты жевательной резинки. Во время смешивания композицию охлаждают любым из множества процессов охлаждения. Основу жевательной резинки можно заморозить в морозильной камере при низких температурах, необходимых для достижения требуемой хрупкости. Однако предпочтительно гуммиоснову охлаждать путем контактирования ее с охлаждающим агентом (хладагентом). Хладагентом может быть любое вещество, способное снижать температуру композиции жевательной резинки до желаемой, например: криогенная жидкость, такая как жидкий азот, холодное твердое вещество (твердый диоксид углерода) или холодный газ, такой как газообразное кипение от криогенной жидкости. Данное вещество следует выбирать так, чтобы оно не взаимодействовало с композицией РЖЛ или с аппаратами для смешивания и измельчения. Кроме того, хладагент не должен образовывать при нагревании веществ, которые неблагоприятно влияют на последующую обработку гуммиоснов или представляют потенциальную угрозу безопасности пациента. Например, такой хладагент, как водяной лед, даже при охлаждении до достаточно низкой температуры не подойдет, поскольку при таянии льда образующаяся вода будет частично поглощаться композицией жевательной резинки или вызывать затруднения на следующих стадиях обработки гуммиосновы [12].

Представленный технологический процесс позволяет измельчать композицию жевательной резинки в порошок. Следует учитывать, что даже слегка охлажденная основа жевательной резинки обладает некоторой степенью хрупкости, однако для наиболее эффективного измельчения гуммиоснову охлаждают до температуры, при которой хрупкость сохраняется на последующей стадии измельчения без прилипания к измельчающему устройству. Подходящая температура частично определяется конкретным составом основы жевательной резинки, и ее легко определить эмпирически, изучая свойства охлажденной основы жевательной резинки. Предпочтительно температура должна быть ниже уровня -15°C . Альтернативно этапы охлаждения основы жевательной резинки и ее измельчения могут быть объединены в 1 стадию,

например путем охлаждения самого измельчающего устройства, контактированием с охлаждающей жидкостью (рубашкой с хладагентом или жидким азотом).

Основная сложность этапа измельчения заключается в прилипании частиц жевательной резинки к измельчающему устройству, во избежание чего добавляют ВВ, обладающие антиадгезивными свойствами, такие как фосфат щелочного металла или мальтодекстрин в количестве 2–8 % массы гуммиосновы. Кроме того, основу жевательной резинки перед стадией измельчения часто смешивают со скользящими ВВ, например с осажденным кремния диоксидом.

Возможен предпочтительный вариант осуществления данного технологического процесса путем смешивания основы жевательной резинки, твердого диоксида углерода и осажденного диоксида кремния в мельнице. Данную смесь измельчают до мелкого порошка вместе с твердым диоксидом углерода, поскольку при таком способе не происходит неблагоприятной адгезии к измельчающему устройству [14].

После осуществления данных технологических этапов к порошку основы жевательной резинки добавляют ФС, текстураторы, скользящие, смазывающие и другие ВВ, смесь гранулируют, например, в сигма-образном или высокоскоростном смесителе-грануляторе. Однако при использовании данных аппаратов порошковая смесь должна содержать достаточное количество связующего раствора для обеспечения эффективного гранулирования. Применение большого количества водных связующих нецелесообразно, так как полученная смесь обладает тенденцией к набуханию и увеличению липкости, которая снижает эффективность таблетирования. В связи с этим использование реактора с псевдоожженным слоем для смешивания и гранулирования более рационально, поскольку сводит к минимуму нежелательную агломерацию частиц гуммиосновы. Кроме того, при использовании реактора с псевдоожженным слоем температура процесса должна особенно контролироваться: в случае слишком низкой температуры гуммиоснова будет чрезмерно интенсивно агломерироваться во время распыления раствора из-за низкой скорости испарения. Если температура процесса слишком высокая, гуммиоснова может размягчиться со схожими неблагоприятными результатами, и технологические свойства, размеры полученных гранул не будут соответствовать требованиям последующего технологического процесса. Из готовых гранул впоследствии формируют РЖЛ методом прессования или любым другим способом [8].

Метод прямого прессования

При применении метода прямого прессования для получения РЖЛ используют специально разработанные основы для жевательных резинок в форме

порошка. В настоящее время на рынке представлены 2 основные марки готовых смесей для производства РЖЛ методом прямого прессования: Pharmagum® (SPI Pharma, США) [9] и Health in gum® (Cafosa, Испания) [15]. Health in Gum® относится к группе сыпучих, уплотняемых, содержащих гуммиоснову смесей для прямого прессования, разработанных компанией Cafosa Gum SAU. Данная смесь представляет собой копроцессные (совместно обработанные) основы жевательной резинки, содержащие высокий процент инертных мягких термопластичных эластомеров, смеси полиолов (сорбит/ксилит/маннит), сахаров, пластификаторов, скользящих и смазывающих ВВ. При прессовании Health in Gum® получают РЖЛ, которые по внешнему виду аналогичны таблеткам для перорального применения. Они более твердые и рассыпчатые, чем жевательные резинки, изготовленные традиционными способами, кроме того, у них отличается кинетика высвобождения ФС. Никотиновые РЖЛ, полученные прямым прессованием, имеют более высокую скорость высвобождения, чем Nicorette®, приготовленный обычным способом плавления [16]. Health in Gum® имеет 3 разновидности: HiG PWD-01, HiG PWD-03 и HiG PWD-04, отличающиеся содержанием эластомерной основы жевательной резинки: 25, 35 и 30 % соответственно [9].

Pharmagum® – другая марка готовых смесей для прямого прессования жевательных резинок, разработанная SPI Pharma. Pharmagum® представляет собой смесь полиолов и сахаров с эластомерной основой жевательной резинки. Описанная смесь характеризуется высокой степенью сыпучести, прессуемости и, соответственно, возможностью использовать стандартное оборудование для производства таблеток. Pharmagum® доступна в 3 формах, а именно: S, M, C, отличающихся количеством и видом ВВ и гуммиосновы. Например, Pharmagum® M содержит на 50 % больше эластомерной гуммиосновы по сравнению с Pharmagum® S, кроме того, Pharmagum® S состоит в основном из гуммиосновы и сорбита, а Pharmagum® M содержит гуммиоснову, маннит и изомальт. РЖЛ, изготовленные с использованием Pharmagum® M и S, похожи на таблетки по внешнему виду и характеризуются в 10 раз большей твердостью и хрупкостью при приложении давления по сравнению с жевательными резинками, полученными методами плавления. Помимо других преимуществ, представленные основы для жевательных резинок имеют более низкое содержание влаги, что увеличивает срок годности готовых ЛФ [17].

Сравнительные особенности различных методов производства резинок жевательных лекарственных

Каждый метод изготовления РЖЛ имеет свои достоинства и недостатки. Традиционный метод

(плавления) изготовления РЖЛ основан на относительно простых производственных процессах, которые отработаны на производстве кондитерских резинок жевательных и обладают определенными преимуществами при больших объемах производства. Жевательные резинки, полученные методом плавления, характеризуются оптимальными вязко-пластичными свойствами и потребительской предпочтительностью. Однако к основным недостаткам данного способа производства относятся сложность достижения высокой точности однородности дозирования ФС, текстуры и формы, а также наличие высокой температуры в технологическом процессе, что ограничивает применение термолабильных ЛС [9].

При использовании метода охлаждения, измельчения и таблетирования необходимо отметить сложность, экономическую затратность и продолжительность процесса. Использование антиадгезивных ВВ, таких как фосфаты щелочных металлов, приводит к определенным рискам ввиду несовместимости их с кислотосодержащими ионизируемыми ФС [3]. Многие из недостатков вышеупомянутых способов производства могут быть устранены путем использования готовых смесей для прямого прессования жевательных резинок, которые позволяют разрабатывать РЖЛ с использованием термо- и влаготвердителей ФС. Кроме того, данный метод более рентабелен, поскольку требует только стандартного оборудования для таблетирования. Однако следует учитывать повышение липкости и усиление трения гуммиосновы во время прессования при нагреве оборудования, следовательно, необходимо применять дополнительные смазывающие вещества (магния стеарат), снижать скорость производственного процесса или предусмотреть охлаждение таблеточного пресса.

Методы модификации высвобождения фармацевтической субстанции

Для модификации высвобождения ФС, маскировки вкуса или достижения некоторых технологических характеристик применяют следующие методы:

Комплексообразование с ионообменной смолой.

Комплексообразование липофильных ФС с ионообменными смолами, такими как полакрилин калия, обеспечивает постепенное высвобождение и маскировку вкуса ЛС. Поскольку большинство ФС имеют в своей молекуле ионные участки, заряд данных ВВ обеспечивает возможность для взаимного связывания этих компонентов и дальнейшего высвобождения полученного комплекса в слюну в неионизированном состоянии, обеспечивая таким образом маскировку вкуса. В целях комплексообразования в зависимости от природы ФС используются слабые

катионообменные или анионообменные смолы. В технологии производства РЖЛ стадия комплексобразования происходит перед основным технологическим процессом [18].

Комплексообразование с циклодекстрином. Комплексы циклодекстрина используются для повышения растворимости, стабильности и биодоступности различных ФС в ЛП, а также для маскировки вкуса определенных ЛС. Существует несколько видов циклодекстринов, относящихся к типам α , β и γ , соответственно содержащих 6, 7 или 8 единиц глюкопиранозы. Водорастворимые производные циклодекстрина, представляющие интерес для фармацевтической технологии, включают гидроксипропиловые производные β -циклодекстрина, случайным образом метилированный β -циклодекстрин и натриевую соль сульфобутилового эфира β -циклодекстрина. Гидрофильные производные циклодекстрина, такие как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин, считаются нетоксичными и безопасными при пероральном применении, поэтому их используют для увеличения растворимости плохо растворимых в воде ЛС. Липофильные производные циклодекстрина, такие как метилированные циклодекстрины и сульфобутиловый эфир циклодекстрина, в некоторой степени всасываются из желудочно-кишечного тракта в системный кровоток, но пероральное введение его ограничено потенциальной токсичностью. Комплексообразование с циклодекстрином проводится несколькими методами (ультразвук, сорастворение, истирание с солюбилизаторами и др.) в зависимости от свойств ФС и может представлять собой сложный многостадийный процесс, который осуществляется отдельно от основной технологии производства РЖЛ [19].

Микрокапсулирование. Микрокапсулирование водорастворимым или нерастворимым в воде полимером — успешный способ поддержания высвобождения подсластителя, ароматизатора или ФС из РЖЛ. Одним из недостатков жевательных резинок остается относительно быстрое истощение вкуса и ощущения сладости во время жевания. Потеря вкуса зачастую происходит в течение первых 3–5 мин жевания. Кроме того, важным условием изготовления РЖЛ является размер частиц любого твердого вещества, суспендированного в жевательной резинке, поскольку он должен быть менее ~100 мкм. Микрокапсулирование предполагает создание микрокапсул размерами от 1 мкм, что позволяет избежать неприятных ощущений во время жевания или риска повреждения эмали зубов.

Технологический процесс микрокапсулирования заключается в инкапсуляции мелких частиц вещества или смеси веществ, находящихся в любом агрегатном состоянии, в тонкую оболочку пленкообразующего материала. Для осуществления микрокапсулирования применяют различные технологические приемы, основанные на процессах пленкообразования в гетерогенных системах. Например, для микрокапсулирования ароматизаторов в РЖЛ часто используют метод комплексной коацервации. В представленном процессе используют водный раствор с 2 или более противоположно заряженными полимерами — один с положительным зарядом (желатин, агар), другой с отрицательным (например, карбоксиметилцеллюлоза или гуммиарабик) [20]. Описанные 2 полимера растворяют в воде, контролируя pH и температуру, добавляют маслянистое вещество (ароматизирующее масло), и молекулы полимеров образуют химически сшитую пленку оболочки вокруг каждой из масляных частиц. Полученные микрокапсулированные ароматизаторы в дальнейшем используют в технологическом процессе производства РЖЛ.

Заключение

Резинки жевательные лекарственные представляют собой альтернативную, более удобную ЛФ для перорального применения по сравнению с другими ЛС, осуществляющими транспорт ФС через слизистую оболочку полости рта. Жевательные резинки используют для местного применения и системной доставки ЛС, в настоящее время происходит увеличение потребности в расширении ассортимента РЖЛ. В соответствии с расширением ассортимента и применением новых видов ФС возрастает разнообразие технологических приемов получения ЛФ. Основные пути производства жевательных резинок включают методы плавления (традиционный), охлаждения, смешивания, прессования, а также метод прямого прессования готовых смесей основы жевательной резинки. Данные способы получения РЖЛ имеют определенные преимущества, которые позволяют применить большое количество ФС, например, в случае применения термолабильных или гидролитически неустойчивых ЛС. Кроме того, для улучшения технологических и потребительских свойств ЛФ и биодоступности ФС вводят дополнительные технологические приемы комплексообразования с ионообменными смолами и циклодекстринами, а также микрокапсулирование. В результате применения представленных технологий следует ожидать увеличения количества ЛП в форме РЖЛ.

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

- Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. и др. Применение дисперсионного анализа с целью подбора вспомогательных веществ для получения лиофилизированных таблеток ГК-2. Вестник ВГУ. Серия Химия. Биология. Фармация 2019;1:117–26. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. et al. Application of dispersion analysis with the purpose of selecting subsidiary substances for obtaining lyophilized GK-2 tablets. Vestnik VGU. Seriya Himiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy 2019;1:117–26. (In Russ.)].
- Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. и др. Особенности создания методом лиофилизации таблеток, диспергируемых в полости рта. Фармация 2019;68(2):17–23. DOI: 10.29296/25419218-2019-02-03. [Blynskaya E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. et al. Features of the design of freeze-dried orally disintegrating tablets. Farmatsiya = Pharmacy 2019;68(2):17–23. (In Russ.)].
- Соловьева Н.Л., Сокуренок М.С. Жевательная лекарственная резинка как перспективная система доставки лекарств (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств 2017; 2:90–5. [Solov'yova N.L., Sokurenko M.S. Medicinal chewing gum as a promising drug delivery system (review). Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug Development & Registration 2017;2:90–5. (In Russ.)].
- Al Hagbani T., Nazzal S. Medicated chewing gums (MCGs): composition, production, and mechanical testing. AAPS PharmSciTech 2018;19(7):2908–20. DOI: 10.1208/s12249-018-1123-z.
- Aslani A., Rostami F. Medicated chewing gum, a novel drug delivery system. J Res Med Sci 2015;20(4):403–11.
- Athanikar N.K., Gubler S.A. Process for manufacturing a pharmaceutical chewing gum. US Patent No 6322828, 2001.
- Chaudhary S.A., Shahiwala A.F. Medicated chewing gum – a potential drug delivery system. Expert Opin Drug Deliv 2010;7(7):871–85. DOI: 10.1517/17425247.2010.493554.
- Gaonkar A.G., Vasisht N., Khare A.R. et al. Microencapsulation in the food industry. A practical implementation guide. Waltham: Academic Press, 2014. P. 569.
- Guo X., Chang R.K., Hussain M.A. Ion-exchange resins as drug delivery carriers. J Pharm Sci 2009;98(11):3886–902. DOI: 10.1002/jps.21706.
- Hedges A.R. Industrial applications of cyclodextrins. Chem Rev 1998;98(5):2035–44. DOI: 10.1021/cr970014w.
- Khatun S., Sutradhar K.B. Medicated chewing gum: An unconventional drug delivery system. Int Curr Pharm J 2012;1(4):86–91. DOI: 10.3329/icpj.v1i4.10064.
- Konar N., Palabiyik I., Tokar O.S. Sagdic O. Chewing gum: production, quality parameters and opportunities for delivering bioactive compounds. Trends Food Sci Technol 2016;55:29–38. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.07.003.
- Kraemer J., Gajendran J., Guillot A., Barakat A. Chewable Oral Drug Products. In vitro Drug Release Testing of Special Dosage Forms 2019;2:27–53. DOI: 10.1002/9781118675748.ch2.
- Makwana A., Sameja K., Raval V. et al. Chewing gum: a modern approach to oral mucosal drug delivery. Int J Pharm Res Dev 2011;4:1–16.
- Murakami S. et al. Method for manufacture of chewing gums with sectional motif patterns. US Patent No 4855146, 1989.
- Pagare P.K., Satpute C.S., Jadhav V.M. et al. Medicated chewing gum: a novel drug delivery system. JAPS 2012;2(06):40–54. DOI: 10.7324/JAPS.2012.2706.
- Rekhi G.S. Advances in solid dose oral drug delivery. ON Drug Delivery 2010;3:14–8.
- Shah K.R., Mehta T.A. Medicated chewing gum – a mobile oral drug delivery system. Int J Pharm Tech Res 2014;6(1):35–48.
- Surana A.S. Chewing gum: A friendly oral mucosal drug delivery system. Int J Pharm Sci Rev Res 2010;4(2):68–71.
- Zieschang L., Klein M., Jung N. et al. Formulation development of medicated chewing gum tablets by direct compression using the SeDeM-Diagram-Expert-System. Eur J Pharm Biopharm 2019;144:68–78. DOI: 10.1016/j.ejpb.2019.09.003.

Вклад авторов

Е.В. Блынская: разработка дизайна обзора, обобщение материала обзора;

С.В. Тишков: получение материала обзора, написание текста рукописи;

К.В. Алексеев: разработка дизайна обзора, анализ полученных данных;

В.В. Бueva: обзор публикаций по теме;

А.А. Иванов: анализ материала обзора.

Authors' contributions

E.V. Blynskaya: development of the review design, generalization of the review material;

S.V. Tishkov: obtaining review material, writing manuscript text;

K.V. Alekseev: development of the review design, data analysis;

V.V. Bueva: review of publications on the topic;

A.A. Ivanov: analysis of the review material.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 18.03.2020. **Принята к публикации:** 30.06.2020.

Article submitted: 18.03.2020. **Accepted for publication:** 30.06.2020.

ОБНАРУЖЕНИЕ ДИССЕМИНИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК В КОСТНОМ МОЗГЕ БОЛЬНЫХ НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

С.В. Чулкова^{1,2}, Н.Н. Тупицын¹, Т.М. Джуманазаров¹, А.Д. Палладина¹, Н.А. Купрышина¹,
О.А. Чернышева¹, А.К. Аллахвердиев^{3,4}, О.П. Колбацкая¹, П.В. Кононец¹

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. И.М. Пирогова»
Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1а;

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

⁴ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России;
Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. Существуют многочисленные подтверждения того, что при ряде опухолей диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге (КМ) — предшественники последующих отдаленных метастазов. Детекция ДОК при немелкоклеточном раке легкого (НМРЛ) позволит получить важную информацию об особенностях метастазирования и оценить возможности выявления новых мишеней для лекарственной терапии НМРЛ.

Цель исследования — оценить возможность детекции ДОК в КМ у больных НМРЛ, а также проанализировать частоту поражения и взаимосвязь с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Материалы и методы. Морфологическим и иммунологическим методами изучено 62 образца КМ пациентов с НМРЛ. Проведена оценка состояния гемопоэза в зависимости от наличия поражения КМ. С помощью проточной цитометрии выполнен анализ ДОК (FACSCanto II, США, программа Kaluza Analysis v 2.1). Применялись моноклональные антитела к CD45, цитокератинам, меченные напрямую различными флуорохромами.

Результаты. В КМ ДОК (EPSCAM⁺CD45⁺) были обнаружены у 43,5 % пациентов с НМРЛ (в качестве порогового значения приняли 1 клетку на 10 млн миелокариоцитов). Наличие ДОК не коррелировало с размером опухоли, статусом лимфатических узлов, стадией опухолевого процесса. Наибольшая частота обнаружения ДОК наблюдалась при IA- и IIA-стадии и составила 60,7 % (3/5) и 58,3 % (7/12) соответственно. Поражение КМ в 45 % (15/33) случаев наблюдалось при аденокарциноме, при плоскоклеточном раке опухолевые клетки выявлены в 37 % (10/27) образцов ($p = 0,501$). Установлено, что ДОК чаще выявляются при более дифференцированных опухолях ($p = 0,023$). Существенных корреляций между наличием ДОК в КМ и показателями миелограммы не установлено. В 4 % случаев поражения КМ наблюдалось снижение суммы клеток гранулоцитарного роста ($p = 0,036$).

Заключение. Установлена возможность детекции ДОК в КМ больных НМРЛ. Частота поражения КМ составила 43,5 %. ДОК выявлены даже на ранних стадиях НМРЛ. Обнаружена взаимосвязь поражения КМ и степени дифференцировки опухоли. В сравнении с плоскоклеточным раком легкого более частое поражение наблюдалось при аденокарциноме.

Ключевые слова: диссеминированные опухолевые клетки, костный мозг, немелкоклеточный рак легкого, морфология, проточная цитометрия

Для цитирования: Чулкова С.В., Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М. и др. Обнаружение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных немелкоклеточным раком легкого. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):29–37.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-29-37



DETECTION OF DISSEMINATED TUMOR CELLS IN THE BONE MARROW OF PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

S. V. Chulkova^{1,2}, N. N. Tupitsyn¹, T. M. Djumanazarov¹, A. D. Palladina¹, N. A. Kupryshina¹, O. A. Chernysheva¹,
A. K. Allahverdiev^{3,4}, O. P. Kolbatskaya¹, 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;

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

³Moscow Clinical Scientific and Practical Center of Moscow Department of Healthcare; 86 Shosse Entuziastov, Moscow 111123, Russia;

⁴Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia;
Build 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia

Introduction. There is evidence that disseminated tumor cells (DOCs) in the bone marrow (BM) are precursors of subsequent distant metastases. The detection of DOCs in non-small cell lung cancer (NSCLC) will provide important information about the features of metastasis, as well as the possibilities of identifying new targets for the treatment of NSCLC.

Purpose of the study is to evaluate the possibility of detection DOCs in BM and to identify the frequency of BM involvement in patients with NSCLC.

Materials and methods. Morphological and immunological methods studied 62 BM samples from patients with NSCLC. DOCs analysis was performed using flow cytometry (FACSCanto II, USA, Kaluza Analysis v 2.1 software), monoclonal antibodies to CD45, cytokeratins directly labeled with various fluorochromes were used.

Results. DOCs (EPCAM⁺CD45⁻) in the BM were found in 43.5 % of patients (threshold level: 1 cell per 10 million myelocaryocytes). The presence of DOCs did not correlate with tumor size, lymph node status, stage of the tumor process. The highest detection rates of DOCs were observed at stages IA and IIA: 60.7 % (3/5) and 58.3 % (7/12) respectively. BM involvement in adenocarcinoma was observed in 45 % (15/33) cases, in squamous cell carcinoma — in 37 % (10/27) samples ($p = 0.501$). It was found that DOCs are more often detected in more differentiated tumors ($p = 0.023$). Significant correlations between the presence of DOCs in the BM and myelogram parameters have not been established. A decrease in the number of granulocyte germ cells was observed in 4 % of BM involvement ($p = 0.036$).

Conclusion. The possibility of detecting DOCs in the BM of NSCLC patients has been established. BM involvement was 43.5 %. DOCs are detected even in the early stages of NSCLC. Relationship between BM involvement and the degree of tumor differentiation was found. More frequent BM involvement was observed in adenocarcinoma compared with squamous cell carcinoma of the lung.

Key words: disseminated tumor cells, bone marrow, non-small cell lung cancer, morphology, flow cytometry

For citation: Chulkova S.V., Tupitsyn N.N., Djumanazarov T.M. et al. Detection of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3):29–37. (In Russ.).

Введение

Немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ) — ведущая причина смертности от злокачественных опухолей в большинстве стран мира. Новейшие достижения лекарственной терапии, основанной на молекулярно-биологических характеристиках опухоли, стали большим прорывом, однако выживаемость больных НМРЛ остается по-прежнему довольно низкой. К сожалению, 5-летний рубеж переживают не более 18 % больных [1].

В настоящее время усилия ученых направлены на разработку различных стратегий повышения эффективности противоопухолевого иммунного ответа, и значительная доля научных исследований посвящена изучению иммунобиологических механизмов гематогенного метастазирования [2–4]. Предметом пристального внимания в этом контексте стали диссеминированные опухолевые клетки (ДОК), которые довольно часто обнаруживаются в костном мозге (КМ) онкологического больного [5–8]. Следует подчеркнуть, что практически у 40 % таких больных имеются ранние стадии опухолевого процесса. КМ требует очень тщательного изучения, поскольку, попадая в него, ДОК вступают во взаимодействие с новым микроокружением, от которого зависит их судьба. В ряде случаев ДОК остаются бездействующими или спящими [9]. Однако они могут избегать иммунного ответа, что в дальнейшем приводит к появлению вторичных опухолей. Существенно нарушая строго контролируемые клеточные и молекулярные меха-

низмы микроокружения, они тем самым способствуют собственному выживанию и образуют метастатическую нишу [10, 11]. Таким образом КМ становится новым прибежищем ДОК, в котором они подвергаются успешной клональной экспансии и параллельной прогрессии [2, 12]. Эти процессы приводят к приобретению ими новых фенотипических признаков. В недавней работе показана гетерогенность ДОК: они экспрессируют на своей поверхности разнообразный набор антигенов [7], что отличает их от первичной опухоли и отражает сложную архитектуру отношений между ДОК и микроокружением. Имеются данные, что ДОК в КМ могут иметь геномные профили, не связанные с первичной опухолью [13]. Это отсылает нас в эпоху, когда в 60-е годы XX в. Л. Фулдсом впервые было постулировано, что опухолевая клетка в результате опухолевой прогрессии необратимо приобретает новые черты, необходимые для ее выживания [14]. Так создаются новые возможности для дальнейших микроэволюционных изменений. Они приводят к повышению независимости роста ДОК от локальных, системных или лечебных воздействий.

На сегодняшний день имеются высокочувствительные иммунологические методы, накоплен богатый опыт детекции ДОК. Установлена возможность количественного определения ДОК и их фенотипической характеристики [7]. Поражение КМ и роль ДОК как фактора неблагоприятного прогноза показаны при раке молочной железы [6, 15], раке желудка [16], меланоме [7]. Что касается НМРЛ, данные пока противоречивы [8].

Идентификация и характеристика ДОК позволили получить важную информацию о механизмах метастазирования, что привело к лучшему пониманию молекулярных изменений и профилей, лежащих в основе лекарственной устойчивости опухолей [17]. В связи с этим ДОК рассматриваются как возможная мишень для лекарственной терапии [18], ведь вместо ожидания появления метастазов целесообразнее нацеливаться на метастатические семена еще до того, как они прорастут. Уже положено начало исследованиям, направленным на разработку схем для предотвращения активации и пролиферации ДОК, в особенности у больных с высоким риском рецидива, а также у пациентов с полным ответом на лечение. Предварительные клинические и лабораторные данные свидетельствуют об эффективности этой стратегии при раке желудка и некоторых эндокринозависимых опухолях [19].

Установлен ряд особенностей гемопоэза у онкологических больных [20], что может служить основанием для более глубокого понимания поведения ДОК в условиях костномозгового микроокружения.

Таким образом, изучение КМ при НМРЛ и возможности детекции ДОК представляет существенный интерес. Анализ ДОК и их взаимосвязи с клинико-морфологическими характеристиками опухоли позволит глубже понять закономерности опухолевого роста и оценить возможности выявления новых мишеней для лекарственной терапии.

Цель исследования — оценить возможность детекции ДОК в КМ у больных НМРЛ, а также проанализировать частоту поражения и взаимосвязь с клинико-морфологическими параметрами опухоли.

Материалы и методы

В данное исследование были включены 62 больных НМРЛ, которые получали лечение в условиях ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с 2018 по 2019 г. Возраст больных варьировал от 17 до 80 лет, средний возраст составил 63 года. В исследовании участвовали 48 (77,4 %) мужчин и 14 (22,6 %) женщин. Всем больным было выполнено хирургическое пособие, за исключением 1 случая, в котором провели биопсию. В табл. 1 представлено распределение больных по стадиям.

Согласно данным патоморфологического заключения у 27 (43,5 %) больных диагностирован плоскоклеточный рак, у 33 (53,3 %) пациентов — аденокарцинома, в 2 (3,2 %) случаях — другие гистологические формы. Преобладали опухоли умеренно дифференцированные (G2) — 50 % ($n = 31$), высокодифференцированные опухоли (G1) наблюдались в 6,5 % ($n = 4$), низкая степень дифференцировки (G3) отмечена в 32 % случаев ($n = 20$) (рис. 1). В 7 случаях G не определено.

Таблица 1. Распределение больных немелкоклеточным раком легкого по стадиям

Table 1. The distribution of patients with non-small cell lung cancer in stages

Стадия Stages	Число больных Number of patients	%
IA	5	8,2
IB	13	21,0
IIA	12	19,5
IIB	9	14,5
IIIA	13	21,0
IIIB	4	6,5
IV	6	9,7
Всего Total	62	100

Образец КМ получен путем стеральной пункции во время хирургического вмешательства. Объем костномозгового пунктата не превышал 1,0 мл, поскольку при большем объеме возрастала вероятность разбавления образца периферической кровью. Изучение КМ проводилось 2 методами: морфологическим и иммунологическим. Морфологическое исследование выполнялось на 6 стеклах, окрашенных по методу Романовского. Подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток осуществлялись одновременно 2 морфологами. Для иммунологической оценки наличия ДОК в КМ использовались моноклональные антитела к цитокератинам EPCAM (Becton Dickinson, США) и KL-1 (Immunotech, Франция), CD45, меченные напрямую различными флуорохромами: FITC, PE, V500, V450, PerCP. Сбор клеток проводили на проточном цитометре FACSCanto II, США. Анализировали результаты с помощью программы Kaluza Analysis v 2.1 (Beckman Coulter, USA). Оценивалось 20 млн миелокариоцитов (или все клетки образца). ДОК выявлялись по отсутствию экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией EPCAM или KL-1.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 18.

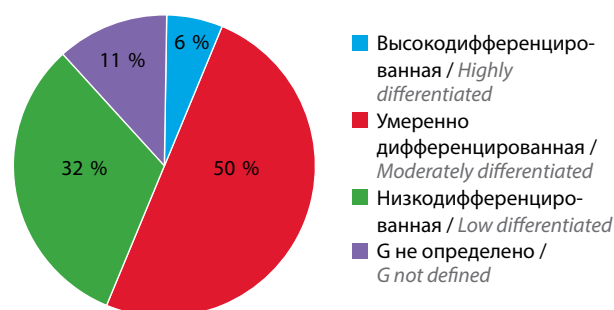


Рис. 1. Степень дифференцировки опухоли

Fig. 1. The degree of tumor differentiation

Результаты и обсуждение

В морфологический анализ пунктатов КМ были включены подсчет миелограммы и поиск опухолевых клеток. Морфологически ДОК в КМ выявлены только в 1 из 62 случаев. При иммунологической оценке наличия ДОК в КМ за пороговый уровень была принята 1 опухолевая клетка на 10 млн миелокариоцитов. С учетом заданного порогового значения на основании яркой экспрессии EPCAM и отсутствия экспрессии CD45, ДОК (CD45⁻ EPCAM⁺) выявлены в 43,5 % образцов КМ ($n = 27$) (рис. 2).

Одна эпителиальная (опухолевая) клетка среди 10 млн миелокариоцитов в образцах КМ выявлена у 9 (14 %) больных. В остальных случаях количество опухолевых клеток, определяемых иммуноцитологически, варьировало от 2 до 242. Четкий кластер опухолевых клеток (микрометастаз) диагностирован у 2 (3,2 %) из 62 больных НМРЛ. Наибольшее количество ДОК в КМ наблюдалось у больного со стадией ПА (T2aN1M0) плоскоклеточного рака легкого (рис. 3). Морфологически микрометастазы у этих 2 больных не установлены.

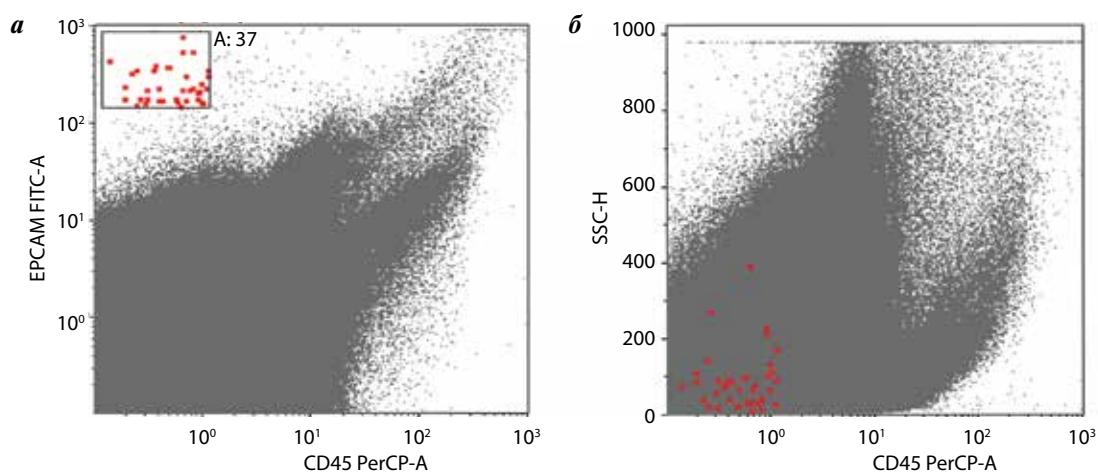


Рис. 2. Выявление диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больного немелкоклеточным раком легкого методом проточной цитометрии: а — в гейте А диссеминированные опухолевые клетки наблюдались на основании экспрессии EPCAM (ось Y) и отсутствия CD45 (ось X); б — отсутствие экспрессии CD45 (ось X) и низкие характеристики бокового светорассеяния SSC (ось Y) диссеминированных опухолевых клеток

Fig. 2. Detection disseminated tumor cells in the bone marrow of non-small cell lung cancer patients by flow cytometry: a — in gate A disseminated tumor cells was observed based on the expression of EPCAM (Y axis) and the absence of CD45 (X axis); б — shows the absence of CD45 expression (X axis) and low lateral light scattering characteristics SSC (Y axis) disseminated tumor cells

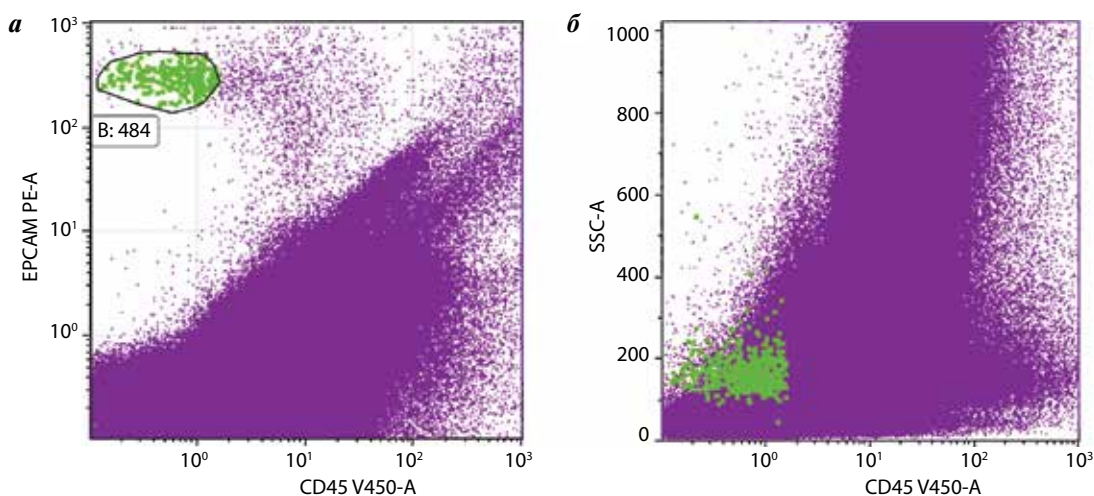


Рис. 3. Диссеминированные опухолевые клетки (ДОК) в костном мозге больного Ж. На данном рисунке показан пример обнаружения кластера ДОК немелкоклеточного рака легкого: а — ДОК (484 клетки) наблюдались на основании яркой экспрессии EPCAM в гейте А (ось Y) и отсутствия CD45 (ось X) в сочетании с низкими характеристиками бокового светорассеяния SSC ДОК (цитограмма б — ось Y)

Fig. 3. Disseminated tumor cells (DTCs) in the bone marrow of patient Zh. This figure shows an example of the detection of DTCs cluster non-small cell lung cancer: а — DTCs (gate A — 484 cells) were observed based on the bright expression of EPCAM (Y axis) in and the absence of CD45 (X axis) in combination with low lateral light scattering characteristics SSC (cytogram б — Y axis)

Таблица 2. Поражение костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого в зависимости от распространенности опухолевого процесса

Table 2. Bone marrow involvement in patients with non-small cell lung cancer depending on the tumor spread

Стадия Stage	Диссеминированные опухолевые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
IA	2	40,0	3	60,0	5	100,0
IB	8	61,5	5	38,5	13	100,0
IIA	5	41,7	7	58,3	12	100,0
IIB	5	55,6	4	44,4	9	100,0
IIIA	9	69,2	4	30,8	13	100,0
IIIB	3	75,0	1	25,0	4	100,0
IV	3	50,0	3	50,0	6	100,0
Всего Total	35	56,5	27	43,5	62	100,0

Примечание. Статистическая значимость: $p = 0,475$.

Note. Statistical significance: $p = 0,475$.

При использовании порогового уровня «1 клетка на 1 млн миелокариоцитов» ДОК выявлены в 4 (6,65 %) образцах КМ. При этом в 2 случаях наблюдалась II стадия НМРЛ, в равной степени аденокарцинома и плоскоклеточный рак. При использовании порогового уровня «1 клетка на 100 тыс. миелокариоцитов» наличие ДОК в КМ установлено в 1 случае, как уже было упомянуто, у больного с ПА-стадией (T2aN1M0).

Нами не установлено достоверной связи между наличием ДОК в КМ (1 клетка на 10 млн миелокариоцитов) и возрастом, полом больных. В работе проведен анализ взаимосвязи поражения КМ и клинкоморфологических характеристик первичной опухоли. Частота обнаружения ДОК в КМ в зависимости от стадии опухолевого процесса представлена в табл. 2. Как видно, даже на начальных стадиях среди миелокариоцитов присутствуют опухолевые клетки. Данный факт свидетельствует о раннем процессе гема-

Таблица 3. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в зависимости от размера первичной опухоли

Table 3. Frequency of detection of disseminated tumor cells depending on the size of the primary tumor

Стадия Stage		Диссеминированные опухоле- вые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
		Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
		Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
pT	T1	2	28,6	5	71,4	7	100,0
	T2	21	56,8	16	43,2	37	100,0
	T3	7	63,6	4	36,4	11	100,0
	T4	5	71,4	2	28,6	7	100,0
Всего Total		35	56,5	27	43,5	62	100,0

тогенного микрометастазирования. Наибольшая частота обнаружения ДОК наблюдалась при IA- и ПА-стадиях и составила 60,7 и 58,3 % соответственно.

Далее нами проанализирована связь между размером первичной опухоли, количеством пораженных лимфоузлов и наличием ДОК в КМ (табл. 3). Подавляющее большинство ДОК-положительных случаев (71,4 %, 5 из 7) наблюдалось при стадии T1. При стадии T2 частота поражения КМ составляла 43,2 %. При больших размерах опухоли ДОК выявлялись реже: 36,4 и 28,6 % соответственно при стадиях T3 и T4 ($p = 0,130$). Достоверной зависимости ДОК-статуса от размеров опухоли не выявлено.

В нашем исследовании в тех случаях, когда регионарные лимфатические узлы были интактны, в 46,4 % (13 из 28) образцов КМ обнаруживались ДОК. Поражение КМ при N1 наблюдалось у 42,1 % (8 из 19) больных, а при N2 и N3 – в 33,3 % (4 из 12) и 100 % (2 из 2) случаев соответственно, при этом отличия были статистически незначимы. Следует обратить внимание, что в исследовании преобладали больные с поражением лимфатических узлов (53 %).

Отдаленные метастазы (M1) в исследовании установлены в 6 случаях. Поражение КМ наблюдалось при этом у 50 % (3 из 6) больных. У этих пациентов количество выявленных опухолевых клеток составило в среднем 5 на 10 млн миелокариоцитов.

Оценка наличия ДОК в КМ в зависимости от гистологического вида опухоли обнаружила, что поражение КМ чаще наблюдалось при аденокарциноме

Таблица 4. Поражение костного мозга в зависимости от гистологического типа немелкоклеточного рака легких

Table 4. Bone marrow involvement depending on the histological type of non-small cell lung cancer

Гистологи- ческий вид опухоли Histological type of tumor	Диссеминированные опухо- левые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
Плоскокле- точный Squamous	17	63,0	10	37,0	27	100,0
Аденокарци- нома Adenocarcinoma	18	54,5	15	45,5	33	100,0
Всего Total	35	58,3	25	41,7	60	100,0

(45,5 %) (табл. 4). При плоскоклеточном раке опухолевые клетки выявлены в 37 % образцов. Различия недостоверны: $p = 0,501$.

При анализе частоты поражения КМ в зависимости от степени дифференцировки опухоли установлена связь ($p = 0,023$) с данным признаком (табл. 5). Как видно из таблицы, наибольшая частота выявления ДОК отмечена при высокодифференцированном раке (G1). При низкой дифференцировке ДОК выявлялись у 8 из 20 больных, что составило 40 %. Аналогичные данные получены в исследовании W. Sienel и соавт., в котором ДОК значительно чаще (32 %) выявлялись в КМ при более дифференцированных опухолях (G1–G2), чем при опухолях с низкой дифференцировкой (4 %) G3–G4, $p = 0,03$ [21].

Таким образом, по результатам анализа взаимосвязи ДОК-статуса и морфологических характеристик опухоли оказалось, что поражение КМ преимущественно наблюдается при более дифференцированных опухолях. Последний факт весьма интересен и требует более глубокого изучения в большей когорте. Возможно, пациенты НМРЛ с подобными типами опухолей будут нуждаться в иной схеме терапии.

Согласно имеющимся данным об особенностях гранулоцито- и эритропоэза у онкологических больных, у которых выявлены ДОК, нами также проведена оценка показателей миелограмм больных НМРЛ в зависимости от наличия поражения КМ и от количества обнаруженных в нем опухолевых клеток. При анализе средних значений достоверных отличий в группах с наличием и отсутствием ДОК в КМ не выявлено. Однако обращает на себя внимание более низкая клеточность при поражении КМ. В исследо-

Таблица 5. Частота выявления диссеминированных опухолевых клеток в зависимости от степени дифференцировки опухоли

Table 5. Frequency of detection of disseminated tumor cells depending on the degree of tumor differentiation

Степень дифференцировки опухоли The degree of tumor differentiation	Диссеминированные опухолевые клетки Disseminated tumor cells				Всего Total	
	Отсутствуют Absent		Присутствуют Present			
	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%	Абс. Abs.	%
Низкая G3 Low G3	12	60,0	8	40	20	100,0
Умеренная G2 Moderate G2	20	64,5	11	35,5	31	100,0
Высокая G1 High G1	0	0,0	4	100,0	4	100,0
Всего Total	32	60,4	23	39,6	55	100,0

вании Д.А. Рябчикова и соавт. при раке молочной железы показано, что при ДОК-положительном статусе содержание миелокариоцитов в 1,6 раза достоверно ниже, чем при отсутствии ДОК [6]. Также нельзя не отметить, что лейкоэритронормобластическое соотношение более высокое при наличии поражения КМ, хотя различия статистически незначимы. Подобный факт, но с достоверным отличием, отмечен в исследовании КМ при меланоме [7].

Изучив таблицы сопряженности признаков, мы отметили, что в группе больных НМРЛ, у которых имелось поражение КМ, только в 4 % случаев наблюдалось снижение суммы клеток гранулоцитарного ростка ($p = 0,036$) по сравнению с группой без ДОК (12,5 %). Аналогичные результаты получены в исследовании по меланоме, но в большем количестве случаев [7]. Возможно, что выявленные закономерности касаются более поздних стадий, поскольку в нашем исследовании преобладали больные с ранними стадиями. Промиелоциты были снижены у 72 % больных НМРЛ при наличии ДОК, а при отсутствии — у 84,4 %. Снижение уровня миелоцитов наблюдалось лишь в 8 % случаев при поражении КМ против 18,8 %. У подавляющего большинства (68 %) больных, в КМ которых установлено наличие ДОК, был снижен индекс созревания гранулоцитов.

Что касается эритроидного ростка, то в 44 % ДОК-положительных случаев у больных НМРЛ отмечено снижение полихроматофильных форм по сравнению с ДОК-отрицательными (56,3 %). Уровень оксифильных нормобластов был повышен в 72 % образцов КМ, в котором присутствовали ДОК, а при отрицательных случаях — в 58,1 %. При этом

в 24 % ДОК-положительных случаев сумма клеток эритроцитарного ростка была снижена, а лейкоэритронормобластическое соотношение повышено более чем у половины больных: 14 (56 %) из 25.

Отдельно был проведен анализ показателей миелограмм в тех случаях, в которых ДОК выявлены на 1 млн миелокариоцитов. Статистически значимых отличий при этом с ДОК-отрицательным статусом не установлено. Однако следует отметить, что клеточность у 3 (75 %) больных с поражением КМ была в норме, у всех наблюдалось повышение количества бластных клеток, миелоциты в 3 случаях были в норме. Повышение оксифильных форм отмечено у 3 (63,5 %) больных, повышение индекса созревания эритроцитов – у 75 % против 66 %. Лейкоэритронормобластическое соотношение в образцах с поражением КМ было повышено в 50 % случаев (против 60 %).

Резюмируя проведенный анализ наличия взаимосвязи гранулоцито- и эритроцитопоеза, следует отметить, что есть тенденция к перестройке костномозгового микроокружения ДОК, однако не все описанные наблюдения носили достоверный характер. Тем не менее полученные факты необходимо принять во внимание и подвергнуть дальнейшему изучению, поскольку в нашем исследовании преобладали больные НМРЛ ранних стадий и количество выявленных ДОК у большинства пациентов не превышало 10 на 20 млн миелокариоцитов. Возможно, изменение в КМ ДОК происходит длительно и зависит также от количества ДОК и их активности. ДОК в КМ могут оставаться бездействующими, приобретая фенотип покоя, и, таким образом, не оказывать влияния на микроокружение. Уже изучены отдельные молекулярные генетические механизмы, обеспечивающие такой фенотип ДОК в КМ [23]. Кроме того, важно учитывать, что гетерогенность популяции ДОК также может определять степень изменений гемопоэза.

Данные об изменениях гемопоэза КМ, полученные в других исследованиях, несомненно, свидетельствуют о том, что миело- и эритропоэз участвуют в опу-

холевом процессе, и их перестройка вполне вероятно способствует длительной персистенции ДОК в КМ.

Заключение

Идентификация ДОК и возможность их характеристики позволяют получить важную информацию о механизмах метастазирования, лучше понять изменения, лежащие в основе лекарственной устойчивости опухолей. С учетом растущей роли иммунотерапии НМРЛ анализ ДОК, их взаимодействие с иммунными клетками, местом генерации которых служит КМ, становятся предметом интенсивных исследований.

В данной работе установлена возможность детекции ДОК у больных НМРЛ. Выявление поражения КМ проводилось на основании отсутствия экспрессии общего лейкоцитарного антигена CD45 в сочетании с экспрессией ЕРСАМ или KL-1. Частота выявления ДОК у больных НМРЛ составила 43,5 %, что сопоставимо с результатами детекции ДОК при других опухолях. При этом она была выше на ранних стадиях опухолевого процесса. Данный факт свидетельствует, что процесс гематогенного микрометастазирования – раннее событие в опухолевой прогрессии НМРЛ. В отдельных случаях установлены четкие кластеры ДОК в КМ. При аденокарциноме частота выявления ДОК в КМ больных НМРЛ была выше. Установлена связь поражения КМ со степенью дифференцировки опухоли. Изложенные факты представляются интересными и требуют дальнейшего изучения с целью оценки прогностической значимости ДОК при НМРЛ и анализа выбора ресурсов иммунотерапии.

Доказанная взаимосвязь поражения КМ с неблагоприятным прогнозом при ряде опухолей, а именно с плохой общей и безрецидивной выживаемостью, нацеливает ученых на разработку стратегий, направленных на предотвращение активации и пролиферации ДОК. Таким образом, на сегодняшний день ДОК рассматриваются как перспективная мишень для лекарственной терапии и НМРЛ не является исключением.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. American Cancer Society. Cancer Fact and Figures. 2018.
2. Sai B., Xiang J. Disseminated tumor cells in bone marrow are the source of cancer relapse after therapy. *J Cell Mol Med* 2018;22:5776–86. DOI: 10.1111/jcmm.13867.
3. Pein M., Hongu T., Riedel A. et al. Metastasis-initiating cells induce and exploit a fibroblast niche to fuel malignant colonization of the lungs. *Nat Commun* 2020;11(1):1494. DOI: 10.1038/s41467-020-15188-x.
4. Маркина И.Г., Тупицын Н.Н., Михайлова И.Н., Демидов Л.В. Гематогенное метастазирование опухолей: ключевые моменты и эволюционирующие парадигмы. *Иммунология гемопоэза* 2018;6(1):109–32. [Markina I.G., Tupitsyn N.N., Mikhailova I.N., Demidov L.V. Hematogenous tumor metastasis: key points and evolving paradigms. *Immunologiya gemopoeza = Hematopoiesis Immunology* 2018;6(1):109–32. (In Russ.).]
5. Тупицын Н.Н. Костный мозг онкологического больного: стадирование опухолей, гемопоэз, иммунная система. *Иммунология гемопоэза* 2018;16(2):10–54. [Tupitsyn N.N. Bone marrow of a cancer patient: staging of tumors, hematopoiesis, immune system. *Immunologiya gemopoeza =*

- Hematopoiesis Immunology 2018;16(2):10–54. (In Russ.)).
6. Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57. [Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal 2018;17(1):53–7. (In Russ.)].
 7. 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.
 8. Pantel K., Alix-Panabieres C. Bone marrow as a reservoir for disseminated tumor cells: a special source for liquid biopsy in cancer patients. Bonekey Rep 2014;3:584. DOI: 10.1038/bonekey.2014.79.
 9. Dasgupta A., Lim A.R., Ghajar C.M. Circulating and disseminated tumor cells: harbingers or initiators of metastasis? Mol Oncol 2017;11:40–61. DOI: 10.1002/1878-0261.12022.
 10. Zarrer J., Haider M.-T., Daniel J. et al. Pathological crosstalk between metastatic breast cancer cells and the bone microenvironment. Biomolecules 2020;10(2):337. DOI: 10.3390/biom10020337.
 11. Price T.T., Burness M.L., Sivan A. et al. Dormant breast cancer micrometastases reside in specific bone marrow niches that regulate their transit to and from bone. Sci Transl Med 2016;8(340):340ra73. DOI: 10.1126/scitranslmed.aad4059.
 12. Klein C.A. Parallel progression of primary tumours and metastases. Nat Rev Cancer 2009;9(4):302–12. DOI: 10.1038/nrc2627.
 13. Demeulemeester J., Kumar P., Möller E.K. et al. Tracing the origin of disseminated tumor cells in breast cancer using single-cell sequencing. Genome Biol 2016;17:250. DOI: 10.1186/s13059-016-1109-7.
 14. Foulds L. The natural history of cancer. J Chronic Dis 1958;8(1):2–37. DOI: 10.1016/0021-9681(58)90039-0.
 15. Тупицын Н.Н. Циркулирующие и диссеминированные раковые клетки при раке молочной железы и раке яичников. Онкогинекология 2013;(1):12–8. [Tupitsyn N.N. Circulating and disseminated tumor cells in breast cancer and ovarian cancer. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2013;(1):12–8. (In Russ.)].
 16. Бесова Н.С., Обаревич Е.С., Давыдов М.М. и др. Прогностическое значение диссеминированных опухолевых клеток в костном мозге больных диссеминированным раком желудка до начала противоопухолевой терапии. Фарматека 2017;17(350):62–6. [Besova N.S., Obarevich E.S., Davydov M.M. et al. The prognostic value of disseminated tumor cells in the bone marrow of patients with disseminated gastric cancer before the start of antitumor therapy. Farmateka 2017;17(350):62–6. (In Russ.)].
 17. Mohme M., Riethdorf S., Pantel K. Circulating and disseminated tumour cells – mechanisms of immune surveillance and escape. Nat Rev Clin Oncol 2017;14(3):155–67. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.144.
 18. Ghajar C.M. Metastasis prevention by targeting the dormant niche. Nat Rev Cancer 2015;15(4):238–47. DOI: 10.1038/nrc3910.
 19. Nicolini A., Rossi G., Ferrari P., Carpi A. Minimal residual disease in advanced or metastatic solid cancers: the G0–G1 state and immunotherapy are key to unwinding cancer complexity. Semin Cancer Biol 2020;S1044–579X(20):30075–4. DOI: 10.1016/j.semcancer.2020.03.009.
 20. Tupitsyn N.N., Mkrtchyan V.A., Palladina A.D. et al. Bone marrow lymphocyte populations of innate immunity in breast cancer patients. GJMR-F 2020;20(2):20–2.
 21. Sienel W., Mecklenburg I., Dango S. et al. Detection of MAGE-A transcripts in bone marrow is an independent prognostic factor in operable non-small-cell lung cancer. Clin Cancer Res 2007;13(13):3840–7. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2507.
 22. Johnson R.W., Finger E.C., Olcina M.M. et al. Induction of LIFR confers a dormancy phenotype in breast cancer cells disseminated to the bone marrow. Nat Cell Biol 2016;18(10):1078–89. DOI: 10.1038/ncb3408.

Вклад авторов

С.В. Чулкова: написание текста рукописи, анализ данных;
Н.Н. Тупицын: дизайн исследования, анализ данных и рукописи;
П.В. Кононец, А.К. Алахвердиев: анализ рукописи;
Т.М. Джуманазаров: сбор материала, обзор публикаций, оформление рукописи;
А.Д. Палладина, О.А. Чернышева: получение и анализ данных; обзор публикаций;
О.П. Колбаская, Н.А. Купрышина: анализ костного мозга, подготовка рукописи, перевод.

Authors' contributions

S.V. Chulkova: writing manuscript text, data analysis;
N.N. Tupitsyn: research design, data analysis and manuscript;
P.V. Kononetz, A.K. Allakhverdiev: manuscript analysis;
T.M. Djumanazarov: data collection, review of publications, manuscript design;
A.D. Palladina, O.A. Chernysheva: receiving and analyzing data, review of publications;
O.P. Kolbatskaya, N.A. Kupryshina: bone marrow analysis, 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. Djumanazarov: <https://orcid.org/0000-0001-5029-1406>
А.К. Алахвердиев/A.K. Allakhverdiev: <https://orcid.org/0000-0001-8378-2738>
О.П. Колбаская/O.P. Kolbatskaya: <https://orcid.org/0000-0001-8493-9012>

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: 27.04.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.
Article submitted: 27.04.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.

ЗНАЧЕНИЕ БАЗАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕМОКСИГЕНАЗЫ-1 ДЛЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ *IN VITRO*

Т.А. Сидорова, Э.Ш. Соломко, Ю.А. Хоченкова, А.А. Прокофьева, Д.А. Хоченков

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

Контакты: Татьяна Александровна Сидорова tatsid@yahoo.com

Введение. Молекулярная основа механизма действия радио- и фотодинамической терапии, а также ряда противоопухолевых химиопрепаратов — окислительный стресс (OS). Фермент гемоксигеназа-1 (HO-1), молекулярный маркер OS — ключевой участник системы защиты и адаптации опухолевых клеток в условиях стресса.

Цель исследования — выяснить, зависит ли чувствительность опухолевых клеток меланомы человека к OS от базального и индуцированного модуляторами уровня экспрессии гена HO-1.

Материалы и методы. В работе были использованы опухолевые клетки меланомы человека разных линий. Экспрессию мРНК HO-1 в клетках изучали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени, содержание активных форм кислорода в клетках — методом проточной цитометрии, цитотоксичность препаратов — с применением МТТ-метода.

Результаты. По нашим данным, клетки меланомы человека имеют разные по величине базальные уровни транскрипции HO-1: высокий (3,0–3,5 о. е.) у линий MelIL, MelP, средний (1,5 о. е.) у линий MeWo, MelZ, MelIbr и низкий (0,5 о. е.) у MelMe, A375. Установлено, что чувствительность клеток к H_2O_2 , индуктору OS, не зависит от величины базальной экспрессии HO-1. Гемининдуцированное увеличение базальной экспрессии HO-1 обнаружено только в клетках меланомы со средним (MeWo) и низким (A375) уровнями этого параметра и сопровождается увеличением их устойчивости к H_2O_2 (в 2 раза). Определено, что репрессия HO-1 в присутствии апигенина регистрируется в клетках меланомы с разным базальным уровнем, однако сенситизация к H_2O_2 (2–4 раза) наблюдалась только для клеток со средним (MeWo) и низким (A375) уровнями базальной экспрессии HO-1. Выявлено, что снижение базальной экспрессии HO-1, индуцированное апигенином, сопровождается увеличением содержания активных форм кислорода в клетках и вносит вклад в увеличение чувствительности их к H_2O_2 .

Заключение. Результаты нашего исследования показывают значение природного флавонола апигенина в качестве модулятора экспрессии HO-1.

Ключевые слова: меланома человека, гемоксигеназа-1, гемин, апигенин

Для цитирования: Сидорова Т.А., Соломко Э.Ш., Хоченкова Ю.А. и др. Значение базальной экспрессии гемоксигеназы-1 для чувствительности клеток меланомы человека к окислительному стрессу *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):38–45.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-38-45



THE VALUE OF BASAL EXPRESSION LEVEL OF HEMOXYGENASE-1 FOR SENSITIVITY OF HUMAN MELANOMA CELLS TO OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

T.A. Sidorova, E.Sh. Solomko, Yu.A. Khochenkova, A.A. Prokofieva, D.A. Khochenkov

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. The molecular basis of radio- and photodynamic therapy (PDT), the mechanism of action of a number of antitumor chemotherapy drugs is oxidative stress (OS). The enzyme hemoxygenase-1 (HO-1), a molecular marker of OS, is a key participant in the system of protection and adaptation of tumor cells under stress.

Objective. To find out whether the sensitivity of human melanoma tumor cells to OS depends on the basal and modulator-induced levels of HO-1 expression

Material and methods. Human melanoma cell lines were used in the study. The expression of mRNA HO-1 in cells was studied by real-time RT-PCR, the reactive oxygen species content in cells — by flow cytometry and the cytotoxicity of drugs — by MTT assay.

Results. According to our data, human melanoma cells have different basal levels of *HO-1* transcription: high (3.0–3.5 o. u.) in lines *MelIL*, *MelP*, medium (1.5 o. u.) in lines *MeWo*, *MelZ*, *MelIbr* and low (0.5 o. e.) – *MelMe*, *A375*. There is no direct correlation between the level of basal cell expression of *HO-1* and their sensitivity to the OS inducer – H_2O_2 . The hemin-induced increase in *HO-1* expression in cells is accompanied by doubled resistance to H_2O_2 . It was found that *HO-1* repression in the presence of apigenin was registered in melanoma cells with different basal levels, but sensitization to H_2O_2 (2–4 times) was observed only for cells with medium (*MeWo*) and low (*A375*) levels of basal *HO-1* expression. It was found that the decrease in basal expression of *HO-1* induced by apigenin is accompanied by an increase in the reactive oxygen species content in cells.

Conclusions. The results of our research allow us to recommend natural flavon apigenin, a modulator of *HO-1* expression, for inclusion in the chemotherapy and PDT regimens to increase the effectiveness of human melanoma treatment.

Key words: human melanoma cell lines, hemoxygenase-1, hemin, apigenin

For citation: Sidorova T.A., Solomko E.Sh., Khochenkova Yu.A. et al. The value of basal expression level of hemoxygenase-1 for sensitivity of human melanoma cells to oxidative stress in vitro. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3):38–45. (In Russ.).

Введение

Меланома кожи (МК) – распространенное злокачественное новообразование кожных покровов, которое обладает способностью быстро метастазировать и слабой чувствительностью к химиотерапии вследствие активирующих мутаций, что определяет причину высокой смертности больных [1]. В основе низкой эффективности химиотерапии МК лежит исходная устойчивость опухолевых клеток к цитостатикам: алкилирующим препаратам (дакарбазин, темозоломид), препаратам платины, винкалкалоидам [2]. Полагают, что молекулярные механизмы исходной устойчивости клеток меланомы к химиотерапии приобретаются в процессе опухолевого патогенеза и могут быть связаны с воздействием внешних факторов, в первую очередь ультрафиолетового (УФ) излучения. Установлено, что молекулярно-биологические изменения в меланоцитах, индуцированные УФ-излучением, играют роль в развитии МК [3]. УФ-излучение, взаимодействуя с эндогенными хромофорами, такими как нуклеиновые кислоты, белки, порфирины, флавины и меланин, становится триггером биологических процессов в клетках кожи: специфических мутаций и окислительного стресса (OS), развивающегося в клетке вследствие нарушения баланса окислителей-восстановителей.

Эндогенные хромофоры – источники активных форм кислорода (ROS), таких как супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), радикал гидроксила ($OH^{\cdot}$) и H_2O_2 . Известно, что ROS при низких концентрациях становятся медиаторами в сигнальных процессах клетки [4], но их гиперпродукция может привести к активации этих путей, вызывая стимуляцию пролиферации или апоптоз [5]. Полагают, что ROS как регуляторы сигнальных путей клетки могут быть вовлечены в патогенез меланомы [6].

В условиях длительного стресса (УФ), сопровождаемого накоплением ROS в клетках, вырабатываются защитные механизмы, необходимые для их адаптации и выживания. Развитие OS сопровожда-

ется повреждением гемопротеинов, и, как следствие, в клетке появляется «свободный» гем. Для защиты от избытка «гемового» железа в клетке активируется система гемоксигеназа-1 (HO-1)/ферритин (Ft). Установлено, что УФ является индуктором экспрессии HO-1 (мРНК/белка) в опухолевых клетках [7].

Можно предположить, что в ходе адаптации к стрессорному УФ-воздействию меланоциты, предшественники меланомы, приобретают для защиты от OS конститутивно-активную систему *HO-1/Ft* с «канонической» функцией, участвующей в поддержании гомеостаза внутриклеточного пула железа. Кроме того, нельзя исключить существование в клетках меланомы «неканонических» изоформ HO-1, которые в ряде опухолевых клеток вовлечены в регуляцию транскрипции генов (ядерная изоформа HO-1) [8] или в пролиферативную активность (цитоплазматический вариант HO-1, индуцируемый ультрафиолетом) [9].

Ранее нами было показано, что миеломонобласты человека линии U937, имеющие базальный уровень экспрессии *HO-1*, оказались в 2 раза устойчивее к воздействию H_2O_2 по сравнению с эритробластами линии K562, в которых исходно транскрипция *HO-1* заблокирована. В условиях активации системы HO-1/Ft геминном (FePPIX), сопровождаемой увеличением экспрессии *HO-1* и *Ft*, цитотоксичность H_2O_2 для лейкозных клеток линии U937 снижается [10]. В настоящей работе мы попытались выяснить, существует ли связь между уровнем экспрессии *HO-1* в опухолевых клетках и их чувствительностью к OS.

Цель настоящей работы – исследовать значение уровня транскрипции гена *HO-1* для чувствительности клеток меланомы человека к OS. Нам предстояло определить базальный уровень экспрессии *HO-1* в клетках меланомы человека разных линий, сопоставить величину базальной экспрессии *HO-1* с чувствительностью клеток к H_2O_2 , индуктором OS, выяснить, влияет ли модуляция базальной экспрессии *HO-1* (up-регуляция геминном и down-регуляция

апигенином (Api)) в клетках меланомы на их чувствительность к H_2O_2 .

Материалы и методы

В работе были использованы препараты и химические соединения: TRIzol, MTT, H_2O_2 , FePPIX, Api, 2,7-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA), Hepes, PBS (Sigma, США), дакарбазин (Veropharm, Россия); ферменты: обратная транскриптаза M-MuLV, полимеразы Tag, реакционные буферы (Fermentas, Литва); смесь дезоксинуклеотидов, гексамеры, праймеры для генов синтезированы в компании «Литех» (Россия).

В исследовании использованы культуры клеток меланомы человека линий MelIL, MelP, MelZ, MelIBR, MeWo, MelM, A375 и немелкоклеточного рака легкого линии A549. Для поддержания линий и проведения исследований клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10 % ЭТС, 2 mM глутамин и антибиотики (стрептомицин и пенициллин).

Исследование жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* MTT-методом

Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован MTT-метод, подробно описанный в работе Т.А. Сидоровой и соавт. [11]. Величина IC_{50} — критерий цитотоксичности исследованных препаратов — определена с помощью метода численных решений по 3 экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля 1-й производной экспериментальной кривой выживаемости клеток и представлена в виде $M \pm SD$. Для оценки эффективности модулятора (М) в комбинации с препаратами использован индекс резистентности (IR), равный отношению: IC_{50} (препарат + М)/ IC_{50} — препарат. Величина $IR > 1,0$ в присутствии нецитотоксических концентраций М (выживаемость клеток не ниже 80 % по сравнению с контрольными клетками) свидетельствовала о снижении чувствительности клеток к химиопрепарату, а величина $IR < 1,0$ — об увеличении чувствительности (сенситизации) клеток.

Исследование экспрессии генов HO-1 и Ft (FHC) в опухолевых клетках методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени

Выделение РНК из клеток и синтез кДНК

Через 6 ч после культивирования с препаратами клетки лизировали реагентом TRIzol из расчета 1 мл на 1×10^6 клеток в соответствии со стандартной методикой. Концентрацию РНК определяли с помощью Quant-IT RNA Assay Kit по протоколу производителя (Invitrogen, США). Для синтеза кДНК брали 250 нг РНК и проводили обратную транскрипцию в конечном объеме смеси 20 мкл с использованием iScript™

Select cDNA Synthesis Kit согласно инструкции (Bio Rad, США). Реакцию проводили при 42 °C в течение 70 мин. Обратную транскриптазу (ревертазу) инактивировали нагреванием реакционной смеси до 85 °C в течение 5 мин. Контроль обратной транскрипции проводили при отсутствии обратной транскриптазы.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени проводилась на Light Cycler 96 (Roche, США) и CFX96 Real-Time System (Bio Rad, США) с использованием коммерческой смеси iTaq® Universal SYBR® Green Supermix согласно протоколу производителя (Bio Rad, США). В качестве матрицы для ПЦР была использована кДНК образцов. Уровень экспрессии мРНК HO-1 и FHC определяли путем нормализации образцов к референсным генам (β -актином и глицеральдегидфосфатдегидрогеназой). ПЦР-реакционная смесь содержала 2 мкл (50 нг) кДНК и 5 пикомоль праймеров, последовательности которых представлены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для анализа уровня экспрессии генов, и размер продукта

Table 1. Oligonucleotide sequences used to analyze gene expression levels and product sizes

Название гена Gene name	Последовательность прямого (F)/ обратного (R) праймеров Forward (F)/Reverse (R) primer sequence	Размер продукта Product size
HO-1	F: 5'-CGGGCCAG CAACAAAGTG-3' R: 5'-AGTGTAAGGA CCCATCGGAGAA-3'	107 п. н. 107 п. р.
hFHC	F: 5'-GTAACGCCAGT TCACCATCAGGAGTACT-3' R: 5'-TTTCCAAATGTAATGC ACACTCCATT-3'	276 п. н. 276 п. р.
GAPDH	F: 5'-GGGGAGCCAAAG GGTCATCATCT-3' R: 5'-GACGCCTGCTTCACC ACCTTCTTG-3'	212 п. н. 212 п. р.
β -actin	F: 5'-GTGGGGCGCCCC AGGCACCA-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCAC GCACGATTTC-3'	201 п. н. 201 п. р.

Условия амплификации: предварительная обработка: 5 мин при 95 °C, последующие 39 циклов: 95 °C — 5 с; 60 °C — 30 с; 72 °C — 30 с. Анализ кривых плавления проводили путем детекции флуоресценции при постепенном нагревании образцов до 95 °C с шагом 0,5 °C в секунду. Все образцы анализировались в триплетах в 96-луночных низкопрофильных планшетах. Результаты количественной ПЦР с обратной транскрипцией представлены 2-й производной от среднего значения

порогового цикла в триплете для каждого образца ($\Delta\Delta Ct$).

Исследование внутриклеточного уровня ROS

Базальный и индуцированный препаратами (Ari, H_2O_2) уровни ROS в клетках определяли с помощью красителя DCFH-DA согласно методике, описанной ранее [10]. Клетки рассеивали на 6-луночные планшеты в концентрации $500 \times 10^5/3$ мл среды, после образования монослоя (12 ч) в соответствующие лунки добавляли Ari (35 мкМ), H_2O_2 (100, 400 мкМ) и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 в течение 4 ч. После инкубации питательную среду удаляли из лунок, клетки открепляли от подложки с помощью раствора Версена и ресуспендировали в буфере (20 мМ HEPES в PBS), переносили в пробирки типа «Эппендорф», центрифугировали 5 мин при 1800 об/мин и 10 °C. Клетки промывали в 2 мл буфера, центрифугировали и ресуспендировали в 0,5 мл буфера.

Анализ проводили на проточном цитометре Novocyt 2000R (ACEA Biosciences Inc., США), собирая 2×10^4 событий в анализируемый гейт. Интенсивность флуоресценции регистрировали путем установки маркера по отношению к контрольному материалу при $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм.

Результаты и обсуждение

Исследование роли базальной экспрессии HO-1 в клетках меланомы человека разных линий в защите их от OS

Чтобы выяснить, зависит ли чувствительность клеток меланомы человека к OS от уровня базальной экспрессии HO-1, мы определили ее экспрессию на 7 клеточных линиях меланомы человека: MelIL, MelP, MelZ, IBR, MeWo, MelM, A375 (см. табл. 1).

По нашим данным, клетки меланомы человека этих линий имеют разные по величине базальные уровни экспрессии HO-1 (рис. 1). По величине этого параметра можно выделить 3 типа клеток меланомы: с высоким (3–3,5 о. е.) уровнем базальной экспрессии – MelIL, MelP, средним (1,5 о. е.) – MelZ, IBR, MeWo и низким (0,5 о. е.) – MelM, A375.

Для дальнейших исследований мы выбрали 3 линии клеток, представляющие 3 типа базального уровня экспрессии HO-1: MelIL, MeWo и A375, и определили их чувствительность к H_2O_2 , индуктору OS (табл. 2).

Данные получены из 5 независимых экспериментов и представлены в виде среднего ($\pm$ SD).

Оказалось, что токсичность H_2O_2 для клеток с низким уровнем базальной экспрессии HO-1 (A375) была в 2 раза выше (54 ± 8 мкМ) по сравнению с клетками со средним уровнем экспрессии (MeWo) $IC_{50}(H_2O_2) = 24 \pm 3$ мкМ. Однако дальнейшее снижение чувствительности к H_2O_2 не наблюдалось в клетках с высоким уровнем экспрессии HO-1 (MelIL) IC_{50}

(H_2O_2) = 48 ± 1 мкМ. Эти данные свидетельствуют об отсутствии прямой корреляции между уровнем экспрессии HO-1 и чувствительностью к OS, индуцированному H_2O_2 . В то же время результаты наводят на мысль, что в клетках с высоким уровнем экспрессии HO-1, по-видимому, пул мРНК HO-1 предназначен скорее не для HO-1 белка с канонической функцией (поддержание гомеостаза железа в клетке), а для изоформ белка, участвующих в регуляции транскрипции генов [8].

Исследование роли гемининдуцированной экспрессии HO-1 в защите клеток меланомы от OS

По данным, полученным ранее, система HO-1/Ft, чувствительная к регуляции гемом (исходно активная), играет роль в защите лейкозных клеток от OS, индуцированного H_2O_2 [10]. Принимая во внимание эти сведения, мы исследовали способность FePPIX, известного индуктора HO-1, вызывать up-регуляцию HO-1/Ft в клетках меланомы человека с разным базальным уровнем экспрессии мРНК HO-1 (рис. 2).

Согласно данным, представленным на рис. 2а, в присутствии FePPIX базальный уровень экспрессии HO-1 увеличивается в 2 раза в клетках со средним (MeWo) и низким уровнями экспрессии HO-1 (A375) и не изменяется в клетках с исходно высоким уровнем экспрессии HO-1 (MelIL). Известно, что цитопротекторный эффект системы HO-1/Ft обеспечивается коэкспрессией Ft, преимущественно белка тяжелой цепи – FHC. Именно FHC благодаря феррооксидантной активности контролирует прооксидантный эффект лабильного железа, освобожденного из гема. Согласно нашим данным, представленным на рис. 2б, транскрипция гена FHC снижается (в 1,5 раза) в клетках MeWo, увеличивается (в 2 раза) в клетках меланомы A375 и не изменяется в клетках MelIL. Таким образом, по аналогии с лейкозными клетками линии U937 (рис. 2а, б) клетки меланомы линии A375 обладают исходно активной системой HO-1/Ft (на уровне мРНК). Down-регуляция FHC, наблюдаемая в присутствии FePPIX в клетках MeWo, может также

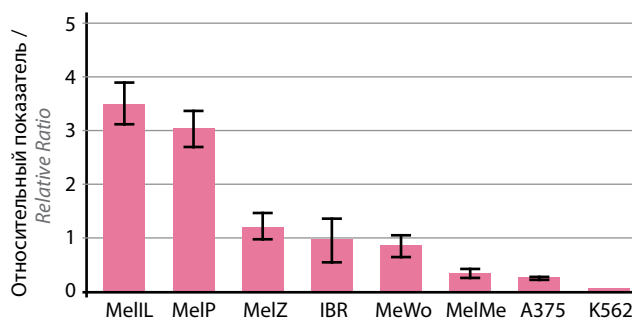
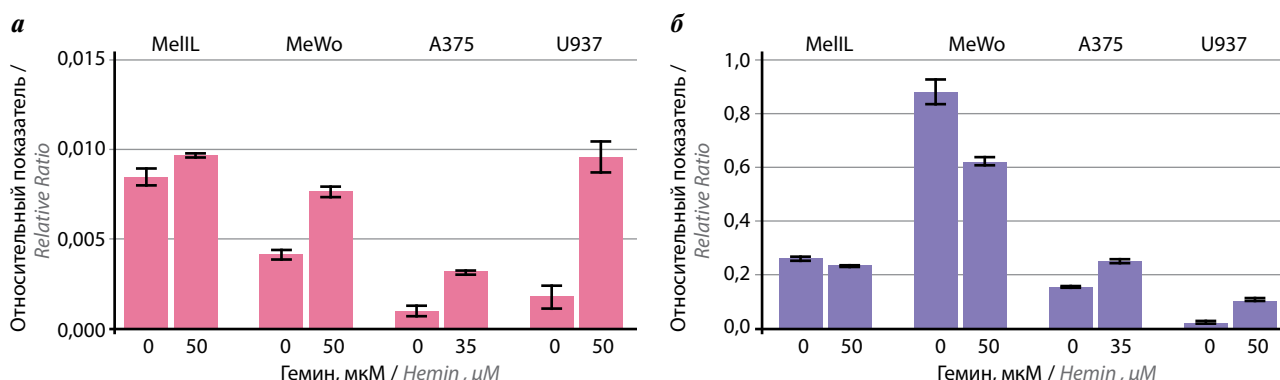


Рис. 1. Базальный уровень экспрессии HO-1 в клетках разных линий меланомы человека

Fig. 1. The level of HO-1 basal expression into human melanoma cell lines

Таблица 2. Влияние модуляторов базальной экспрессии *HO-1* на чувствительность клеток меланомы человека к H_2O_2 Table 2. The influence of modulator induced *HO-1* basal expression on the sensitivity of human melanoma cells to H_2O_2

Линия клеток меланомы человека Human melanoma cell line	$IC_{50} H_2O_2 \pm M/IR$ (мкМ) $IC_{50} H_2O_2 \pm M/IR$ (μM)			$IC_{50} M$ (мкМ) $IC_{50} M$ (μM)	
	–M	+M		FePPIX	Api
	–	+FePPIX	+Api		
A375	24 ± 3	58 ± 6 (2,4 ± 0,5)	17 ± 2 (0,6)	75 ± 6	35 ± 2
MeWo	54 ± 8	96 ± 11 (2,2 ± 0,4)	50 ± 0,5 (0,8)	>100	>100
MelIL	48 ± 1	62 ± 6 (1,3 ± 0,1)	47 ± 2 (1)	>100	>100

Рис. 2. Влияние гемина на экспрессию *HO-1* (а) и *FHC* (б) в клетках меланомы человекаFig. 2. The influence of hemin on *HO-1* (a) and *FHC* (б) gene expression into human melanoma cell lines

свидетельствовать о наличии в них исходно системы *HO-1/Ft*, чувствительной к регуляции гемом. Поскольку промотор гена *Ft* имеет регуляторные участки, чувствительные к железу «гемовой» природы [12, 13], по-видимому, конечный эффект будет зависеть от вида клеток и/или их внутриклеточного контекста.

Влияет ли индукция экспрессии *HO-1* гемом на чувствительность клеток меланомы к H_2O_2 ? Как показано в табл. 2, в условиях активации *HO-1/Ft* FePPIX (35–50 мкМ в течение 5 ч) величина $IC_{50} H_2O_2$ увеличивалась в 2 раза для клеток линий A375 и MeWo и не изменилась для клеток линии MelIL.

Таким образом, токсичность H_2O_2 , индуктора OS, снижается для клеток меланомы, обладающих исходно активной системой *HO-1/Ft*, чувствительной к внутриклеточной концентрации гема. В клетках линии MelIL система *HO-1/Ft* не регулируется гемом, что может свидетельствовать о наличии в этих клетках изоформ *HO-1*, не участвующих в поддержании гомеостаза «гемового» железа.

Исследование чувствительности клеток меланомы к OS в условиях down-регуляции базальной экспрессии *HO-1*

По данным литературы, базальный уровень экспрессии *HO-1* (мРНК/белка) влияет на чувствительность опухолевых клеток к агентам стрессорной

природы: снижение уровня базальной экспрессии *HO-1* путем нокаута *HO-1* с использованием siRNA приводит к увеличению токсичности препаратов [14, 15]. Кроме нокаута *HO-1*, снижение базальной экспрессии *HO-1* (мРНК/белка) в клетках наблюдается в присутствии флавоноидов Ари [16]. В настоящей работе мы использовали Ари в качестве репрессора базальной экспрессии *HO-1*.

По данным, представленным на рис. 3а, в условиях предварительной инкубации опухолевых клеток с Ари 35–50 мкМ в течение 5 ч наблюдается резкое снижение базального уровня экспрессии *HO-1* в клетках меланомы линий MelIL и MeWo в 8 и 4 раза соответственно. Аналогичный эффект (снижение экспрессии *HO-1*) отмечается и для клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549 с исходно высоким уровнем базальной экспрессии *HO-1* (в 6 раз).

Базальный уровень экспрессии *HO-1* также снижается в клетках меланомы линии A375 (в 2 раза), по-видимому, высокая токсичность Ари для этих клеток (см. табл. 2) не позволила увеличить эффективность данного модулятора в качестве репрессора синтеза мРНК *HO-1*.

Согласно результатам исследования, в этих же условиях Ари не влияет на уровень экспрессии *FHC* (рис. 3б), что свидетельствует о специфическом

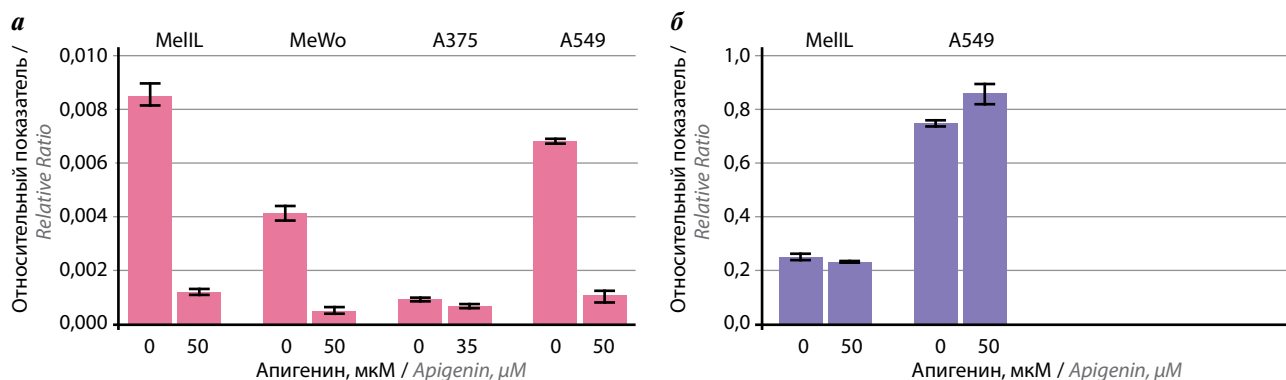


Рис. 3. Влияние апигенина на экспрессию *HO-1* (а) и *FHC* (б) в клетках меланомы человека

Fig. 3. The influence of apigenin on *HO-1* (a) and *FHC* (б) gene expression into human melanoma cell lines

влиянии флавона на экспрессию *HO-1* и согласуется с данными литературы [16].

Чтобы выяснить, изменится ли чувствительность клеток меланомы к H_2O_2 после инкубации с Арі, мы исследовали их выживаемость в этих условиях. По данным, представленным в табл. 2, в условиях down-регуляции *HO-1*, индуцированной Арі, чувствительность к H_2O_2 повышалась в 2 раза для клеток линии A375 ($IR = 0,6$), умеренная сенситизация отмечалась для клеток меланомы линии MeWo ($IR = 0,8$), и инкубация с Арі не повлияла на чувствительность к H_2O_2 клеток линии MelIL, несмотря на резкое снижение базального уровня экспрессии *HO-1* в этих клетках. Также мы не наблюдали изменения чувствительности к H_2O_2 для клеток немелкоклеточного рака легкого человека линии A549 (данные не представлены).

Таким образом, в условиях down-регуляции *HO-1*, индуцированной Арі, чувствительность к H_2O_2 повышается для клеток с низким (A375) и средним (MeWo) исходными уровнями базальной экспрессии *HO-1*. Эти данные свидетельствуют о том, что репрессия синтеза мРНК *HO-1* в присутствии Арі — необходимое, но недостаточное условие для сенситизации клеток к H_2O_2 .

В настоящее время известно, что в клетках после воздействия Арі наблюдается угнетение базальной экспрессии белков стресса: *HO-1* [16], индуцибельной *NO*-синтазы, циклооксигеназы 2-го типа [17]. Однако до сих пор механизм этого эффекта флавоноа остается неизвестным. Мы предположили, что down-регуляция белка *HO-1*, входящего в систему защиты клеток от OS, может отразиться на балансе окислителей-восстановителей в них и определили содержание ROS в клетках меланомы линии A375 после инкубации их с Арі.

Возрастание внутриклеточного содержания ROS в клетках меланомы A375 после воздействия Арі в комбинации с H_2O_2

По данным, представленным на рис. 4, краткосрочное воздействие H_2O_2 , индуктора ROS (400 мкМ,

30 мин), приводит к снижению концентрации последнего в клетках (см. рис. 4а, 2), о чем свидетельствует сдвиг пика кривой люминесценции влево. Вероятно, этот эффект обусловлен активацией системы детоксикации H_2O_2 . После воздействия Арі в течение 5 ч в клетках меланомы линии A375 содержание ROS возрастает (рис. 4б, 2) по сравнению с контрольными клетками (рис. 4б, 1). В этих же условиях добавление к клеткам H_2O_2 привело к резкому возрастанию содержания внутриклеточного ROS (рис. 4в, 3) по сравнению и с контрольными клетками (без препаратов), и с вариантами, обработанными H_2O_2 (рис. 4а, 2).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что после инкубации с Арі в клетках меланомы линии A375 баланс окислителей-восстановителей сдвигается в сторону окислителей и обеспечивает их сенситизацию к воздействию H_2O_2 . Известно, что в механизме цитотоксичности дакарбазина (DTIC), применяемого для лечения меланомы человека, участвуют ROS [18, 19]. С учетом этой информации представляло интерес выяснить, изменится ли чувствительность клеток меланомы линии A375 к DTIC после предварительной инкубации с Арі.

Как показано на рис. 5, в условиях репрессии *HO-1*, индуцированной Арі (35 мкМ, 5 ч), чувствительность клеток линии A375 к DTIC увеличивается. Способность Арі сенситизировать клетки меланомы к химиопрепаратам, в цитотоксичность которых вносят вклад ROS, позволяет рекомендовать этот флавоноид для включения его в схему лечения больных меланомой.

Заключение

Результаты нашей работы свидетельствуют о том, что в клетках меланомы человека регистрируется базальный уровень транскрипции гена *HO-1*, величина которого варьирует для разных линий: MelIL = MelP > MeWo = MelZ = IBR > MelMe = A375. Несмотря на отсутствие прямой корреляции между уровнем

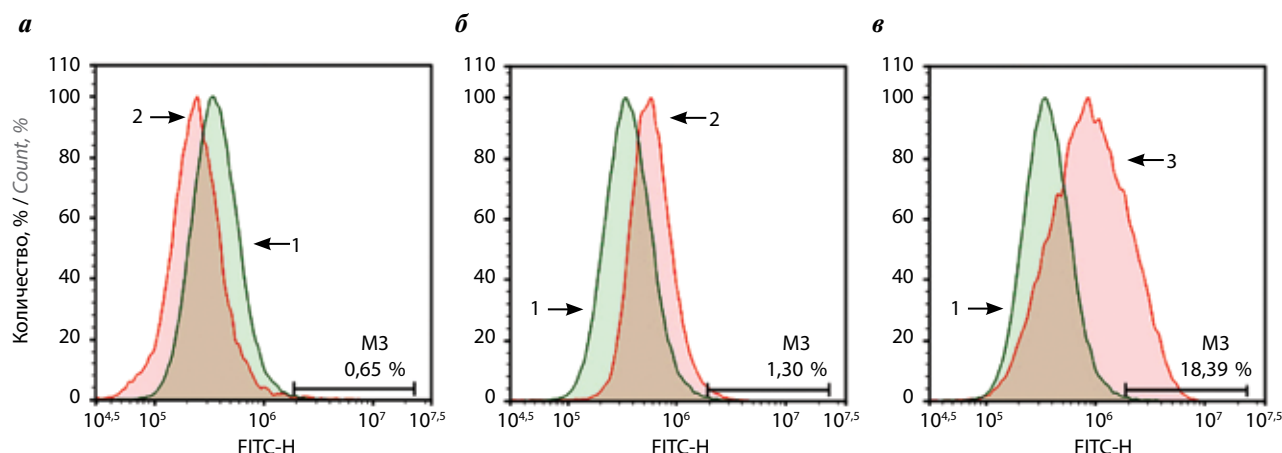


Рис. 4. Содержание ROS в клетках меланомы линии A375 после воздействия H_2O_2 (а), апигенина (б), апигенина и H_2O_2 (в)

Fig. 4. ROS content in A375 melanoma cells after exposure to H_2O_2 (a), apigenin (б), apigenin and H_2O_2 (в)

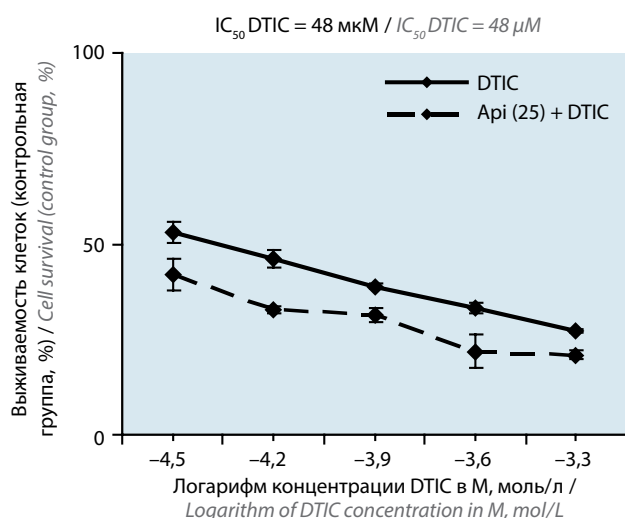


Рис. 5. Токсичность дакарбазина (DTIC) для клеток меланомы линии A375 в условиях апигенининдуцированной репрессии транскрипции *HO-1*

Fig. 5. Dacarbazine (DTIC) toxicity for A375 melanoma cells in conditions apigenin-induced repression of *HO-1* transcription

базальной экспрессии *HO-1* в клетках и их чувствительностью к H_2O_2 , индуктору OS, отмечается, что клетки линии A375 с низким уровнем транскрипции *HO-1* оказались в 2 раза чувствительнее к H_2O_2 по сравнению с клетками линии MeWb, имеющими высокий уровень экспрессии этого гена. Гемининдуцированное увеличение экспрессии *HO-1* наблюдается только в клетках со средним (MeWb) и низким (A375) уровнями транскрипции гена и коррелирует с увеличением их устойчивости к H_2O_2 . Установлено, что апигенининдуцированная репрессия синтеза мРНК *HO-1* регистрируется в клетках меланомы с разным базальным уровнем, однако сенситизация клеток к H_2O_2 характерна для вариантов, имеющих средний (MeWb) и низкий (A375) уровни экспрессии этого гена.

Установлено, что способность Api самостоятельно генерировать в клетках ROS вносит вклад в механизм увеличения чувствительности клеток меланомы к H_2O_2 в условиях апигенининдуцированной репрессии синтеза мРНК *HO-1*.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- MacKie R.M., Hauschild A., Eggermont A.M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. Ann Oncol 2009;20(Suppl 6):1–7. DOI: 10.1093/annonc/mdp252.
- Bhatia S., Tykodi S.S., Thompson J.A. Treatment of metastatic melanoma: an overview. Oncology (Williston Park) 2009;23(6):488–96.
- Emri G., Paragh G., Tószaki Á. et al. Ultraviolet radiation-mediated development of cutaneous melanoma: an update. J Photochem Photobiol B 2018;185:169–75. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2018.06.005.
- De Yúlia G.J.Jr., Cárcamo J.M., Bórquez-Ojeda O. et al. Hydrogen peroxide generated extracellularly by receptor-ligand interaction facilitates cell signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(14):5044–9. DOI: 10.1073/pnas.0501154102.
- Matés J.M., Sánchez-Jiménez F.M. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. Int J Biochem Cell Biol 2000;32(2):157–70. DOI: 10.1016/s1357-2725(99)00088-6.
- Wittgen H.G., van Kempen L.C. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. Melanoma Res 2007;17(6):400–9. DOI: 10.1097/cmr.0b013e3282fd312.
- Vile G.F., Tyrrell R.M. Oxidative stress resulting from ultraviolet A irradiation of human skin fibroblasts leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. J Biol Chem 1993;268(20):14678–81.
- Vanella L., Barbagallo I., Tibullo D. et al. The non-canonical functions of the heme oxygenases. Oncotarget 2016;7(42):69075–86. DOI: 10.18632/oncotarget.11923.

9. Bian C., Zhong M., Nisar M.F. et al. A novel heme oxygenase-1 splice variant, 14 kDa HO-1, promotes cell proliferation and increases relative telomere length. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;500(2):429–34. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.096.
10. Сидорова Т.А., Вагида М.С., Калия О.Л., Герасимова Г.К. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». *Клиническая онкогематология* 2014;7(3):282–9. [Sidorova T.A., Vagida M.S., Kaliya O.L., Gerasimova G.K. Role of catalase in protection of cancer cells from oxidative stress induced by binary catalytic system "teraphtal + ascorbic acid". *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology* 2014;7(3):282–9. (In Russ.)].
11. Сидорова Т.А., Рябая О.О., Прокофьева А.А., Хоченков Д.А. Гемоксигеназа-1/ферритин в защите лейкозных клеток от окислительного стресса, индуцированного каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». *Клиническая онкогематология* 2019;12(4):416–27. [Sidorova T.A., Ryabaya O.O., Prokofieva A.A., Khochenkov D.A. Heme oxygenase-1/ferritin in protection of leukemia cells from oxidative stress induced by catalytic system "teraphtal + ascorbic acid". *Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical oncohematology* 2019;12(4):416–27. (In Russ.)].
12. Sheftel A.D., Kim S.F., Ponka P. Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2007;282(14):10480–6. DOI: 10.1074/jbc.m700240200.
13. Torti F.M., Torti S.V. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002;99(10):3505–16. DOI: 10.1182/blood.v99.10.3505.
14. Kweon M.H., Adhami V.M., Lee J.S., Mukhtar H. Constitutive overexpression of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 in A549 cells contributes to resistance to apoptosis induced by epigallocatechin 3-gallate. *J Biol Chem* 2006;281(44):33761–72. DOI: 10.1074/jbc.m604748200.
15. Ma J., Yu K.N., Cheng C. et al. Targeting Nrf2-mediated heme oxygenase-1 enhances non-thermal plasma-induced cell death in non-small-cell lung cancer A549 cells. *Arch Biochem Biophys* 2018;658:54–65. DOI: 10.1016/j.abb.2018.09.015.
16. Abate A., Yang G., Wong R.J. et al. Apigenin decreases hemin-mediated heme oxygenase-1 induction. *Free Radic Biol Med* 2005;39(6):711–8. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.01.020.
17. Raso G.M., Meli R., di Carlo G. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci* 2001;68(8):921–31. DOI: 10.1016/s0024-3205(00)00999-1.
18. Pourahmad J., Amirmostofian M., Kobarfard F., Shahraki J. Biological reactive intermediates that mediate dacarbazine cytotoxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* 2009;65(1):89–96. DOI: 10.1007/s00280-009-1007-8.
19. De Oliveira Júnior R.G., Bonnet A., Braconnier E. et al. Bixin, an apocarotenoid isolated from *Bixa orellana* L., sensitizes human melanoma cells to dacarbazine-induced apoptosis through ROS-mediated cytotoxicity. *Food Chem Toxicol* 2019;125:549–61. DOI: 10.1016/j.fct.2019.02.013.

Вклад авторов

Т.А. Сидорова: разработка концепции и дизайна статьи, сбор и обработка данных, подготовка рукописи;
Э.Ш. Соломко, А.А. Прокофьева, Ю.А. Хоченкова, Д.А. Хоченков: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных.

Authors contributions

T.A. Sidorova: developing the concept and design of the article, data collection and processing, the preparation of the manuscript;
E.Sh. Solomko, A.A. Prokofieva, Yu.A. Khochenkova, D.A. Khochenkov: data collection and processing, providing research materials, data analysis and interpretation.

ORCID авторов/ORCID of authors

Т.А. Сидорова/T.A. Sidorova: <https://orcid.org/0000-0003-3498-061X>
Э.Ш. Соломко/E.Sh. Solomko: <https://orcid.org/0000-0002-8070-4707>
А.А. Прокофьева/A.A. Prokofieva: <https://orcid.org/0000-0002-5281-2559>
Ю.А. Хоченкова/Yu.A. Khochenkova: <https://orcid.org/0000-0001-8392-5495>
Д.А. Хоченков/D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКТР № АААА-А20-120021490101-1 «Разработка новых комплексных подходов к изучению механизмов злокачественной трансформации клеток, прогрессии и метастазирования опухолей».

Financing. The work was performed within the framework of NIOKTR No АААА-А20-120021490101-1 Development of new integrated approaches to the study of mechanisms of malignant cell transformation, progression and metastasis of tumors.

Статья поступила: 11.03.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 11.03.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА СТЕРИЛИЗАЦИИ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ В АЛЬГИНАТНЫЙ ГЕЛЬ КЛЕТОК КУЛЬТУРЫ MOLT-4

О.И. Кит, С.Ю. Филиппова, А.О. Ситковская, В.В. Позднякова, О.В. Хохлова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России;
Россия, 344000 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63

Контакты: Светлана Юрьевна Филиппова filsv@yandex.ru

Введение. Инкапсуляция в альгинатный гель широко применяется в биомедицинских исследованиях для защиты клеток от механического воздействия и контакта с иммунной системой реципиента. Применение альгината для пересадки биомедицинских клеточных продуктов человеку налагает высокие требования к стерильности конечного продукта. С целью подбора оптимального протокола инкапсуляции клеток для дальнейшего применения *in vitro* или трансплантации заключенных в альгинатный гель клеток необходимо изучить, как процессы стерилизации влияют на такие характеристики получаемого геля, как способность к поддержанию жизнеспособности и клеточной пролиферации.

Цель исследования — сравнительное изучение влияния ультрафиолетового излучения и автоклавирования на биологические свойства альгинатного геля.

Материалы и методы. Клетки культуры MOLT-4 были заключены в бусины из 1, 2 и 4 % альгината в концентрации $0,75 \times 10^6$ кл./мл. На 8-е сутки культивирования проводилось измерение размера колоний и определение жизнеспособности клеток в автоматическом клеточном счетчике.

Результаты. Площадь колоний для всех вариантов концентрации альгинатного геля оказалась достоверно выше для геля, стерилизованного обработкой ультрафиолетовыми лучами, по сравнению с автоклавированием. Разница в размерах колоний для 2 способов стерилизации альгината оказалась достоверной при принятом уровне значимости для всех вариантов концентраций геля ($\alpha = 0,05$, $df = 198$, $t = 1,972$). При этом в вариантах опыта существенных отличий в количестве жизнеспособных клеток после растворения альгината не отмечено.

Заключение. Стерилизация автоклавированием приводит к подавлению пролиферации заключенных в него клеток и не может быть рекомендована для применения в протоколах подготовки альгинатных капсул с заключенными в них клетками для культивирования *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: автоклавирование, ультрафиолетовое излучение, альгинат, инкапсуляция, MOLT-4

Для цитирования: Кит О.И., Филиппова С.Ю., Ситковская А.О. и др. Влияние способа стерилизации на пролиферацию и жизнеспособность инкапсулированных в альгинатный гель клеток культуры MOLT-4. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):46–51.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-46-51



INFLUENCE OF THE STERILIZATION METHOD ON THE PROLIFERATION AND VIABILITY OF MOLT-4 CELLS ENCAPSULATED IN ALGINATE GEL

O.I. Kit, S.Yu. Filippova, A.O. Sitkovskaya, V.V. Pozdnyakova, O.V. Khokhlova

National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
63 14th Liniya St., Rostov-on-Don, 344000, Russia

Introduction. Alginate gel encapsulation is widely used in biomedical research to protect cells from mechanical stress and contact with the recipient's immune system. The use of alginate for transplanting biomedical cellular products to humans imposes high requirements on the sterility of the final product. To select the optimal protocol for cell encapsulation for further *in vitro* use or transplantation of cells enclosed in an alginate gel, it is necessary to study how sterilization processes affect such characteristics of the obtained gel as the ability to maintain cell viability and proliferation.

The purpose of the study was to compare the effect of ultraviolet radiation and autoclaving on the biological properties of alginate gel.

Materials and methods. MOLT-4 culture cells were encapsulated in 1, 2 and 4 % alginate beads at a concentration of 0.75×10^6 cells/ml. On the eighth day of cultivation, we measured the size of the colonies and determined the viability of the cells in an automatic cell counter.

Results. The colony area for all variants of the concentration of alginate gel was significantly higher for a gel sterilized by UV treatment compared with autoclaving. The difference between the colony sizes for the two methods of alginate sterilization was significant at the accepted level of significance for all variants of gel concentrations ($\alpha = 0.05$, $df = 198$, $t = 1.972$). Moreover, the number of viable cells after dissolution of alginate did not significantly differ between the experimental variants.

Conclusion. Thus, autoclaving sterilization leads to proliferation retardation of encapsulated cells and cannot be recommended for use in protocols for the preparation of alginate capsules with encapsulated cells for *in vitro* and *in vivo* cultivation.

Key words: autoclaving, ultraviolet germicidal irradiation, alginate, encapsulation, MOLT-4

For citation: Kit O.I., Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O. et al. Influence of the sterilization method on the proliferation and viability of MOLT-4 cells encapsulated in alginate gel. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3): 46–51. (In Russ.).

Введение

Развитие медицины сопровождается ростом потребности в биомедицинских клеточных продуктах — аутологичных или аллогенных клетках человека или животных, замещающих недостающую функцию организма или продуцирующих биологически активные вещества *in situ*. В частности, интенсивные исследования ведутся в области трансплантации клеток островков Лангерганса, секретирующих инсулин, для замещения функции поджелудочной железы при диабете [1, 2] и гепатоцитов для компенсации печеночной недостаточности различной этиологии [3]. Трансплантация биомедицинских клеточных продуктов — перспективное направление в онкологии. Применение модифицированных стволовых клеток, продуцирующих противоопухолевые вещества или трансформирующих пролекарства до активной формы, уже позволило добиться прогресса в борьбе с рядом онкологических заболеваний [4, 5]. Во всех случаях при трансплантации аллогенных клеток остро встает проблема продления жизни пересаженных клеток в организме реципиента. Для решения этой задачи используют заключение клеток в различные матриксы, в которых чужеродные клетки защищены от взаимодействия с иммунной системой при сохранении их нормального функционирования. Одним из наиболее популярных компонентов матрикса для инкапсуляции клеток является альгинат — получаемый из водорослей полисахарид, образующий гель при взаимодействии с двухвалентными ионами. Гель обладает высокой механической и химической стабильностью, из-за отсутствия специфических ферментных систем он медленно разрушается в организме человека. Образованные в альгинатном геле поры имеют достаточный размер для транспорта белковых молекул и обеспечения заключенных в гель клеток питательными веществами и кислородом, но они непроницаемы для клеток иммунной системы [6]. Применение технологии инкапсуляции в альгинат позволило добиться увеличения жизнеспособности модифицированных клеток, вырабатывающих биотерапевтические молекулы, при трансплантации животным-опухоленосителям, а также выраженного эффекта экспери-

ментальной терапии на моделях глиомы [7] и меланомы [8, 9].

Применение альгинатных гелей в культуре клеток и в трансплантации биомедицинских клеточных продуктов налагает высокие требования к стерильности конечного продукта. Основные способы стерилизации альгината, применяемые в лабораторных условиях, — облучение ультрафиолетовым (УФ) светом порошка альгината или автоклавирование готового раствора. Оба эти воздействия приводят к повреждению молекул альгината и росту количества низкомолекулярных фрагментов в его составе, что отражается на вязкости раствора и способности к образованию геля [10]. Тем не менее неизвестно, какой из 2 способов стерилизации альгината более предпочтителен, поскольку до конца не исследовано влияние измененных физических и химических свойств геля на пролиферативную способность клеток, заключенных в гель.

Цель исследования — сравнительное изучение влияния 2 способов стерилизации альгината на пролиферацию и жизнеспособность заключенных в гель клеток Т-лимфобластной лейкемии человека MOLT-4 для подбора оптимальных протоколов для культивирования *in vitro* и трансплантации заключенных в альгинатный гель клеток.

Материалы и методы

Для исследования были подготовлены 8 % растворы альгината натрия (W201502, Sigma-Aldrich, США) в DPBS (Биолот, Россия) в 2 вариантах. В 1-м варианте готовый раствор нестерильного порошка альгината подвергали автоклавированию путем выдерживания при 121 °С и давлении водяного пара 210 кПа в течение 15 мин. Во 2-м варианте раствор приготавливали путем растворения в стерильном буфере DPBS порошка альгината, предварительно стерилизованного воздействием УФ-лучей. Стерилизация альгината проводилась следующим образом: сначала тонкий слой порошка подвергали облучению УФ-лучами в течение 30 мин в стерильном боксе, затем под той же лампой порошок переносили в бутылку.

Клеточные линии и условия культивирования. Клеточная линия Т-лимфобластной лейкемии человека

MOLT-4 была получена из ФГБУН «Институт цитологии РАН». Культивирование клеток проводили на среде RPMI 1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % FBS (Биолот, Россия) без антибиотиков. Для эксперимента клетки были отобраны из суспензии, подсчитаны и ресуспендированы в среде культивирования до концентрации $1,5 \times 10^6$ кл/мл. Далее выполняли смешивание полученной клеточной суспензии и предварительно прогретых на водяной бане до 37°C стерилизованного одним из двух исследуемых способов 8 % раствора альгината и стерильного DPBS в необходимых пропорциях для получения рабочих растворов с концентрацией клеток $0,75 \times 10^6$ кл/мл и 1, 2 и 4 % концентрациями альгината. Для получения альгинатных бусин растворы альгината с клетками медленно продавливали при помощи шприца через иглу диаметром 30G в 50 mM раствор CaCl_2 и выдерживали в нем 5 мин при комнатной температуре до отверждения геля. Далее полученные альгинатные бусины дважды отмывали в стерильном DPBS и помещали в среду культивирования. В каждую лунку 12-луночного планшета было помещено всего по 20 бусин. Для каждого варианта опыта было заложено по 6 лунок. Культивирование альгинатных бусин с заключенными клетками MOLT-4 проводили при 37°C и 5,5 % CO_2 . Замену среды культивирования выполняли каждые 2 дня.

Измерения и статистический анализ. На 8-й день культивирования производили фотографирование лунок в проходящем свете для получения репрезентативных серий изображений образующихся колоний MOLT-4. Далее при помощи программы ImageJ на полученных изображениях определяли среднюю площадь колоний. Было проведено измерение площади 100 колоний для каждого варианта опыта. По окончании эксперимента на 8-е сутки культивирования альгинат растворяли путем выдерживания бусин в 60 mM растворе цитрата натрия в течение 10 мин. Высвобожденные таким образом клетки дважды отмывали в среде культивирования, после чего на автоматическом счетчике клеток EVE (NanoEnTek, Южная Корея) определяли их жизнеспособность в 3 технических повторах на лунку, из которых затем вычисляли среднее значение. Сравнение средних значений площади колоний и доли жизнеспособных клеток для всех вариантов опыта проводили с применением t-критерия Стьюдента в программе Statistica.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования показали, что оба способа стерилизации альгината эффективны в плане поддержания стерильных условий культивирования клеточных линий. На всем протяжении эксперимента признаков микробной контаминации культур клеток, заключенных в альгинатные бусины, не выявлено, несмотря на отсутствие антибиотиков в среде культивирования.

Деление клеток и образование колоний наблюдались во всех образцах начиная с 3-го дня культивирования. На 8-е сутки культивирования стала заметна разница в форме колоний в образцах с различной концентрацией альгината, которая прослеживалась как в вариантах, стерилизованных автоклавированием, так и в подвергнутых обработке УФ-лучами. В 1 % альгинатном геле колонии были симметричными, имели округлую форму и довольно рыхлую поверхность, на которой можно было различить контуры отдельных клеток (рис. 1а, б). По мере увеличения концентрации альгината колонии MOLT-4 становились более вытянутыми, асимметричными, их поверхность становилась более гладкой. Так, при 2 % концентрации геля колонии чаще имели бобовидную или эллипсовидную форму (рис. 1в, г), а при 4 % концентрации альгината колонии могли иметь дисковидную или сигарообразную форму (рис. 1д, е).

Наблюдаемое изменение формы колоний может быть связано с увеличением плотности геля при возрастании концентрации альгината. При этом клетки испытывают большее механическое сдавливание, которое тем не менее неравномерно по различным направлениям роста колоний, что приводит к преимущественному делению клеток в направлении наименьшей плотности среды и, соответственно, появлению асимметричных колоний.

По результатам измерения площади колоний MOLT-4 можно заключить, что стерилизация готового раствора автоклавированием приводит к значительному уменьшению размера колоний, статистически значимых при всех использованных концентрациях альгината (рис. 2).

Значения критерия Стьюдента при попарном сравнении средних показателей площади колоний, полученных в автоклавированном и облученном УФ альгинате, составили: $t = 6,375$ для 1 % (число степеней свободы $df = 198$), $t = 8,016$ для 2 % ($df = 198$), и $t = 16,248$ для 4 % геля ($df = 198$). Полученные значения критерия превышали критическое значение при уровне значимости $\alpha = 0,05$ и количестве степеней свободы $df = 198$ ($t_{\text{критическое}} = 1,972$). Таким образом, разница между размерами колоний для 2 способов стерилизации альгината оказалась достоверной при всех вариантах концентрации геля. При этом существенных отличий в вариантах опыта в количестве жизнеспособных клеток после растворения альгината не отмечено. При попарном сравнении средних значений доли жизнеспособных клеток, культивированных в автоклавированном и облученном УФ альгинате, значения критерия Стьюдента не превысили критическое значение для уровня значимости $\alpha = 0,05$ и количества степеней свободы $df = 4$ для всех вариантов концентраций геля ($t_{\text{критическое}} = 2,776$) (см. таблицу).

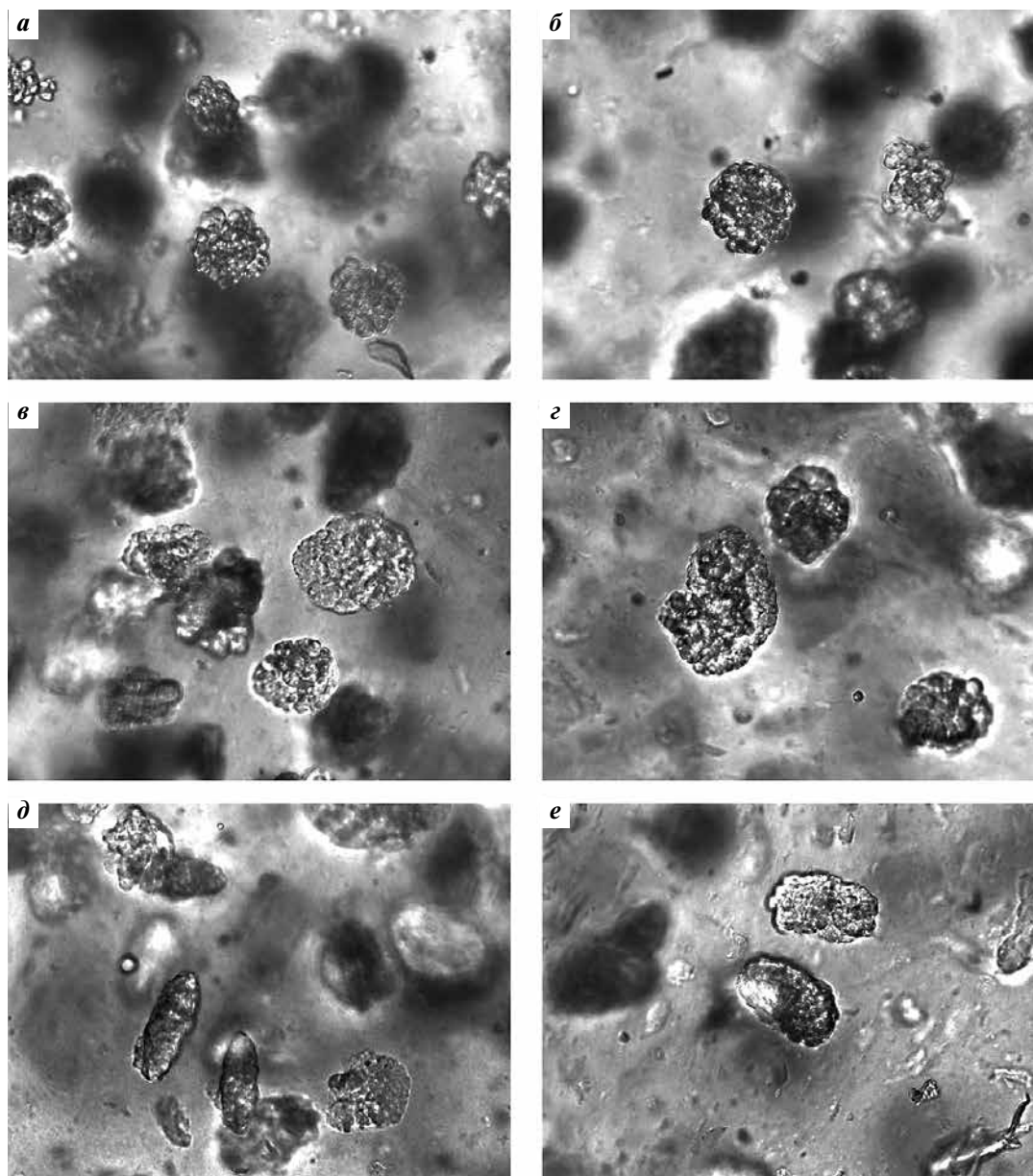


Рис. 1. Форма колоний культуры MOLT-4 в зависимости от способа стерилизации и концентрации альгината: а – 1 % гель, стерилизация автоклавированием; б – 1 % гель, стерилизация УФ-облучением; в – 2 % гель, стерилизация автоклавированием; г – 2 % гель, стерилизация УФ-облучением; д – 4 % гель, стерилизация автоклавированием; е – 4 % гель, стерилизация УФ-облучением. $\times 200$

Fig. 1. The shape of the MOLT-4 culture colonies depending on the sterilization method and the concentration of alginate: а – 1 % gel, sterilization by autoclaving; б – 1 % gel, sterilization by ultraviolet; в – 2 % gel, sterilization by autoclaving; г – 2 % gel, sterilization by ultraviolet; д – 4 % gel, sterilization by autoclaving; е – 4 % gel, sterilization by ultraviolet. $\times 200$

Известно, что как обработка высокими температурами, так и УФ-облучение приводят к частичному разрушению молекул альгината. Причем данное явление оказалось наиболее выраженным именно при автоклавировании готового раствора [10]. В исследовании E. Hodder и соавт. [10] также было показано, что сами по себе продукты разложения альгината не обладают цитостатическим действием при культивировании клеток в присутствии раствора альгината. Однако по результатам нашего исследования можно сделать вывод,

что цитостатическое действие может проявляться при заключении клеток в альгинатный гель. Мы связываем это с возможным уменьшением размера и количества пор в готовом геле, приводящим к замедлению скорости поступления питательных веществ и кислорода к клеткам, что приводит к подавлению клеточной пролиферации. Для проверки данного предположения требуются дополнительные исследования физических свойств альгинатного геля, подвергнутого различным способам стерилизации.

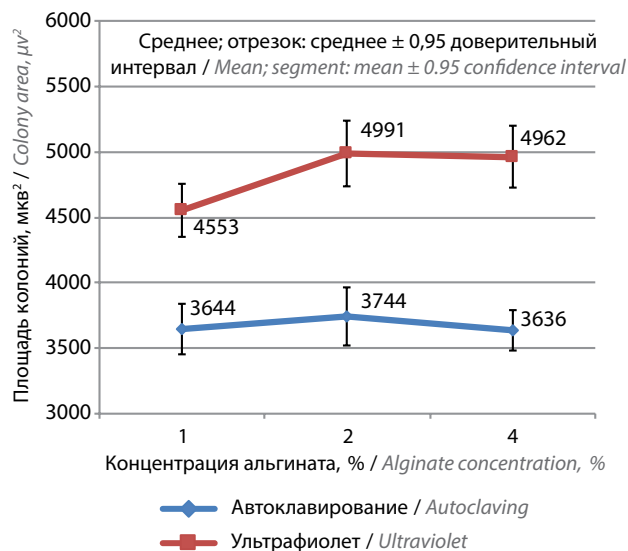


Рис. 2. График средних значений площади колоний MOLT-4 в зависимости от концентраций и способов стерилизации альгината

Fig. 2. A plot of the average area of MOLT-4 colonies versus alginate concentration and sterilization methods

Заключение

Таким образом, стерилизация готового раствора альгината автоклавированием приводит к замедлению роста колоний, образуемых заключенными в него клетками. Поэтому данный способ стерилизации

Таблица 1. Доля жизнеспособных клеток в альгинатных гелях на 8-е сутки культивирования в зависимости от концентраций и способов стерилизации альгината

Table 1. The proportion of viable cells in alginate gels on the eighth day of cultivation, depending on alginate concentrations and sterilization methods

Концентрация альгината, % Alginate concentration, %	Доля жизнеспособных клеток, % Cell viability proportion, %		t**	df***
	Автоклавирование Autoclaving	Ультрафиолет Ultraviolet		
1	91,5 ± 2,6*	90,6 ± 1,4	0,599	4
2	90,8 ± 1,64	93,6 ± 1,6	2,395	4
4	90,6 ± 1,36	92,5 ± 1,3	1,96	4

*Значение доли приведено как среднее значение ± 0,95 доверительный интервал; **значение критерия Стьюдента при сравнении средних значений доли; ***количество степеней свободы

*Proportion is given as mean value, ± 0.95 confidence interval; **Student's criterion when comparing mean proportion value; ***degrees of freedom

в протоколах подготовки альгинатных капсул для культивирования *in vitro* и *in vivo* следует применять с осторожностью, и рекомендуется по возможности заменять автоклавирование на более щадящие процедуры.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Omami M., McGarrigle J.J., Reedy M. et al. Islet microencapsulation: strategies and clinical status in diabetes. *Curr Diab Rep* 2017;17(7):47. DOI: 10.1007/s11892-017-0877-0.
- Espona-Noguera A., Ciriza J., Cañibano-Hernández A. et al. Review of advanced hydrogel-based cell encapsulation systems for insulin delivery in type 1 diabetes mellitus. *Pharmaceutics* 2019;11(11):597. DOI: 10.3390/pharmaceutics11110597.
- Cernigliaro V., Peluso R., Zedda B. et al. Evolving cell-based and cell-free clinical strategies for treating severe human liver diseases. *Cells* 2020;9(2):386. DOI: 10.3390/cells9020386.
- Bhere D., Shah K. Stem Cell-Based Therapies for Cancer. *Adv Cancer Res* 2015;127:159–89. DOI: 10.1016/bs.acr.2015.04.012.
- Mohr A., Zwacka R. The future of mesenchymal stem cell-based therapeutic approaches for cancer – from cells to ghosts. *Cancer Lett* 2018;414:239–49. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.11.025.
- Andersen T., Auk-Emblem P., Dornish M. 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays (Basel)* 2015;4(2):133–61. DOI: 10.3390/microarrays4020133.
- Read T., Sorensen D.R., Mahesparan R. et al. Local endostatin treatment of gliomas administered by microencapsulated producer cells. *Nat Biotechnol* 2001;19(1):29–34. DOI: 10.1038/83471.
- Teng H., Zhang Y., Wang W. et al. Inhibition of tumor growth in mice by endostatin derived from abdominal transplanted encapsulated cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2007;39(4):278–84. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2007.00273.x.
- Zhang Y., Wang W., Xie Y. et al. *In vivo* culture of encapsulated endostatin-secreting Chinese hamster ovary cells for systemic tumor inhibition. *Hum Gene Ther* 2007;18(5):474–81. DOI: 10.1089/hum.2006.166.
- Hodder E., Duin S., Kilian D. et al. Investigating the effect of sterilisation methods on the physical properties and cytocompatibility of methyl cellulose used in combination with alginate for 3D-bioplotting of chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med* 2019;30(1):10. DOI: 10.1007/s10856-018-6211-9.

Вклад авторов

О.И. Кит: разработка концепции и дизайна исследования;

С.Ю. Филиппова: экспериментальная работа;

А.О. Ситковская: анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;

В.В. Позднякова: научное редактирование;

О.В. Хохлова: техническое редактирование, оформление библиографии, подготовка иллюстраций.

Authors contributions

O.I. Kit: development of the concept and design of the study;

S.Yu. Filippova: experimental work;

A.O. Sitkovskaya: data analysis and interpretation, article writing;

V.V. Pozdnyakova: scientific editing;

O.V. Khokhlova: technical editing, preparation of bibliography and illustrations.

ORCID авторов/ORCID of authors

О.И. Кит/O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>

С.Ю. Филиппова/S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>

А.О. Ситковская / A.O. Sitkovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>

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: 21.05.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 21.05.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.

СХОДИМОСТЬ И ВРЕМЕННАЯ СТАБИЛЬНОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ БЕЛКА β III-ТУБУЛИНА В ТКАНИ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЕЙ

А.А. Башарина¹, Т.А. Богуш¹, Е.А. Рукавишников², Е.А. Богуш^{1,3}, С.А. Калюжный¹,
Н.О. Вихлянцев¹, В.С. Косоруков¹

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

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

³ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Анна Александровна Башарина basharinaa@inbox.ru

Введение. Введение в клиническую практику молекулярного фенотипирования опухолей продемонстрировало необходимость создания новых аналитических методов оценки экспрессии маркеров в солидных новообразованиях, поскольку рутинно используемый метод иммуногистохимии характеризуется рядом существенных недостатков.

Цель исследования — аналитическая валидация разработанного авторами иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, для изучения опухолевых белковых маркеров в ткани солидных новообразований.

Материалы и методы. Валидация метода проведена при количественной оценке экспрессии белка β III-тубулина (TUBB3) в суспензиях клеток немелкоклеточного рака легкого, полученных из хирургических образцов опухоли. Для иммунофлуоресцентного окрашивания использованы первичные антитела к TUBB3 (ab7751) и вторичные — конъюгированные с красителем DyLight 650 (ab98729). Для измерения флуоресценции клеток использовали проточный цитометр Navios (Beckman Coulter). Для оценки валидационных параметров использован коэффициент вариации, рассчитанный как отношение среднеквадратического отклонения уровня TUBB3 к его среднему значению.

Результаты. Проведен анализ 2 параметров: сходимости и временной стабильности результатов оценки экспрессии TUBB3. Показано, что средний коэффициент вариации уровня экспрессии исследованного маркера в ткани опухоли при оценке сходимости и стабильности иммунофлуоресцентной окраски не превысил 20 %. Согласно рекомендациям по аналитической валидации методов, основанных на использовании проточного цитометра, это доказывает валидность метода по исследованным параметрам.

Заключение. Показана сходимость и временная стабильность результатов количественной оценки экспрессии прогностически и предиктивно значимого белка TUBB3 в ткани солидных опухолей при использовании разработанного авторами метода иммунофлуоресцентного окрашивания, ассоциированного с проточной цитометрией. Отмечена практическая значимость факта временной стабильности иммунофлуоресцентной окраски при хранении суспензии окрашенных клеток в темноте при 4 °C в течение 24 ч, что указывает на возможность варьирования интервала времени от завершения аналитической части исследования до работы на проточном цитометре.

Ключевые слова: валидация, проточная цитометрия, β III-тубулин, иммунофлуоресцентный анализ

Для цитирования: Башарина А.А., Богуш Т.А., Рукавишников Е.А. и др. Сходимость и временная стабильность количественной оценки экспрессии белка β III-тубулина в ткани солидных опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3): 52–6.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-52-56



THE INTRA-ASSAY PRECISION AND TIME STABILITY OF QUANTITATIVE β III-TUBULIN EXPRESSION ASSESSMENT IN SOLID TUMOR TISSUE

A.A. Basharina¹, T.A. Bogush¹, E.A. Rukavishnikova², E.A. Bogush^{1,3}, S.A. Kaliuzhny¹, N.O. Vikhlyantseva¹, V.S. Kosorukov¹

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

²M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

³Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Build 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Introduction. The introducing of tumor molecular profiling into clinical practice has revealed the need for development of new analytical methods for estimating marker expression in solid tumors, as routinely used method of immunohistochemistry has a number of significant drawbacks.

Objective. Analytical validation of immunofluorescence staining and flow cytometry method developed by the authors for the examination of tumor protein markers in the solid tumors tissue.

Materials and methods. Method validation was carried out by quantitative estimation of β III-tubulin (TUBB3) expression in single-cell suspensions of non-small-cell lung cancer obtained from surgical tumor samples. Primary antibodies to TUBB3 (ab7751) and secondary DyLight 650-conjugated antibodies (ab98729) were used for immunofluorescent staining. The «Navios» flow cytometer (Beckman Coulter) was used to measure the fluorescence. The validation parameters were assessed by the coefficient of variation calculated as the ratio of standard deviation of TUBB3 level to its mean value.

Results. Two parameters were analyzed: intra-assay precision and time stability of the results of the TUBB3 expression assessment. It was demonstrated that the mean coefficients of variation of the marker expression level in the tumor tissue did not exceed 20 % for both parameters. According to recommendations on the analytical validation of methods based on flow cytometry, it proves the validity of the method for these parameters.

Conclusions. The intra-assay precision and time stability were demonstrated for the results of a quantitative estimation of TUBB3 expression in solid tumor tissue using immunofluorescence staining and flow cytometry method developed by the authors. The practical value of the time stability of immunofluorescence stain during 24 h storage of a stained cells suspension in the dark at 4 °C was highlighted. It shows the possibility of adjusting the time interval between completion of the analytical study part and flow cytometer measurement.

Key words: validation, flow cytometry, β III-tubulin, immunofluorescent analysis

For citation: Basharina A.A., Bogush T.A., Rukavishnikova E.A. et al. The intra-assay precision and time stability of quantitative β III-tubulin expression assessment in solid tumor tissue by. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):52–6. (In Russ.).

Введение

Введение в клиническую практику молекулярно-фенотипирования опухолей продемонстрировало необходимость создания новых аналитических методов оценки экспрессии маркёров в солидных новообразованиях, поскольку рутинно используемый иммуногистохимический (ИГХ) метод характеризуется рядом существенных недостатков [1]. Наиболее значимые из них — крайне агрессивная пробоподготовка, субъективизм оценки полученных результатов, локальность исследования молекулярно-гетерогенного опухолевого узла и, как следствие, плохая воспроизводимость результатов [2]. Так, при повторном ИГХ-исследовании экспрессии белка ERCC1 в образцах немелкоклеточного рака легкого более 500 больных дискордантность результатов достигла 36 % [3].

Ранее мы адаптировали иммунофлуоресцентный метод, ассоциированный с проточной цитометрией, для изучения опухолевых маркёров в ткани солидных новообразований [4]. По сравнению с ИГХ-исследованием метод обладает рядом преимуществ: мягкая преаналитическая подготовка, строго количественная оценка результатов, нивелирование молекулярной гетерогенности опухоли за счет исследования маркёра в большом объеме опухолевого образца [2].

В настоящей работе проведена аналитическая валидация методики на примере оценки в ткани немелкоклеточного рака легкого экспрессии белка β III-тубулина (TUBB3), который прогнозирует агрессивность течения этого заболевания и чувствительность к терапии таксанами [5].

Цель исследования — анализ сходимости и временной стабильности результатов оценки TUBB3 в ткани солидных опухолей методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии.

Материалы и методы

Валидация разработанного авторами иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, проведена при исследовании экспрессии белка TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого.

Приготовление одноклеточных суспензий

Для получения одноклеточной суспензии образец опухоли (до 2 см в диаметре), зафиксированный в 4 % нейтральном растворе формальдегида, тщательно измельчали и инкубировали в растворе Версена при 37 °C в течение 30 мин. К измельченному образцу опухоли добавляли раствор фосфатного буфера (pH = 7,4), гомогенизировали 5-кратным движением пестика в стеклянном гомогенизаторе и пропускали через фильтр BD Falcon (Becton, Dickinson and Company) с диаметром пор 40 мкм. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 5 мин при 3000 об/мин, осадок ресуспендировали в 4 % нейтральном растворе формальдегида при интенсивном встряхивании в течение 2 мин (для предупреждения образования клеточных конгломератов). Иммунофлуоресцентное окрашивание клеток проводили в 100 мкл суспензии с концентрацией 200 тыс. клеток/мл.

Иммунофлуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия

Суспензию опухолевых клеток инкубировали в течение ночи (15–20 ч) при 4 °C с первичными моноклональными мышинными антителами к TUBB3 (ab7751, клон TU-20, Abcam) в конечном разведении 1 : 500. Далее после однократной отмывки 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина (BSA) проводили инкубацию в течение 1,5 ч при 4 °C с вторичными

антимышинными антителами, конъюгированными с флуорохромом DyLight 650 (ab98729, Abcam), в конечном разведении 1 : 1000. Для удаления из анализа дебриса и эритроцитов клетки инкубировали в течение 15 мин с ДНК-красителем Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) в концентрации 1,2 мкг/мл, после чего дважды отмывали 0,5 % раствором BSA.

Для измерения флуоресценции клеток использовали проточный цитометр Navios (Beckman Coulter). Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight 650 и Hoechst 33258 проводили в каналах FL-6 и FL-9 соответственно. Уровень экспрессии TUBB3 (%) рассчитывали как количество специфически флуоресцирующих клеток относительно контрольных (инкубация клеток только с вторичными антителами). Расчет параметра выполняли в программе FlowJo 10.0.8 (FlowJo, LLC) с использованием статистического критерия Колмогорова–Смирнова. Гистограммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции строили с помощью программы WinMDI 2.9.

Обработку результатов выполнили в программе Microsoft Excel 2010 (Microsoft Windows).

Результаты и обсуждение

Валидация — это этап исследования при разработке аналитических методик, который необходим для доказательства достоверности и воспроизводимости получаемых результатов. Для методов, основанных на использовании проточного цитометра, к оценке обязательны следующие параметры: специфичность, прецизионность 3 уровней (сходимость, внутри- и межлабораторная воспроизводимость результатов), чувствительность, временная стабильность иммунофлуоресцентной окраски [6].

В данной работе проведен анализ 2 валидационных параметров: сходимости и временной стабильности результатов оценки экспрессии TUBB3 в ткани солидных опухолей методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии.

Сходимость результатов

Сходимость — это первый уровень прецизионности методики, основанный на оценке воспроизводимости результатов, полученных при многократном анализе одного и того же образца в одинаковых условиях.

Оценка данного валидационного параметра проведена на 3 образцах опухолей разных больных при 3 повторных измерениях экспрессии TUBB3 в каждом образце в 2 повторных опытах с интервалом 24 ч. Все манипуляции, включающие иммунофлуоресцентное окрашивание и измерение на проточном цитометре, выполнены одним исследователем на одном и том же оборудовании. Измерение флуоресценции клеток проведено в течение 1 ч после завершения окрашивания образцов.

Для статистического анализа полученных результатов использована мера относительного разброса количественного показателя TUBB3 — коэффициент вариации (CV, %), рассчитанный как отношение среднеквадратического отклонения уровня TUBB3 к его среднему значению.

Таблица 1. Сходимость результатов количественной оценки уровня экспрессии β III-тубулина (TUBB3) в ткани немелкоклеточного рака легкого методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии

Table 1. The intra-assay precision of quantitative β III-tubulin (TUBB3) expression assessment in non-small cell lung cancer tissue by immunofluorescence staining and flow cytometry

Параметр Parameter	Уровень экспрессии TUBB3, % Expression level of TUBB3, %					
	№ образца опухоли Tumor sample No.					
	1	2	3			
	№ опыта Experiment No.					
№ измерения Measurement No.	1	2	1	2	1	2
1	43	45	20	19	55	48
2	47	42	15	24	47	52
3	41	48	17	17	59	60
CV, %*	7,0	6,7	14,5	18,0	11,4	11,5
Среднее значение CV, %** Mean CV, %**	6,8		16,3		11,4	

*CV — коэффициент вариации; **среднее значение CV для каждого исследованного образца рассчитано по результатам 6 измерений в 2 повторных экспериментах.

*CV — coefficient of variation; **average CV for each investigated sample was calculated based on the results of 6 measurements in 2 repeated experiments.

В табл. 1 представлены полученные результаты. Видно, что независимо от уровня экспрессии маркера для всех образцов опухолей коэффициенты вариации и их средние значения не превышают 20 %. При таких коэффициентах вариации результаты метода считаются сходимыми [6]. При этом рассеивание данных считается незначительным при коэффициенте вариации <10 % (как в образце опухоли 1) и умеренным при коэффициентах вариации от 10 до 20 % (как в образцах опухолей 2 и 3).

Таким образом, доказана сходимость результатов количественной оценки уровня экспрессии белка TUBB3 в ткани солидных опухолей при использовании иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии.

Временная стабильность иммунофлуоресцентной окраски

Оценка временной стабильности иммунофлуоресцентной окраски особенно актуальна в лабораториях с большой нагрузкой и наличием 1 прибора, когда измерение флуоресценции на проточном цитометре не может быть проведено непосредственно после завершения окрашивания [7, 8].

В настоящей работе данный валидационный параметр исследован на 3 образцах опухолей разных больных при 3 повторных измерениях экспрессии TUBB3 в каждом образце в 1 повторе опыта: после завершения окрашивания (в течение 1 ч), а также через 6 и 24 ч. Все манипуляции, включающие иммунофлуоресцентное окрашивание и измерение на проточном цитометре, выполнены одним исследователем на одном и том же оборудовании, образцы между измерениями хранились в темноте при 4 °С. Необходимо отметить, что этот раздел исследования проведен на тех же образцах опухолевой ткани, что и оценка сходимости результатов.

Для статистического анализа полученных данных использован коэффициент вариации (CV, %) между начальным уровнем экспрессии TUBB3 (оценен в течение 1 ч после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания) и последующими временными точками анализа — 6 и 24 ч.

Полученные результаты представлены в табл. 2. Видно, что средние коэффициенты вариации уровня экспрессии TUBB3 в опухолевых клетках через 6 и 24 ч после завершения окрашивания относительно исходных показателей (в течение 1 ч после окрашивания) составили 7,6 и 9,1 % соответственно. При таких коэффициентах вариации иммунофлуоресцентная окраска признается стабильной [6]. Более того, рассеивание данных в обеих временных точках незначительно, поскольку коэффициенты вариации составили <10 %.

Таким образом, после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания измерение флуоресценции образцов опухолей на проточном цитометре может быть отсрочено на 6 и 24 ч без искажения результатов анализа, что указывает на временную стабильность окраски по крайней мере в течение суток.

Заключение

В настоящей работе проведена аналитическая валидация иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитометрией, который адаптирован авторами для изучения белковых маркеров в ткани солидных новообразований. Проведен анализ 2 параметров: сходимости и временной ста-

Таблица 2. Временная стабильность результатов количественной оценки уровня экспрессии β III-тубулина (TUBB3) в ткани немелкоклеточного рака легкого методом иммунофлуоресцентного окрашивания и проточной цитометрии

Table 2. Time stability of quantitative β III-tubulin (TUBB3) expression assessment of in non-small-cell lung cancer tissue by immunofluorescence staining and flow cytometry

Временной интервал после окрашивания Time interval after staining	Показатель, % Parameter, %	№ образца опухоли Tumor sample No.			Среднее значение CV, %** Mean CV, %**
		1	2	3	
≤1 ч ≤1 h	Уровень экспрессии TUBB3 TUBB3 expression level	44	19	48	—
6 ч 6 h	CV*	41	18	55	
	CV*	5,0	8,3	9,6	7,6
24 ч 24 h	Уровень экспрессии TUBB3 TUBB3 expression level	39	21	43	—
	CV*	8,5	10,9	7,7	
	CV*	8,5	10,9	7,7	9,1

*CV — коэффициент вариации; **среднее значение CV 3 образцов опухолей в 2 временных интервалах: 6 и 24 ч после завершения иммунофлуоресцентного окрашивания.

*CV — coefficient of variation; **average CV of 3 tumor samples in 2 time intervals: 6 and 24 hours after completing immunofluorescent staining.

бильности результатов оценки экспрессии β III-тубулина в ткани немелкоклеточного рака легкого.

Показано, что средний коэффициент вариации уровня экспрессии исследованного маркера в ткани опухоли при оценке сходимости и стабильности иммунофлуоресцентной окраски не превысил 20 %, что, согласно рекомендациям по аналитической валидации методов, основанных на использовании проточного цитометра, доказывает валидность метода по этим параметрам [6].

Важно отметить практическую значимость факта временной стабильности иммунофлуоресцентной окраски при хранении суспензии окрашенных клеток в темноте при 4 °С в течение 24 ч, что указывает на возможность варьирования интервала времени от завершения аналитической части исследования до работы на проточном цитометре.

В настоящий момент продолжается валидация разработанной методики по показателям внутри- и межлабораторной прецизионности и чувствительности.

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

1. Gown A.M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol* 2008;(21Suppl 2):8–15. DOI: 10.1038/modpathol.2008.34.
2. Bogush T.A., Kaliuzhny S.A., Basharina A.A. et al. Immunofluorescence Analysis of the Vimentin Expression in Epithelial Cells. *Moscow Univ Chem Bull* 2019;74(6):290–5. DOI: 10.3103/S0027131419060063.
3. Friboulet L., Olausson K.A., Pignon J.P. et al. ERCC1 isoform expression and DNA repair in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2013;368(12):1101–10. DOI: 10.1056/nejmoa1214271.
4. Bogush T.A., Shaturova A.S., Dudko E.A. et al. Quantitative immuno-fluorescent estimation of estrogen receptor β expression in human solid tumors using flow cytometry. *Moscow Univ Chem Bull* 2011;66:305–12. DOI: 10.3103/S0027131411040031.
5. Мамичев И.А., Богуш Т.А., Богуш Е.А. и др. Белок микротрубочек β III-тубулин: строение, экспрессия и функции в нормальных и опухолевых клетках. *Антибиотики и химиотерапия* 2018;63(7–8):79–90. [Mamichev I.A., Bogush T.A., Bogush E.A. et al. Microtubule protein β III-tubulin: structure, expression and functions in normal and tumor cells. *Antibiotiki i khimioterapiya* = Antibiotics and Chemotherapy 2018;63(7–8):79–90. (In Russ.)].
6. Selliah N., Eck S., Green C. et al. Flow cytometry method validation protocols. *Curr Protoc Cytom* 2019;87(1):53. DOI: 10.1002/cpcy.53.
7. Brown L., Green C., Jones N. et al. Recommendations for the evaluation of specimen stability for flow cytometric testing during drug development. *J Immunol Methods* 2015;418:1–8. DOI: 10.1016/j.jim.2015.01.008.
8. Wood B., Jevremovic D., Bene M.C. et al. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS – part V – assay performance criteria. *Cytometry B Clin Cytom* 2013;84(5):315–23. DOI: 10.1002/cyto.b.21108.

Вклад авторов

А.А. Башарина: анализ полученных результатов, написание статьи;
 Т.А. Богуш: идея исследования и руководство, написание статьи;
 Е.А. Рукавишникова: оформление статьи к публикации;
 Е.А. Богуш: сбор материала для исследования, редактирование статьи;
 С.А. Калюжный: проведение экспериментов;
 Н.О. Вихлянцева: преаналитическая подготовка материала;
 В.С. Косоруков: редактирование статьи, общее руководство темой НИР.

Authors' contributions

A.A. Basharina: analysis of the study data, writing of the manuscript;
 T.A. Bogush: conceptualization, project administration, writing of the manuscript;
 E.A. Rukavishnikova: technical editing of the manuscript;
 E.A. Bogush: provision of study materials, editing of the manuscript;
 S.A. Kaliuzhny: conduction of the research and investigation process;
 N.O. Vikhlyantseva: pre-analytic preparation of study materials;
 V.S. Kosorukov: editing of the manuscript, supervision of the research.

ORCID авторов/ORCID of authors

A.A. Башарина/A.A. Basharina: <https://orcid.org/0000-0002-4739-7733>
 Т.А. Богуш/T.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0002-7673-4284>
 Е.А. Рукавишникова/E.A. Rukavishnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6732-0899>
 Е.А. Богуш/E.A. Bogush: <https://orcid.org/0000-0001-5601-3669>
 С.А. Калюжный/S.A. Kaliuzhny: <https://orcid.org/0000-0002-8701-7707>
 Н.О. Вихлянцева/N.O. Vikhlyantseva: <https://orcid.org/0000-0002-1372-2980>
 В.С. Косоруков/V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено в рамках темы НИР: «Разработка и оценка клинической значимости новой технологии молекулярного прогнозирования резистентности и агрессивности солидных эпителиальных новообразований» (Пер. № AAA-A20-120020500021-1).

Financing. The study was carried out as part of the topic “Development and assessment of the clinical significance of a new technology for molecular prediction of resistance and aggressiveness of solid epithelial neoplasms” (Grant No. AAAA-A20-120020500021-1).

Соблюдение правил биоэтики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием людей или животных в качестве объектов.

Compliance with the rules of bioethics. This article does not contain any research using humans or animals as objects.

Статья поступила: 05.04.2020. Принята к публикации: 30.06.2020.

Article submitted: 05.04.2020. Accepted for publication: 30.06.2020.

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НОВОГО ПРОТИВОГРИБКОВОГО ПРЕПАРАТА АМФАМИД

И.Д. Трещалин, В.А. Голибродо, М.И. Трещалин, А.Н. Тевяшова, Э.Р. Переверзева

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Иван Дмитриевич Трещалин idtivan@yandex.ru

Введение. Амфотерицин В остается препаратом первого выбора в лечении большинства тяжелых системных грибковых инфекций. Однако он характеризуется очень низкой растворимостью и высокой токсичностью. В ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе» («НИИНА») было получено полусинтетическое производное амфотерицина В — амфамид, имеющее ряд преимуществ перед амфотерицином в экспериментах *in vivo*.

Цель исследования — доклиническое изучение токсикологической безопасности лекарственной формы амфамида в хроническом эксперименте на крысах.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах Wistar, самках и самцах. Амфамид в лекарственной форме вводили ежедневно внутривентриально в течение 30 дней в дозах, суммарно составляющих максимально переносимую дозу и LD_{50} (разовые дозы 0,07 и 0,17 мг/кг соответственно). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса животных подвергали эвтаназии. Определяли массовые коэффициенты сердца, печени, почек, селезенки и тимуса, проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что введение амфамида приводит к увеличению содержания мочевины и креатинина в сыворотке крови, изменению состава мочи и увеличению ее удельного веса. При патоморфологическом исследовании найдены поврежденные структуры почек, печени, легких, желудка и семенников, интенсивность которых зависела от дозы препарата. У животных, получавших препарат в низкой дозе, структура этих органов к концу наблюдения полностью восстанавливалась. При использовании амфамида в высокой дозе найдены морфологические признаки токсической кардиомиопатии.

Заключение. Данные клинко-лабораторных исследований, подтвержденные результатами патоморфологического изучения структуры почек, свидетельствуют о том, что нефротоксичность является основным лимитирующим видом токсичности препарата. Изменения, возникающие под действием амфамида, зависят от величины примененной дозы и обратимы в течение месяца, что позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: амфамид, полиены, противогрибковый антибиотик, хроническая токсичность, крысы

Для цитирования: Трещалин И.Д., Голибродо В.А., Трещалин М.И. и др. Доклиническое изучение токсичности нового противогрибкового препарата амфамид. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):57–64.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-57-64



PRECLINICAL TOXICITY STUDY OF THE NEW ANTIFUNGAL DRUG AMPHAMIDE

I.D. Treschalin, V.A. Golibrodov, M.I. Treschalin, A.N. Teyashova, E.R. Pereverzeva

Gause Institute of New Antibiotics; Bld. 1, 11 B. Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia

Introduction. Amphotericin B remains the drug of first choice in the treatment of most severe systemic fungal infections. However, it is characterized by very low solubility and high toxicity. Amphamide — semisynthetic derivative of Amphotericin B — have been prepared at the Gause Institute of New Antibiotics. It showed several advantages over amphotericin B *in vivo*.

Objective. The aim of the study was to investigate the toxicological safety of amphamide drug formulation in chronic experiment on rats.

Materials and methods. The study was performed in male and female Wistar rats. Amphamide drug formulation was injected intraperitoneally at the total doses of MTD and LD_{50} ($30 \times 0,07$ mg/kg or $30 \times 0,17$ mg/kg with 24-h interval). During the experiment body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed. Animals were sacrificed on 1st and 30th day after the end of treatment. At necropsy, the mass coefficients of heart, liver, kidneys, spleen and thymus were calculated. The internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. It has been shown that the treatment with total dose of amphamide produces an increase of urea and creatinine level in serum, changes in urine composition and its specific gravity. Microscopic pathology observation showed dose-dependent structure abnormalities in kidneys, liver, lungs, stomach, and testes. Multiple administration of low dose of the drug produces transient toxic effects completely reversible within 30 days. When amphamide was used in a high dose, morphological signs of toxic cardiomyopathy were found.

Conclusion. The results of the clinical and laboratory studies and microscopic pathology observation of kidneys demonstrate that nephrotoxicity is the main limiting type of drug toxicity. Dose dependence and reversibility within a month of toxic effects of amphotericin allows us to recommend it to further advance.

Key words: amphotericin, polyenes, antifungal antibiotic, chronic toxicity, rats

For citation: Treschalin I.D., Golibrodo V.A., Treschalin M.I. et al. Preclinical toxicity study of the new antifungal drug amphotericin. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):57–64. (In Russ.).

Введение

Амфотерицин В (АмВ) остается незаменимым препаратом для лечения тяжелых системных грибковых инфекций. Открытый в 50-х годах прошлого века, он до сих пор является «золотым стандартом» при лечении системных микозов [1].

Как и все полиеновые антибиотики, АмВ характеризуется очень низкой растворимостью, поэтому при создании лекарственных форм (ЛФ) для парентерального введения часто используют солюбилизующие агенты [2]. Терапия АмВ сопровождается значительными нежелательными эффектами [3, 4]. Приблизительно у 80 % пациентов возникают различные острые побочные реакции (температура, рвота, головная боль), у 30 % – тяжелые нарушения функции почек [5, 6]. С целью преодоления этих недостатков в 90-е годы XX в. был инициирован поиск новых аналогов с высокой растворимостью и антифунгальной активностью, проведены интенсивные исследования по разработке новых ЛФ (липосом, эмульсий, наночастиц) [7]. В результате были созданы такие инновационные продукты, как АмВ-липидные комплексы, липосомальные препараты, коллоидные суспензии и др. По биодоступности липосомальные ЛФ, в частности амбисом, значительно превосходят эмульсии или коллоидные суспензии. Они позволяют применять высокие (выше в 5 раз и более) дозы по сравнению с раствором АмВ без индукции тяжелых побочных эффектов и в настоящее время являются препаратами первого выбора [8]. Однако высокая стоимость лечения не позволяет их использовать широко [9]. К тому же существуют ограничения по времени и условиям хранения, сложности при стерилизации. Все это заставляет продолжать поиски оптимальных производных АмВ. Важность этого препарата сохраняется еще и потому, что случаи формирования лекарственной устойчивости к АмВ регистрируются крайне редко [10].

В ФГБНУ «НИИНА» разработаны методы химической трансформации полиеновых антибиотиков. Получены серии полусинтетических аналогов, изучена их биологическая активность [11]. Среди новых соединений, перспективных для дальнейшего изучения, было отобрано полусинтетическое производное N-(2-аминоэтил)амид амфотерицина В

(амфамид), проявившее ряд преимуществ перед амфотерицином в экспериментах *in vivo* [11].

Цель исследования – изучение хронической токсичности амфамида на крысах.

Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [12].

Исследование проведено на 60 крысах Wistar (30 самцах и 30 самках) массой 150–170 г, полученных из питомника РАН «Андреевка». Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «НИИНА» на стандартном рационе гранулированных кормов со свободным доступом к питьевой воде. После 2-недельного карантина было сформировано 6 групп животных (по 3 группы самцов и самок) по 10 особей.

В работе использован препарат амфамид в ЛФ, представляющей собой лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения. Действующее вещество: L-глутамат N-(2-аминоэтил)амида амфотерицина В (2 мг в расчете на основание амфамида); вспомогательные вещества: 2-(гидроксипропил)- β -циклодекстрин (10 мг), производитель ФГБНУ «НИИНА», Россия.

Выбор доз для исследования был основан на результатах, полученных при изучении острой токсичности препарата [11]. Лиюфилизат растворяли в 5 % растворе глюкозы и в 1 % концентрации вводили внутривенно ежедневно в течение 30 дней с интервалом 24 ч в разовых дозах 0,07 (1/30 максимально-переносимой дозы (МПД)) и 0,17 мг/кг (1/30 ЛД₅₀). Курсовые дозы составили соответственно 2,1 и 5,1 мг/кг. Наблюдение продолжали в течение 30 сут после прекращения введений препарата.

Оценку токсического воздействия амфамида на структуру и функцию органов и тканей животных осуществляли в соответствии с правилами экспериментального изучения фармакологических веществ [13]. На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, определяли их массу тела, производили исследование состава периферической крови (лейкоциты, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоформула, гематокрит)

при помощи автоматического гематологического анализатора “Abacus Junior Vet” (Diatron, Австрия). С использованием автоматического биохимического анализатора “ChemWell” (Awareness Technology Inc., США) на 1-е и 30-е сутки после окончания курса введений препарата в сыворотке крови определяли уровни аланиновой и аспарагиновой аминотрансферазы, щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина и глюкозы. В эти же сроки полуколичественным методом производили клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза, нитраты) при помощи автоматического анализатора мочи “Laura Smart” (Erba Lachema, Чехия) и регистрировали электрокардиограмму во 2-м стандартном отведении (электрокардиограф «ЭК1Т-07» (Аксион, Россия)).

На 1-е и 30-е сутки после проведения курса половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии. Сердце, печень, почку, селезенку и тимус взвешивали и определяли их массовые коэффициенты. Для патоморфологического исследования участки органов и тканей фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике за-

ливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилин-эозином. Результаты обрабатывали статистически при помощи компьютерной программы StatPlus 2006 Professional 3.8.0 с применением *t*-критерия Стьюдента. Различия определяли как достоверные при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

На протяжении эксперимента отклонений в состоянии и поведении животных подопытных групп не отмечено. Крысы хорошо переносили введение препарата, нормально прибавляли в массу тела. Гематологические показатели оставались в пределах физиологической нормы. Признаков анемии, лейкопении, тромбоцитопении, характерных как для конвенционального АмВ, так и для липосомальных ЛФ [7, 14], обнаружено не было.

При исследовании биохимических показателей сыворотки крови на 1-е сутки после окончания курса введений амфамида в обеих изученных дозах и у самцов, и у самок было отмечено повышение уровня креатинина и мочевины (табл. 1). У животных, получавших препарат в высокой дозе, достоверно повышенный уровень креатинина сохранялся до 30 сут после окончания курса введений.

Таблица 1. Содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови крыс после курса введений амфамида

Table 1. Creatinine and blood urea nitrogen (BUN) in the blood serum of rats post treatment using amphetamine formulation

Группа Group	Самцы Males		Самки Females	
	Креатинин, мкмоль/л Creatinine $\mu\text{mol/l M} \pm m$	Мочевина, мкмоль/л Urea $\mu\text{mol/l M} \pm m$	Креатинин, мкмоль/л Creatinine $\mu\text{mol/l M} \pm m$	Мочевина, мкмоль/л Urea $\mu\text{mol/l M} \pm m$
1-е сутки после курса 1 st day after the course				
Контроль Control	80,30 $\pm$ 12,09	7,32 $\pm$ 1,19	85,84 $\pm$ 9,66	7,36 $\pm$ 0,69
1/30 МПД $\times$ 30/24 1/30 MTD $\times$ 30/24	114,84 $\pm$ 5,27*	9,74 $\pm$ 0,25*	119,96 $\pm$ 8,10*	9,78 $\pm$ 0,58*
1/30 ЛД ₅₀ $\times$ 30/24 1/30 LD ₅₀ $\times$ 30/24	156,22 $\pm$ 11,25*	10,30 $\pm$ 0,37*	135,06 $\pm$ 9,96*	10,62 $\pm$ 0,54*
30-е сутки после курса 30 th day after the course				
Контроль Control	92,46 $\pm$ 7,83	7,86 $\pm$ 0,20	80,96 $\pm$ 5,48	7,70 $\pm$ 0,21
1/30 МПД $\times$ 30/24 1/30 MTD $\times$ 30/24	94,36 $\pm$ 10,27	7,30 $\pm$ 0,66	95,56 $\pm$ 8,33	7,16 $\pm$ 0,88
1/30 ЛД ₅₀ $\times$ 30/24 1/30 LD ₅₀ $\times$ 30/24	101,16 $\pm$ 3,59*	7,06 $\pm$ 0,98	109,94 $\pm$ 8,30*	7,06 $\pm$ 1,00

*Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3: М — среднее значение; m — стандартное отклонение; МПД — максимально-переносимая доза; ЛД₅₀ — доза половинной выживаемости, среднесмертельная доза.

*Differences with the control are significant at $p \leq 0.05$.

Note. Here and in tables 2, 3: M — average value; m — standard deviation; MTD — maximum-tolerated dose; LD₅₀ — lethal dose 50.

При исследовании состава мочи на 1-е сутки по окончании курса введений амфамида в высокой дозе у самцов и самок были зарегистрированы повышение уровня уробилиногена, белка, нитратов и удельного веса, появление кетоновых тел. Кроме того, независимо от величины примененной дозы у самок в моче были найдены лейкоциты и эритроциты. При применении препарата в низкой дозе у самок также было отмечено повышение уровня белка и удельного веса мочи (табл. 2). На 30-е сутки после окончания курса введений препарата различий между подопытными и контрольными группами не выявлено.

На 1-е сутки после окончания курса введений препарата в обеих изученных дозах и у самцов, и у самок было выявлено увеличение массовых коэффициентов почек. На 30-е сутки их значения не отличались от контроля (табл. 3).

Признаки нефротоксического действия препарата были обнаружены и при патоморфологическом исследовании. Курсовое введение амфамида приводило к развитию экстракапиллярного гломерулонефрита, который выражался в гиперплазии париетального эндотелия клубочков в виде полулуний, атрофии их капиллярной сети (рис. 1а, б), а также дистрофических, атрофических и деструктивных изменениях эпителия канальцев (рис. 1в). Масштаб патологиче-

ских изменений и скорость репарации зависели от величины примененной дозы препарата. Так, при применении амфамида в дозе, суммарно составляющей МПД, на 1-е сутки после курса были найдены единичные небольшие очаги некроза извитых канальцев. Утолщение париетального листка капсулы, очаговая деструкция капиллярной сети были отмечены в единичных клубочках юкстамедуллярной зоны. При введении амфамида в высокой дозе множественные изменения такого же характера обнаружены не только в юкстамедуллярной, но и в корковой зоне. На месте поврежденных дистальных канальцев формировались кисты.

К 30-м суткам по окончании курса введений у большинства животных, получавших амфамид в низкой дозе, структура почек не отличалась от контроля. У 2 самцов и 2 самок, получивших суммарно дозу, равную ЛД₅₀, морфологических изменений ткани почек на этот срок наблюдения не найдено. У остальных в корковой и юкстамедуллярной зонах встречались единичные клубочки с фиброзированной капсулой или рубцующиеся клубочки и очаги некроза извитых канальцев в состоянии организации (рис. 1г).

Изучение патологических изменений внутренних органов крыс показало, что применение препарата в обеих дозах вызывает изменения тканей печени, легких, желудка и семенников. У животных, получавших

Таблица 2. Клинический анализ мочи крыс на 1-е сутки после курса введений амфамида

Table 2. Clinical analysis of rat urine post treatment using amphamide formulation

Группа Group	Эритроциты, ед/мкл Erythrocytes, u/μl	Лейкоциты, ед/мкл Leucocytes, u/μl	Уробилиноген, мкмоль/л Urobilinogen, μmol/l	Кетоны, ммоль/л Ketones, mmol/l	Нитраты Nitrates	Белок, % Protein, %	Удельный вес, г/л Specific gravity, g/l
Самцы <i>Males</i>							
Контроль Control	—	—	—	—	—	0–0,3	1,020–1,024
1/30 МПД × 30/24 1/30 MTD × 30/24	—	—	—	—	—	0–0,3	1,021–1,022
1/30 ЛД ₅₀ × 30/24 1/30 LD ₅₀ × 30/24	—	—	10–17*	0–0,05*	+	0,3–0,5*	1,025–1,030*
Самки <i>Females</i>							
Контроль Control	—	—	—	—	—	0–0,3	1,024–1,026
1/30 МПД × 30/24 1/30 MTD × 30/24	0–10	0–10	—	—	—	0,3–0,5*	1,027–1,030*
1/30 ЛД ₅₀ × 30/24 1/30 LD ₅₀ × 30/24	0–10	10–15	10–17*	0–0,07*	+	0,5–0,7*	1,028–1,031*

*Значение превышает контроль.

*Value is greater than the control.

Таблица 3. Массовые коэффициенты почек крыс после курса введений амфамида

Table 3. Weight indices of rat kidneys post treatment using amphetamine formulation

Группа Group	Массовый коэффициент почки (M ± m) Kidney mass coefficient (M ± m)	
	1-е сутки после курса 1 st day after the course	30-е сутки после курса 30 th day after the course
Самцы Males		
Контроль Control	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,04
1/30 МПД × 30/24 1/30 MTD × 30/24	0,28 ± 0,03*	0,23 ± 0,02
1/30 ЛД ₅₀ × 30/24 1/30 LD ₅₀ × 30/24	0,29 ± 0,01*	0,24 ± 0,01
Самки Females		
Контроль Control	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,01
1/30 МПД × 30/24 1/30 MTD × 30/24	0,27 ± 0,0*	0,26 ± 0,02
1/30 ЛД ₅₀ × 30/24 1/30 LD ₅₀ × 30/24	0,29 ± 0,02*	0,26 ± 0,02

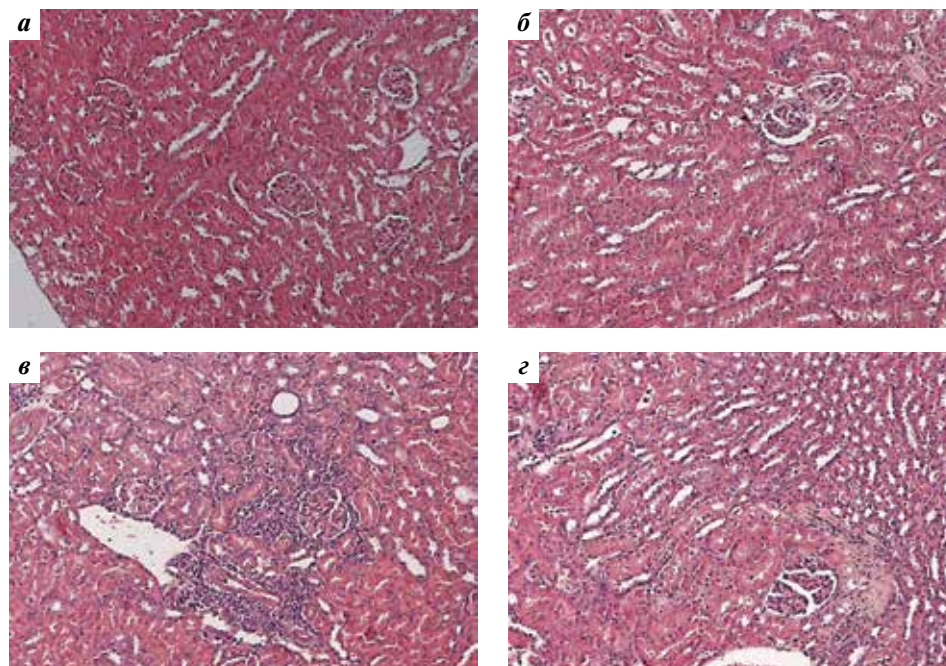
*Различия с контролем достоверны при $p \leq 0,05$.*Differences with the control are significant at $p \leq 0.05$.

Рис. 1. Почки крысы: а — контроль; б — амфамид, 0,17 мг/кг × 30; 1-е сутки после курса; в клубочке утолщение париетального листка капсулы в виде полулуния, атрофия капиллярной сети; в — амфамид, 0,17 мг/кг × 30; 1-е сутки после курса; очаги некроза извитых канальцев вокруг сосуда и клубочков, кисты; г — амфамид, 0,17 мг/кг × 30; 30-е сутки после курса; очаг некроза канальцев в стадии организации; фиброз капсулы клубочка и капиллярных петель; окраска гематоксилин-эозином. ×200

Fig. 1. Rat kidney: а — control; б — amphetamine, 30 × 0,17 mg/kg/day; 1 day post treatment; thickening of the parietal leaf of the glomerulus capsule in the form of a half moon, atrophy of the capillary network; в — amphetamine, 30 × 0,17 mg/kg/day; 1 day post treatment; necrotic foci of convoluted tubules around blood vessels and glomeruli, cysts; г — amphetamine, 30 × 0,17 mg/kg/day; 30 day post treatment; the focus of tubal necrosis in the stage of organization; fibrosis of the glomerular capsule and capillary loops; staining with haematoxylin-eosin. ×200

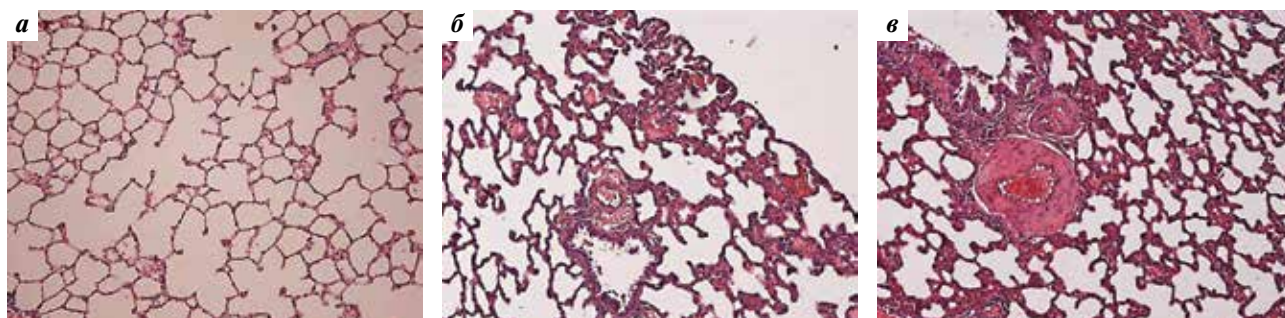


Рис. 2. Легкое крысы: а — контроль; б — амфамид, 0,07 мг/кг $\times$ 30; 1-е сутки после курса; полнокровие капилляров альвеолярных перегородок, стаз крови в венах; в — амфамид, 0,17 мг/кг $\times$ 30; 1-е сутки после курса; резкая гипертрофия мышечной оболочки крупной артерии; окраска гематоксилин-эозином. $\times$ 200

Fig. 2. Rat lung: а — control; б — amphetamine, 30 $\times$ 0,07 mg/kg/day; 1 day post treatment; congested alveolar capillaries, blood stasis in the venules; в — amphetamine, 30 $\times$ 0,17 mg/kg/day; 1 day post treatment; pronounced thickening of the medial layer of arteriolar wall; staining with haematoxylin-eosin. $\times$ 200

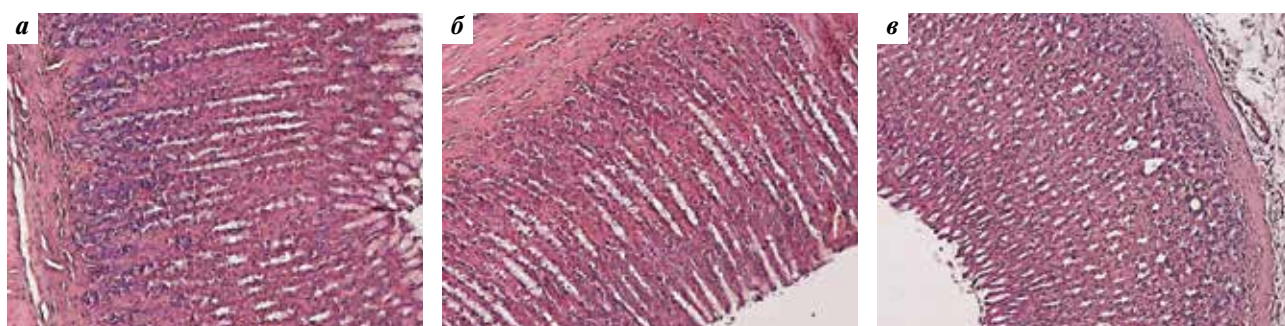


Рис. 3. Желудок крысы: а — контроль; б — амфамид, 0,17 мг/кг $\times$ 30; 1-е сутки после курса; преобладание обкладочных клеток в области дна желез, активация их функции в области тела; в — амфамид, 0,17 мг/кг $\times$ 30; 30-е сутки после курса; единичные кисты в области тела желез; окраска гематоксилин-эозином. $\times$ 200

Fig. 3. Rat stomach: а — control; б — amphetamine, 30 $\times$ 0,17 mg/kg/day; 1 day post treatment; prevalence of the parietal cells in the bottom of the gastric glands, activation of their function in the body of the gastric glands; в — amphetamine, 30 $\times$ 0,17 mg/kg/day; 30 day post treatment; single cysts in the body of the gastric glands; staining with haematoxylin-eosin. $\times$ 200

препарат в курсовой дозе, составляющей МПД, структура печени, слизистой оболочки желудка, легкого и сперматогенного эпителия к концу наблюдения полностью восстанавливалась.

При использовании амфамида в курсовой дозе, равной ЛД₅₀, у части крыс сразу после курса введений были найдены мелкие очаги отека и токсической кардиомиопатии. К концу эксперимента эти явления нарастали и наблюдались уже у всех животных.

Гепатотоксические свойства амфамида морфологически проявлялись в виде очаговых дистрофических и деструктивных изменений гепатоцитов. При применении амфамида в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, у отдельных животных на 30-е сутки после курса были обнаружены единичные мелкие очаги микронекроза с признаками организации.

У крыс, получавших амфамид в обеих изученных дозах, в легком были выявлены полнокровие капилляров альвеолярных перегородок, стаз крови в сосудах малого калибра (рис. 2а, б), а при использовании высокой дозы препарата еще и резкая гипертрофия меди крупн

являются морфологическим признаком артериальной гипертонии, которая может быть следствием повреждающего воздействия амфамида на структуру почек.

При курсовом введении амфамида в низкой дозе изменения структуры слизистой оболочки желудка были связаны, главным образом, с транзиторной активацией функции главных клеток. Использование препарата в высокой дозе приводило к уменьшению числа главных клеток в области дна желез, активации функции обкладочных клеток в области тела желез (рис. 3а, б), а на отдельных участках и к деструкции эпителия желез с образованием кист. Через месяц после курса в слизистой оболочке желудка были найдены единичные кисты (рис. 3в). В остальном ее структура практически не отличалась от контроля.

Применение амфамида в суммарной дозе, равной ЛД₅₀, приводило к дисконформации сперматогенного эпителия в значительной части канальцев. К концу эксперимента у большинства животных структура органа восстанавливалась. Лишь у отдельных животных в единичных канальцах все еще можно было обнаружить незрелые клетки.

Таким образом, основным лимитирующим видом токсичности амфамида, также как и АмВ, является нефротоксичность. Клиническая и морфологическая картина повреждения почек при его применении практически такая же, как при использовании АмВ, поэтому можно предположить, что механизм нефротоксичности этих препаратов идентичен и определяется как сродством к холестерину, так и способностью резко снижать скорость клубочковой фильтрации за счет вазоконстрикции [15, 16].

Как и АмВ, амфамид обладает гепатотоксическими свойствами, но если введение АмВ приводит к нарушениям функции печени [4], то амфамид в переносимой дозе вызывает минимальные морфологические изменения этого органа, полностью обратимые в течение месяца.

Внутривенная инфузия АмВ часто сопровождается резким снижением уровня калия в крови, что приводит к изменениям функции сердца (гипертензии, гипотензии, брадикардии, вентрикулярной аритмии) [17]. В наших экспериментах на крысах эти явления обнаружены не были, однако при патоморфологическом исследовании миокарда установлено, что при введении препарата в курсовой дозе, равной ЛД₅₀, у животных развивается токсическая кардиомиопатия. В литературе, посвященной исследованиям побочного действия АмВ, описаны еди-

ничные случаи токсической кардиомиопатии у пациентов, длительно получавших препарат [4].

Поскольку изменения структуры внутренних органов крыс, возникающие под действием амфамида, зависят от величины примененной дозы и в большинстве случаев обратимы в течение 30 сут, препарат можно рекомендовать для дальнейшего изучения.

Выводы

Применение амфамида в изученных дозах не оказывает влияния на клинико-лабораторные показатели функции органов и систем крыс, за исключением тех, которые характеризуют функцию почек.

Нефротоксичность является лимитирующим видом токсичности амфамида, что подтверждается как клинико-лабораторным, так и патоморфологическим исследованием. Степень ее проявления и обратимость токсического действия зависят от величины примененной дозы препарата.

Применение препарата приводит к повреждению структуры печени, легкого, семенников и желудка. У животных, получавших амфамид в дозе, суммарно составляющей МПД, морфологическое строение этих органов полностью восстанавливается через месяц после курса.

Кардиотоксические свойства амфамида проявляются только морфологически при введении препарата в высокой дозе.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Anderson C.M. Sodium chloride treatment of amphotericin B nephrotoxicity – standard of care? *West J Med* 1995;162(4):313–7. PMID: 7747495.
- Plumb D.C. *Veterinary Drug Handbook*. PharmaVet. Publishing, White Bear Lake, USA, 1999. 853 p.
- Johnson R.H., Einstein H.E. Amphotericin B and coccidioidomycosis. *Ann NY Acad Sci* 2007;1111:434–41. DOI: 10.1196/annals.1406.019.
- Laniado-Laborín R., Cabrales-Vargas M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol* 2009;26(4):223–7. DOI: 10.1016/j.riam.2009.06.003.
- Ostrosky-Zeichner L., Marr K.A., Rex J.H., Cohen S.H. Amphotericin B: time for a new “gold standard”. *Clin Infect Dis* 2003;37:415–25. DOI: 10.1086/376634.
- Sawaya B.P., Briggs J.P., Schnermann J. Amphotericin B nephrotoxicity: the adverse consequences of altered membrane properties. *J Am Soc Nephrol* 1995;6:154–64. PMID: 7579079.
- Lemke A., Kiderlen A.F., Kayser O. Amphotericin B. *Applied Microbiol Biotechnol* 2005;68(2):151–62. DOI: 10.1007/s00253-005-1955-9.
- Hamill R.J. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs* 2013;73(9):919–34. DOI: 10.1007/s40265-013-0069-4.
- Borba H.H.L., Steimbach L.M., Riveros B.S. et al. Cost-effectiveness of amphotericin B formulations in the treatment of systemic fungal infections. *Mycoses* 2018;61(10):754–63. DOI: 10.1111/mic.12801.
- Kaur L., Abhijeet J.S.K. Safe and Effective Delivery of Amphotericin B: A Survey of Patents. *Recent Pat Nanotechnol* 2017;11(3):214–34. DOI: 10.2174/1872210511666170105130210.
- Tevyashova A. N., Bychkova E.N., Solovieva S.E. et al. Discovery of Amphamide, a Drug Candidate for the Second Generation of Polyene Antibiotics. *ACS Infect Dis* 2020;6:2029–44. <https://dx.doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00068>
- European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe), ETS No. 123, 1986.
- Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М., 2008. [Guskova T.A. Drug toxicology. Moscow, 2008. (In Russ.)].
- Fielding R.M., Singer A.W., Wang L.H. et al. Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36(2):299–307. DOI: 10.1128/aac.36.2.299.
- Fanos V., Cataldi L. Amphotericin B-induced nephrotoxicity: A review. *J Chemother* 2000;12(6):463–70. DOI: 10.1179/joc.2000.12.6.463.
- Sabra R., Takahashi K., Branch R.A., Badr K.F. Mechanisms of amphotericin B induced reduction of the glomerular filtration rate: a micropuncture study. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:34–7. PMID: 2329517.
- Danaher P.J., Cao M.K., Anstead G.M., Matthew J. et al. Reversible dilated cardiomyopathy related to amphotericin B therapy. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:115–7. DOI: 10.1093/jac/dkg472.

Вклад авторов

И.Д. Трещалин: руководство доклиническими исследованиями препарата, анализ полученных результатов, написание статьи;
В.А. Голибродо: получение данных для анализа, введение препарата, исследование мочи, статистическая обработка данных;
М.И. Трещалин: биохимическое исследование сыворотки крови, получение данных для анализа, статистическая обработка данных;
А.Н. Тевяшова: разработка субстанции и лекарственной формы амфамида, наработка препарата для проведения исследования;
Э.Р. Переверзева: патоморфологическое исследование внутренних органов животных, анализ полученных результатов, написание статьи.

Authors contributions

I.D. Treschalin: a guide to preclinical studies of the drug, analysis of the obtained results, writing an article;
V.A. Golibrodo: receiving data for analysis, drug administration, urinalysis, statistical data processing;
M.I. Treschalin: biochemical analysis of blood serum, hematological analysis of peripheral blood, data analysis, statistical data processing;
A.N. Tevyashova: development of substances and drug formulation of amphetamine, production of the drug to conduct the study;
E.R. Pereverzeva: pathomorphological evaluation of internal organs of animals, analysis of the results obtained, writing an article.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Д. Трещалин / I.D. Treschalin: <https://orcid.org/0000-0001-7331-5490>
В.А. Голибродо / V.A. Golibrodo: <https://orcid.org/0000-0001-8643-6427>
М.И. Трещалин / M.I. Treschalin: <https://orcid.org/0000-0002-5652-8686>
А.Н. Тевяшова / A.N. Tevyashova: <https://orcid.org/0000-0003-1091-1011>
Э.Р. Переверзева / E.R. Pereverzeva: <https://orcid.org/0000-0001-7368-9695>

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: 18.06.2020. Принята в печать: 17.09.2020.

Article submitted: 18.06.2020. Accepted for publication: 17.09.2020.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ АНТИТЕЛ HLA-DR НА ОЦЕНКУ КОЛИЧЕСТВА CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-КЛЕТОК В КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С В-КЛЕТОЧНЫМ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЦИТАРНЫМ ЛЕЙКОЗОМ

А.В. Пономарев^{1,2}, В.А. Мисюрин^{1,2}, М.А. Барышникова¹

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

²ООО «ГеноТехнология»; Россия, 117485 Москва, ул. Профсоюзная, 104

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. В последнее время активно изучаются иммунорегуляторные способности миелоидных супрессорных клеток, а также проводятся исследования их в качестве прогностического фактора.

Цель исследования — оптимизация методики измерения моноцитарных миелоидных супрессорных клеток в периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом.

Материалы и методы. С помощью проточной цитометрии было определено количество миелоидных супрессорных клеток с фенотипом CD14⁺HLA-DR^{LOW/-} в периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом и здоровых доноров. Измерение проводилось в 2 точках, которые отличались концентрацией антител к HLA-DR: 15 и 4 мкл.

Результаты. Медиана количества миелоидных супрессорных клеток в периферической крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом при 15 мкл антител к HLA-DR составила 1,9 %, при 4 мкл — 7 %. Для здоровых доноров при 15 мкл антител медиана составила 0,15 %, при 4 мкл — 0,3 %.

Заключение. Значение количества CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-клеток в крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом чувствительно к концентрации антител HLA-DR.

Ключевые слова: миелоидные супрессорные клетки, хронический лимфоцитарный лейкоз, проточная цитофлуориметрия

Для цитирования: Пономарев А.В., Мисюрин В.А., Барышникова М.А. Влияние концентрации антител HLA-DR на оценку количества CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-клеток в крови пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):66–8.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-66-68



EFFECT OF HLA-DR ANTIBODY CONCENTRATION ON ESTIMATION OF THE NUMBER OF CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-CELLS IN THE BLOOD OF PATIENTS WITH B-CELL CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

A.V. Ponomarev^{1,2}, V.A. Misyurin^{1,2}, M.A. Baryshnikova¹

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

²“GenoTechnology” LLC; 104 Profsoyuznaya St., Moscow 117485, Russia

Introduction. Immunoregulatory functions of myeloid-derived suppressor cells have been extensively studied over the recent decades. Additionally, myeloid-derived suppressor cells have been investigated as a prognostic factor.

Objective. To optimize the measurement of monocytic myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.

Materials and methods. The number of myeloid-derived suppressor cells with CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-phenotype was determined in the peripheral blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and healthy donors by flow cytometry. The measurement was carried out at two points, which differed in the concentration of anti-HLA-DR antibodies — 15 and 4 µl.

Results. The median amount of myeloid-derived suppressor cells in the peripheral blood of B-cell chronic lymphocytic leukemia patients with 15 µl of anti-HLA-DR antibody was 1.9 %, and with 4 µl of antibody concentration — 7 %. Healthy donors had that median of 0.15 % with 15 µl of antibody and 0.3 % with 4 µl concentration.

Conclusion. The number of CD14⁺HLA-DR^{LOW/-}-cells in the blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia is sensitive to the concentration of the HLA-DR antibody.

Key words: myeloid-derived suppressor cells, chronic lymphocytic leukemia, flow cytometry

For citation: Ponomarev A.V., Misyurin V.A., Baryshnikova M.A. Effect of HLA-DR antibody concentration on estimation of the number of CD14⁺HLA-DR^{low/-}-cells in the blood of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):66–8. (In Russ.).

Введение

Миелоидные супрессорные клетки (Myeloid-derived suppressor cells, MDSC) — это гетерогенная популяция клеток, встречающаяся при различных заболеваниях, включая опухоли. Эти клетки представляют собой патологическое состояние активации моноцитов и относительно незрелых нейтрофилов. Характерная особенность MDSC — их способность ингибировать функции Т-клеток, что может способствовать патогенезу различных заболеваний [1], в том числе и онкогематологических [2]. Моноцитарные MDSC имеют фенотип CD14⁺HLA-DR^{low/-} [1]. Данные клетки показывают положительную корреляцию их количества в периферической крови с опухолевой нагрузкой и стадией заболевания при В-клеточном хроническом лимфоцитарном лейкозе (В-ХЛЛ) [2].

Наши первоначальные результаты изучения моноцитарных MDSC несколько расходились с данными литературы. После дополнительного изучения в методику были внесены корректировки. В соответствии с рекомендациями [3] мы отказались от применения изотипического контроля, но применяли контроль Fluorescence Minus One. Снижение концентрации антител к HLA-DR позволило более четко отделить популяцию моноцитарных MDSC в исследуемой группе В-ХЛЛ от значений нормы.

Цель исследования — оптимизация методики измерения моноцитарных MDSC в периферической крови пациентов с В-ХЛЛ.

Материалы и методы

Образцы периферической крови были взяты у 14 пациентов с диагнозом В-ХЛЛ на базе ООО «ГеноТехнология». Также были взяты образцы периферической крови у 2 здоровых доноров. Все образцы исследовали в день взятия крови. Для проточной цитометрии применяли антитела CD14 FITC (IM0645U, Beckman Coulter) 6 мкл и HLA-DR PE (347401, BD Pharmingen™) в объеме 15 или 4 мкл на 100 мкл образца периферической крови. В соответствии с рекомендациями [3] изотипический контроль не добавляли. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II с использованием программного обеспечения FACSDiva™ (Becton Dickinson).

Результаты

Для каждого образца проводили 2 измерения CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток. В первом случае в пробу добавляли 15 мкл антител HLA-DR, во втором — 4 мкл. В табл. 1 представлены результаты значений количе-

ства CD14⁺HLA-DR^{low/-} у пациентов с В-ХЛЛ. Можно видеть, что в случае добавления 4 мкл антител процент CD14⁺HLA-DR^{low/-}-клеток увеличивается (медиана 7 %) по сравнению с данными после добавления 15 мкл антител HLA-DR (медиана 1,9 %). Как видно из табл. 2, снижение концентрации антител HLA-DR слабо влияет на значение клеток CD14⁺HLA-DR^{low/-} в норме (медиана 0,15 и 0,3 %). Это может объясняться более низкой плотностью экспрессии антигена HLA-DR на моноцитах при В-ХЛЛ по сравнению с нормой. Снижение концентрации антител HLA-DR не только приводит к его экономии, но и дает возможность более четкого выделения MDSC для изучения корреляций со стадией заболевания и другими клиническими характеристиками. Помимо этого, при таком подходе возможно более четкое отделение количества клеток MDSC в норме от их количества при В-ХЛЛ.

Таблица 1. Значение количества клеток CD14⁺HLA-DR^{low/-} в группе пациентов с В-клеточным хроническим лимфоцитарным лейкозом

Table 1. The value of the number of CD14⁺HLA-DR^{low/-}-cells in group of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia

Пациент Patient	Содержание CD14 ⁺ HLA-DR ^{low/-} во всех CD14 ⁺ , % CD14 ⁺ HLA-DR ^{low/-} level in all CD14 ⁺ , %	
	15 мкл антител к HLA-DR 15 µl antibodies to HLA-DR	4 мкл антител к HLA-DR 4 µl antibodies to HLA-DR
1	2,7	21,7
2	2,1	6,9
3	0,6	2,4
4	2,6	14,2
5	4,3	11,4
6	1,0	1,0
7	0,4	3,4
8	7,6	20,2
9	1,7	7,1
10	1,7	5,3
11	0,5	1,8
12	0,9	3,8
13	2,2	17,7
14	12,7	42,0
Медиана Median	1,9	7,0

Таблица 2. Значение количества клеток $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ в группе здоровых доноровTable 2. The value of the number of $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -cells in group of healthy donors

Здоровый донор Healthy donor	Содержание $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ во всех $CD14^+$, % $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ level in all $CD14^+$, %	
	15 мкл антител к HLA-DR 15 μ l antibodies to HLA-DR	4 мкл антител к HLA-DR 4 μ l antibodies to HLA-DR
1	0,1	0,1
2	0,2	0,5
Медиана Median	0,15	0,3

Выводы

Наблюдаемое количество $CD14^+HLA-DR^{low/-}$ -клеток в крови пациентов с В-ХЛЛ зависит от концентрации

антител HLA-DR. Согласно нашим экспериментам оптимальная концентрация антител HLA-DR для точного выделения MDSC составляет 4 мкл, а не 15 мкл.

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

- Veglia F., Perego M., Gabrilovich D. Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nat Immunol* 2018;19(2):108–19. DOI: 10.1038/s41590-017-0022-x.
- Пономарев А.В. Миелоидные супрессорные клетки при некоторых онкогематологических заболеваниях. Клиническая онкогематология 2017;10(1): 29–38. DOI: 10.21320/2500-2139-2017-10-1-29-38. [Ponomarev A.V. Myeloid-derived suppressor cells in some oncohematological diseases. *Klinicheskaya onkogematologiya* = *Clinical Oncohematology* 2017;10(1):29–38. (In Russ.)].
- Andersen M.N., Al-Karradi S.N.H., Kragstrup T.W., Hokland M. Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages. *Cytometry A* 2016;89(11): 1001–9. DOI: 10.1002/cyto.a.22995.

Вклад авторов

А.В. Пономарев: разработка дизайна исследования, получение и анализ данных, написание текста рукописи;

В.А. Мисюрин: анализ данных, написание текста рукописи;

М.А. Барышникова: анализ данных, редактирование и оформление рукописи.

Author's contributions

A.V. Ponomarev: developing the research design, data collection and analyze, writing the text of the manuscript;

V.A. Misyurin: data analyze, writing the text of the manuscript;

M.A. Baryshnikova: data analyze, editing and design of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Пономарев / A.V. Ponomarev: <https://orcid.org/0000-0001-9517-8183>

В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования № 3 от 13.02.2020 г. одобрен комитетом по биомедицинской этике НИИ ЭДито 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 No 3 of 13.02.2020 was approved by the biomedical ethics committee of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 19.06.2020. **Принята к публикации:** 30.06.2020.

Article submitted: 19.06.2020. **Accepted for publication:** 30.06.2020.

