

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2020 • том 19 • № 4

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

4

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

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Шпрах Зоя Сергеевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией химико-фармацевтического анализа ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, доцент кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Караулов Александр Викторович, академик РАН, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Дмитриева Мария Вячеславовна, к.фарм.н., старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Балдуева Ирина Александровна, д.м.н., доцент, заведующая научным отделом онкоиммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России (Санкт-Петербург, Россия)

Бочарова Ольга Алексеевна, д.б.н., профессор, заведующая лабораторией иммунофармакологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

ОСНОВАН В 2002 г. ПРОФЕССОРОМ А.Ю. БАРЫШНИКОВЫМ

4^{ТОМ 19}
'20

Учредители

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 Е.М. Печерская

Корректор М.С. Пахомова

Дизайн Е.В. Степанова

Верстка О.В. Гончарук

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

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

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Российский биотерапевтический
журнал. 2020. Том 19. № 4. 1–96.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2020
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» — 81679.
Отпечатано в типографии
ООО «Буки Веди».
[http://www.ronc.ru/specialists/usefull/
journals/138/](http://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/)
<http://bioterapevt.elpub.ru>

Бунятян Наталья Дмитриевна, д.фарм.н., профессор, главный аналитик Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, заведующая кафедрой фармацевтической технологии и фармакологии ИПО ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Голенков Анатолий Константинович, д.м.н., профессор, заслуженный врач РФ, профессор кафедры терапии, врач-гематолог отделения клинической гематологии и иммунотерапии ГБУЗ МО «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского» (Москва, Россия)

Демидов Лев Вадимович, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Евсегнеева Ирина Валентиновна, д.м.н., профессор, профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Иванов Павел Константинович, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кадагидзе Заира Григорьевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Краснов Виктор Павлович, д.х.н., профессор, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией асимметрического синтеза Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН (Екатеринбург, Россия)

Кубасова Ирина Юрьевна, к.м.н., ученый секретарь ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Меерович Игорь Геннадьевич, к.б.н., сотрудник кафедры фармацевтических наук факультета фармации и медицинских специальностей Крейтоновского университета (Омаха, Небраска, США)

Мисюрин Андрей Витальевич, д.б.н., генеральный директор ООО «Генотехнология» (Москва, Россия)

Набиев Игорь Руфаилович, д.х.н., профессор, профессор лаборатории по исследованиям в области нанонаук Реймского университета (Реймс, Франция), ведущий ученый лаборатории нано-биоинженерии Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» (Москва, Россия)

Новиков Виктор Владимирович, д.б.н., профессор, профессор кафедры молекулярной биологии и иммунологии Института биологии и биомедицины Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского, заведующий лабораторией иммунохимии ФБУН «Нижегородский Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» (Нижний Новгород, Россия)

Оборотова Наталия Александровна, д.фарм.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Панкратов Андрей Александрович, к.б.н., руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой терапии Московского научного исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России (Москва, Россия)

Петров Александр Юрьевич, д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармации и химии Уральского государственного медицинского университета (Екатеринбург, Россия)

Рапопорт Наталья Яковлевна, д.х.н., профессор, почетный профессор департамента биомедицинской инженерии Университета Юты (Солт-Лейк-Сити, Юта, США)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., заместитель директора Департамента стратегического развития Минобрнауки России (Москва, Россия)

Титов Константин Сергеевич, д.м.н., заведующий онкохирургическим отделением опухолей кожи и мягких тканей ГБУЗ г. Москвы «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

Тупицын Николай Николаевич, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии гемопоэза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Уласов Илья Валентинович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, лидер группы экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва, Россия)

Шубина Ирина Жановна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

EDITOR-IN-CHIEF

Shprakh Zoya S., PhD, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; Associate Professor of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, IPE FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

Karaulov Alexander V., Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Baryshnikova Maria A., PhD, Head of Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Dmitrieva Maria V., PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Baldueva Irina A., PhD, DSc, Associate Professor, Head of Research Department of Oncoimmunology, N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Saint Petersburg, Russia)

Bocharova Olga A., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Immunopharmacology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Bunyatyán Natalia D., PhD, DSc, Professor, Chief Analyst of Center of Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Health of Russia; Head of Chair of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, IPE FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

4 VOL. 19
'20

FOUNDED IN 2002 BY PROFESSOR A.YU. BARYSHNIKOV

Founders

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 E.M. Pecherskaya
Proofreaders M.S. Pakhomova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered
at the Federal Service for Supervision
of Communications, Information
Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695
dated 21.01.2002;
ПИ № ФС77-53039
dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Rossiysky Bioterapevtichesky
Zhurnal. 2020. Volume 19.
No 4. 1–96.
© 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://www.ronc.ru/specialists/usefull/journals/138/)
<http://bioterapevt.elpub.ru>

Golenkov Anatoly K., PhD, DSc, Professor, Honored Doctor of the Russia, Professor of Chair of Therapy, Doctor Hematologist of Department of Clinical Hematology and Immunotherapy, M.F. Vladimirsky Moscow Region Scientific Research Clinical Institute (MONIKI) (Moscow, Russia)

Demidov Lev V., MD, PhD, DSc, Professor, Head of Surgical Department 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Evsegneeva Irina V., PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Ivanov Pavel K., PhD, DSc, Head of Laboratory of Medical Biotechnology, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Kadagidze Zaira G., MD, PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Centralized Clinical-Laboratory Department, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Krasnov Viktor P., PhD, DSc, Professor, Major Researcher, Head of Laboratory of Asymmetrical Synthesis, I.Ya. Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of Russian Academy of Sciences (Ekaterinburg, Russia)

Kubasova Irina Yu., PhD, Scientific Registrar, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Meerovich Igor G., PhD, Specialist, Chair of Pharmaceutical Science of Faculty of Pharmacy and Specialities, Creighton University (Omaha, Nebraska, USA)

Misyurin Andrey V., PhD, DSc, General Director of LLC «GeneTechnology» (Moscow, Russia)

Nabiev Igor R., PhD, DSc, Professor, Professor of Laboratory of Studies in the Field of Nanoscience, University of Reims (Reims, France), Leading Scientist of Laboratory Nano-Bioengineering, National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute) (Moscow, Russia)

Novikov Viktor V., PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Molecular Biology and Immunology of Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky Nizhegorodsky State University; Head of Laboratory Immunochimistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Nizhniy Novgorod, Russia)

Oborotova Natalia A., PhD, DSc, Professor, Leading Researcher of Laboratory of Development of Drug Forms, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Pankratov Andrey A., PhD, Chief of Department of Modifiers and Protectors of Anti-tumor Therapy, P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Petrov Alexander Yu., PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Pharmacy, Ural's State Medical University, (Ekaterinburg, Russia)

Rapoport Natalya Ya., PhD, DSc, Research Professor Emerita, Department of Biomedical Engineering, University of Utah (Salt Lake City, Utah, USA)

Stepanova Eugenia V., PhD, DSc, Deputy Director of Department of Strategic Development, Ministry of Education and Science of Russia (Moscow, Russia)

Titov Konstantin S., PhD, DSc, Head of Department of Oncosurgery of Skin and Soft Tissues, A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Health Department (Moscow, Russia)

Tupinsin Nikolay N., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Immunology of Hematopoiesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Ulasov Ilya V., PhD, DSc, Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Shubina Irina Zh., PhD, DSc, Leading Researcher, Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>С.В. Чулкова, Д.А. Рябчиков, И.А. Дудина, И.В. Савченко, А.В. Егорова, И.А. Гладилина, Н.Н. Тупицын</i>	
Роль и механизмы эпителиально-мезенхимального перехода в прогрессировании меланомы	8
<i>Е.А. Быкова, Н.А. Фалалеева, Л.Ю. Гривцова</i>	
Рак поджелудочной железы, современные терапевтические подходы и возможные перспективы.	18
<i>М.Н. Хагажеева, А.В. Снеговой, В.Н. Блиндарь, Д.А. Рябчиков, М.М. Добровольская, И.Б. Кононенко, А.М. Келеметов, А.М. Казаков, О.В. Пальчинская</i>	
Роль гепсидина 25 в развитии анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными заболеваниями	29
<i>О.А. Бочарова, Р.В. Карпова, Е.В. Бочаров, А.А. Вершинская, М.А. Барышникова, И.В. Казеев, В.Г. Кучеряну, М.В. Киселевский, В.Б. Матвеев</i>	
Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитокомпозиций	35

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>А.Д. Палладина, А.В. Попа, В.Г. Никитаев, К.Л. Кондратчик, Н.А. Купрышина, И.Н. Серебрякова, Т.В. Шведова, О.А. Чернышева, М.А. Шервашидзе, Н.Н. Тупицын</i>	
Взаимосвязь иммунофенотипических особенностей бластных клеток с достижением ремиссии при остром миелоидном лейкозе у детей.	45
<i>А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, Э.К. Шоуа, Г.З. Чкадуа, А.И. Черткова, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова, Е.В. Огородникова, З.Г. Кадагидзе</i>	
Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови доноров	54
<i>А.А. Вартанян, Д.А. Хоченков, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков</i>	
О взаимосвязи аутофагии и апоптоза в гибели клеток карциномы легкого A549, индуцированной CD437	65
<i>Л.А. Островская, Д.Б. Корман, Н.В. Блюхтерова, М.М. Фомина, В.А. Рыкова, А.К. Чигасова, Е.И. Некрасова, К.А. Абзаева, О.О. Рябая, Ж.П. Бурмий</i>	
Полиакрилат золота: экспериментальное изучение противоопухолевой активности	74
<i>И.С. Голубева, Н.П. Яворская, Л.В. Эктова, М.В. Дмитриева, Л.М. Борисова, В.А. Еремина, Н.И. Тихонова, Р.Б. Пугачева</i>	
Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индола[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой	86
ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ	94

REVIEWS

<i>S.V. Chulkova, D.A. Ryabchikov, I.A. Dudina, I.V. Savchenko, A.V. Egorova, I.A. Gladilina, N.N. Tupitsyn</i>	
The role and mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in the progression of melanoma	8
<i>E.A. Bykova, N.A. Falaleeva, L. Yu. Gritsova</i>	
Pancreatic cancer, current therapeutic approaches and possible prospects	18
<i>M.N. Khagazheeva, A.V. Snegovoy, V.N. Blindar, D.A. Ryabchikov, M.M. Dobrovolskaya, I.B. Kononenko, A.M. Kelemetov, A.M. Kazakov, O.V. Palchinskaya</i>	
The role of hepcidin 25 in the development of anemic syndrome associated with malignant diseases	29
<i>O.A. Bocharova, R.V. Karpova, E.V. Bocharov, A.A. Vershinskaya, M.A. Baryshnikova, I.V. Kazeev, V.G. Kucheryanu, M.V. Kiselevsky, V.B. Matveev</i>	
Research of new phytoadaptogens and possibilities of herbal formulas application	35

ORIGINAL REPORTS

<i>A.D. Palladina, A.V. Popa, V.G. Nikitaev, K.L. Kondratchik, N.A. Kupryshina, I.N. Serebryakova, T.V. Shvedova, O.A. Chernysheva, M.A. Shervashidze, N.N. Tupitsyn</i>	
Relationship of blast cell immunophenotype with remission in acute myeloid leukemia in children	45
<i>A.A. Borunova, T.N. Zabolina, E.K. Shoua, G.Z. Chkadua, A.I. Chertkova, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova, E.V. Ogorodnikova, Z.G. Kadagidze</i>	
Subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes of donors	54
<i>A.A. Vartanian, D.A. Khochentkov, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov</i>	
Crosstalk between autophagy and apoptosis in CD437-induced A549 lung carcinoma cell death	65
<i>L.A. Ostrovskaya, D.B. Korman, N.V. Bluhterova, M.M. Fomina, V.A. Rikova, A.K. Chigasova, E.I. Nekrasova, K.A. Abzaeva, O.O. Riabaya, J.P. Burmiy</i>	
Aurum polyacrylate: the experimental study of the antitumor activity	74
<i>I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, L.V. Ektova, M.V. Dmitrieva, L.M. Borisova, V.A. Eremina, N.I. Tikhonova, R.B. Pugacheva</i>	
Antitumor activity of some derivatives of indolo[2,3-a]carbazoles N-glycosides with xylose carbohydrate residue	86
INFORMATION FOR AUTHORS	94

РОЛЬ И МЕХАНИЗМЫ ЭПИТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО ПЕРЕХОДА В ПРОГРЕССИРОВАНИИ МЕЛАНОМЫ

С.В. Чулкова^{1, 2}, Д.А. Рябчиков¹, И.А. Дудина³, И.В. Савченко², А.В. Егорова²,
И.А. Гладилина^{1, 2}, Н.Н. Тупицын¹

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

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

³ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр ФМБА России»; Россия, 115682 Москва, Ореховый бульвар, 28

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Несмотря на достигнутые успехи современной медицины в диагностике и лечении онкологических заболеваний, меланома кожи остается одной из ведущих причин смертности во всем мире: каждый 3-й случай меланомы заканчивается летальным исходом. Как известно, одной из основных причин летального исхода является высокая частота прогрессирования меланомы. Важно отметить, что механизмы прогрессирования меланомы разнообразны, и бурно развивающаяся область лекарственной терапии опухолей требует глубокого понимания их особенностей. Это прежде всего связано с тем, что данные процессы обуславливают формирование особых, минорных, опухолевых клонов, обладающих стволовыми свойствами. Они характеризуются повышенной резистентностью к терапии. Последнее служит основным препятствием к эффективному лечению больных меланомой. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) играет ведущую роль в приобретении метастатического потенциала клетками меланомы. Важным отличительным признаком ЭМП является изменение уровня экспрессии трансмембранных гликопротеинов, участвующих в клеточной адгезии. При ЭМП наблюдается как снижение уровня E-кадгерина, так и повышение экспрессии N-кадгерина. Такое переключение в различных классах молекул адгезии приводит к тому, что клетки меланомы теряют контакт с соседними кератиноцитами и начинают взаимодействовать с фибробластами и эндотелиальными клетками. Ключевым регулятором в индукции ЭМП при меланоме является сигнальный путь Notch1, который при активации ускоряет экспрессию N-кадгерина. Кроме того, ЭМП регулирует множество других путей — RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/β-катенин, нарушение регуляции которых сопряжено с развитием лекарственной устойчивости меланомы. В статье проведен анализ современных данных литературы о значимости ЭМП в канцерогенезе и прогнозе меланомы. Детально описаны механизмы ЭМП в современном понимании, известные на сегодняшний день прогностические факторы, а также потенциальные терапевтические мишени, влияющие на ЭМП и, соответственно, сдерживающие процесс метастазирования.

Ключевые слова: эпителиально-мезенхимальный переход, E-кадгерин, меланома, опухолевые стволовые клетки, сигнальные пути

Для цитирования: Чулкова С.В., Рябчиков Д.А., Дудина И.А. и др. Роль и механизмы эпителиально-мезенхимального перехода в прогрессировании меланомы. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):8–17.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-8-17



THE ROLE AND MECHANISMS OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION IN THE PROGRESSION OF MELANOMA

S.V. Chulkova^{1, 2}, D.A. Ryabchikov¹, I.A. Dudina³, I.V. Savchenko², A.V. Egorova², I.A. Gladilina^{1, 2}, N.N. Tupitsyn¹

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;

³Federal scientific clinical center of Federal Biomedical Agency of Russia; 28 Orekhov Boulevard, Moscow 115682, Russia

Despite the achievements of modern medicine in the diagnosis and treatment of oncological diseases, skin melanoma remains one of the leading causes of death worldwide: every third case of melanoma ends in death. As you know, one of the main causes of death is the high incidence of melanoma progression. It is important to note that the mechanisms of melanoma progression are diverse and the rapidly developing area of drug therapy for tumors requires a deep understanding of their characteristics. This is primarily due to the fact that these processes lead to the formation of special, minor tumor clones with stem properties. They are highly resistant to therapy. The latter is the main

obstacle to effective treatment of melanoma patients. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) plays a leading role in the acquisition of metastatic potential by melanoma cells. An important distinguishing feature of EMT is a change in the level of expression of transmembrane glycoproteins involved in cell adhesion. With EMT, both a decrease in the level of E-cadherin and an increase in the expression of N-cadherin are observed. Such a switch in different classes of adhesion molecules leads to the fact that melanoma cells lose contact with neighboring keratinocytes and begin to interact with fibroblasts and endothelial cells. The key regulator in EMT induction in melanoma is the Notch1 signaling pathway, which accelerates N-cadherin expression when activated. In addition, EMT also regulates many other pathways – RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -catenin, the dysregulation of which is associated with the development of drug resistance in melanoma. The analysis was carried out in the article of modern literature data on the importance of EMT in carcinogenesis and prognosis of melanoma. The modern mechanisms of EMT, currently known prognostic factors, as well as potential therapeutic targets that affect EMT and, accordingly, inhibit the process of metastasis, are described in detail.

Keywords: epithelial-mesenchymal transition, E-cadherin, melanoma, tumor stem cells, signaling pathway

For citation: Chulkova S.V., Ryabchikov D.A., Dudina I.A. et al. The role and mechanisms of epithelial-mesenchymal transition in the progression of melanoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4):8–17. (In Russ.).

Введение

Меланома — злокачественная опухоль нейроэктодермального происхождения, развивающаяся из меланоцитов, расположенных преимущественно в коже, но также встречающихся в слизистых оболочках, конъюнктиве, оболочках головного и спинного мозга. Из всех злокачественных новообразований кожи меланома является наиболее агрессивной опухолью, которая характеризуется высоким риском метастазирования даже на ранних стадиях опухолевого процесса и низкими показателями выживаемости больных. Меланома занимает 5-е место в структуре онкологической заболеваемости населения США [1]. В Российской Федерации среди всех злокачественных новообразований меланома находится на 14-м и 15-м месте по распространенности у женщин и мужчин соответственно [2]. Пятилетняя общая выживаемость больных меланомой зависит от многих факторов: первичной локализации опухоли, степени ее инвазии и митотического потенциала, возраста пациента, наличия драйверных мутаций, статуса лимфатических узлов и некоторых других показателей [3].

В последнее десятилетие произошла революция в понимании патогенеза меланомы. Выявление онкогенных мутаций, изучение молекулярной передачи сигналов, возникающих в результате этих мутаций, понимание иммунологии опухоли позволили изменить стратегии лечения. Новые молекулярно-направленные и иммуноориентированные агенты вошли в клиническую практику, что позволило улучшить показатели общей и безрецидивной выживаемости больных меланомой. Однако, несмотря на достигнутые результаты, многие механизмы прогрессирования меланомы все еще остаются невыясненными. К таким механизмам относятся эпителиально-мезенхимальный (ЭМП) и мезенхимально-эпителиальный переход (МЭП).

Эпителиально-мезенхимальный переход в общем понимании — сложный эволюционно обусловленный процесс, посредством которого эпителиальные клет-

ки теряют полярность и способность к межклеточной адгезии, приобретают дополнительные свойства — подвижность и инвазивный потенциал, изменяя свой фенотип на мезенхимальный.

Эпителиально-мезенхимальный переход происходит во время нормального эмбрионального развития, обеспечивая миграцию клеток для формирования специализированных тканей, а также при регенерации тканей, фиброзе. Он также характерен для опухолевой трансформации клеток, при которой могут формироваться отдельные клоны опухолевых стволовых клеток (ОСК), играющие ключевую роль в развитии резистентности опухоли к традиционному лечению [4–6]. Иными словами, ЭМП способствует прогрессированию и метастазированию опухолей посредством приобретения клетками преимуществ в эффективной инвазии и распространении в отдаленные органы.

Механизмы и этапы

эпителиально-мезенхимального перехода

Известно, что основным моментом в ЭМП считается снижение экспрессии клетками основного белка клеточных контактов Е-кадгерина. В норме он закрепляется в мембране посредством функционального белка β -катенина, соединяющего его с белками цитоскелета, что обеспечивает стабильные контакты между эпителиоцитами. При возникновении эпигенетических или генетических изменений онкогенов или супрессорных генов происходит подавление экспрессии Е-кадгерина, приводящее к переходу в цитоплазму и ядро β -катенина и ослаблению адгезионных межклеточных контактов. Наряду с этим усиление экспрессии некоторых генов ведет к синтезу мезенхимальных белков (виментина, фибронектина, гладко-мышечного актина), металлопротеиназы, участвующей в деградации внеклеточного матрикса и базальной мембраны, а изменение аффинности и соотношения интегриновых субъединиц сообщает клетке новую субстратную специфичность. Кроме того, изменяющееся соотношение интегринов

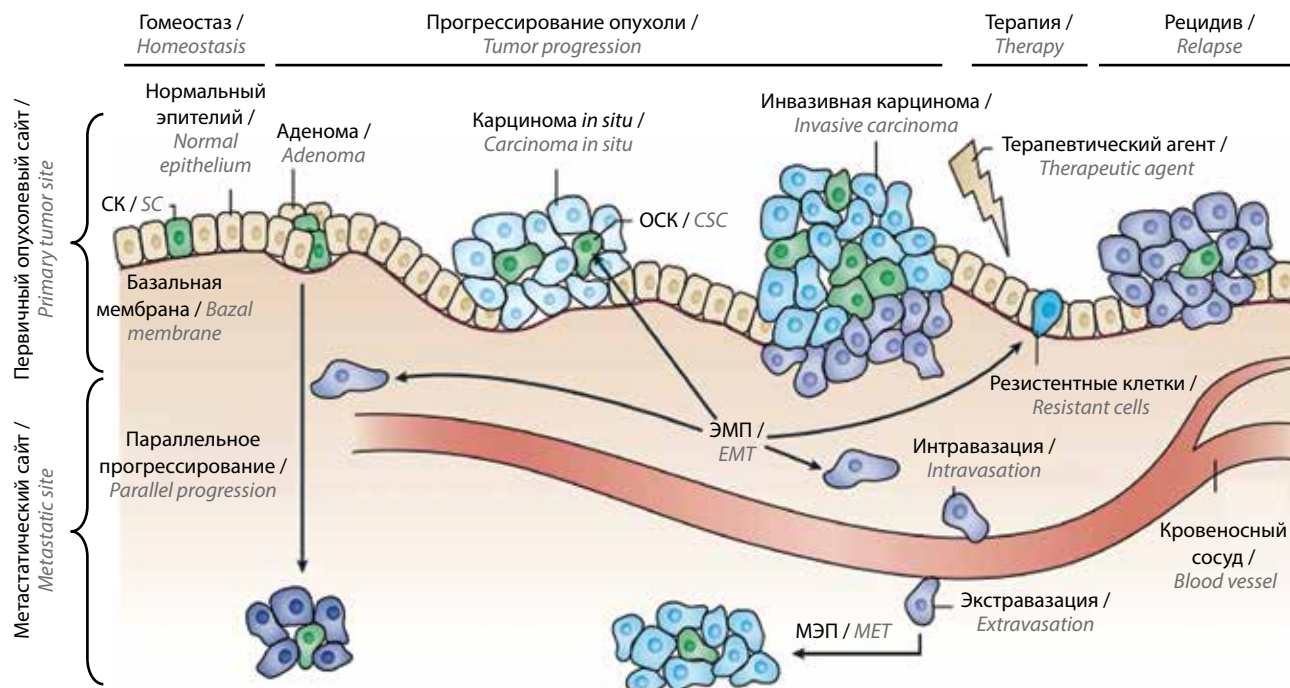


Рис. 1. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) при злокачественных новообразованиях; СК – стволовая клетка; ОСК – опухолевая стволовая клетка; МЭП – мезенхимально-эпителиальный переход (адаптировано из [8])

Fig. 1. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in malignant neoplasms; SC – stem cell; CSC – cancer stem cell; MET – mesenchymal-epithelial transition (adapted from [8])

оказывает влияние на активность протеолитических ферментов, реорганизацию цитоскелета и выживаемость опухолевой клетки. В совокупности все процессы ЭМП обеспечивают приобретение клетками дополнительной подвижности ввиду ослабления адгезии, инвазивных свойств, а также антиапоптотических и стволовоподобных фенотипов [4].

Следует отметить, что ЭМП не является полным в опухолевых клетках. Клетки находятся в переходном состоянии, одновременно экспрессируя продукты эпителиальных и мезенхимальных генов. Такие гибридные клетки при частичном ЭМП могут двигаться коллективно, в виде кластеров из многих клеток, причем они могут отличаться более агрессивными свойствами, чем клетки с полным ЭМП [7]. Самое интересное, что ЭМП является обратимым процессом: при достижении циркулирующей опухолевой клеткой подходящей метастатической ниши она перестает получать сигналы от первичной опухоли, и происходит обратный МЭП, обеспечивающий развитие вторичных очагов. Роль ЭМП при злокачественных опухолевых процессах представлена на рис. 1.

В целом реализация программ ЭМП, включающая нарушение межклеточной адгезии, изменение клеточной полярности, ремоделирование цитоскелета, изменение адгезии клеточного матрикса, приводя к улучшению миграционных и инвазивных свойств опухолевой клетки, вносит значительный вклад в прогрессирование опухолей.

Эпителиально-мезенхимальный переход и прогрессирование опухолей

Хорошо известно, что опухолевое микроокружение посредством различных цитокинов, факторов роста, молекул внеклеточного матрикса оказывает влияние на экспрессию генов, инициирующих программы ЭМП. Переключение экспрессии генов с эпителиального фенотипа на мезенхимальный происходит в результате активации сигнальных путей и различных механизмов, включающих ремоделирование хроматина, эпигенетические модификации, альтернативный сплайсинг, посттрансляционную регуляцию, а также изменений экспрессии микроРНК и транскрипционных факторов [8]. На сегодняшний день известно несколько факторов транскрипции, которые могут изменять эпителиальный статус клетки, а также потенциально способствовать приобретению дедифференцированными опухолевыми клетками стволовых свойств: SNAIL1 и SNAIL2, ZEB1 и ZEB2, Twist, E12/E47. Так, повышение экспрессии SNAIL1 напрямую ведет к подавлению транскрипции E-кадгерина, что сопровождается изменением адгезивных свойств, повышением способности опухолевых клеток к инвазии, развитием устойчивости к лекарственному воздействию [9, 10].

Интересно отметить, что ЭМП может быть достигнут только тогда, когда активированы все необходимые сигнальные пути и процесс полностью параллелен. Приобретение опухолевой клеткой необходимых

генетических aberrаций и получение соответствующих сигналов на границе «опухоль — ткань хозяина» потенцирует ее к метастазированию. На этом этапе программа ЭМП обеспечивает сигналы выживания и поддержания мезенхимального фенотипа метастазирующей клетки. Вполне вероятно, что ЭМП также играет роль в параллельной прогрессии опухолей, при которой опухолевые клетки еще на ранних этапах развития способны преодолевать базальную мембрану [11]. Важно, что приобретение мезенхимального фенотипа опухолевыми клетками помогает им развивать дополнительную резистентность к проводимой терапии, что приводит к рецидивам, ухудшая прогноз заболевания.

Степень ЭМП на разных этапах прогрессирования зависит от индуктора, что определяет возникающий дисбаланс нескольких регуляторных сетей, связанных с активированными онкогенными путями [12]. Известными индукторами ЭМП являются гипоксия, различные цитокины и факторы роста, секретируемые микроокружением, опухолево-стромальные сигналы, метаболические изменения, врожденные и адаптивные иммунные реакции, а так-

же непосредственное воздействие противоопухолевых лекарственных препаратов [13].

Считается, что изучение роли ЭМП в метастазировании, механизмов контроля ЭМП и возможной его реверсии может существенно помочь в разработке стратегий противоопухолевой терапии [14]. Исследования альтернативных способов распространения опухоли, колонизации через независимый от МЭП путь и циркулирующих опухолевых клеток в крови позволят получить более детальные представления о роли ЭМП и МЭП в метастазировании опухолей.

Молекулы и сигнальные пути эпителиально-мезенхимального перехода

Белки, участвующие в контроле транскрипции, — неотъемлемая часть регуляции ЭМП. Несколько ЭМП-индуцирующих транскрипционных факторов, таких как SNAIL1, ZEB и TWIST1, играют центральную роль в подавлении экспрессии эпителиальных белков (рис. 2). Действие этих транскрипционных факторов усиливается благодаря тесному взаимодействию с эпигенетическим механизмом (EZH2, BMI1), который обеспечивает устойчивую регрессию

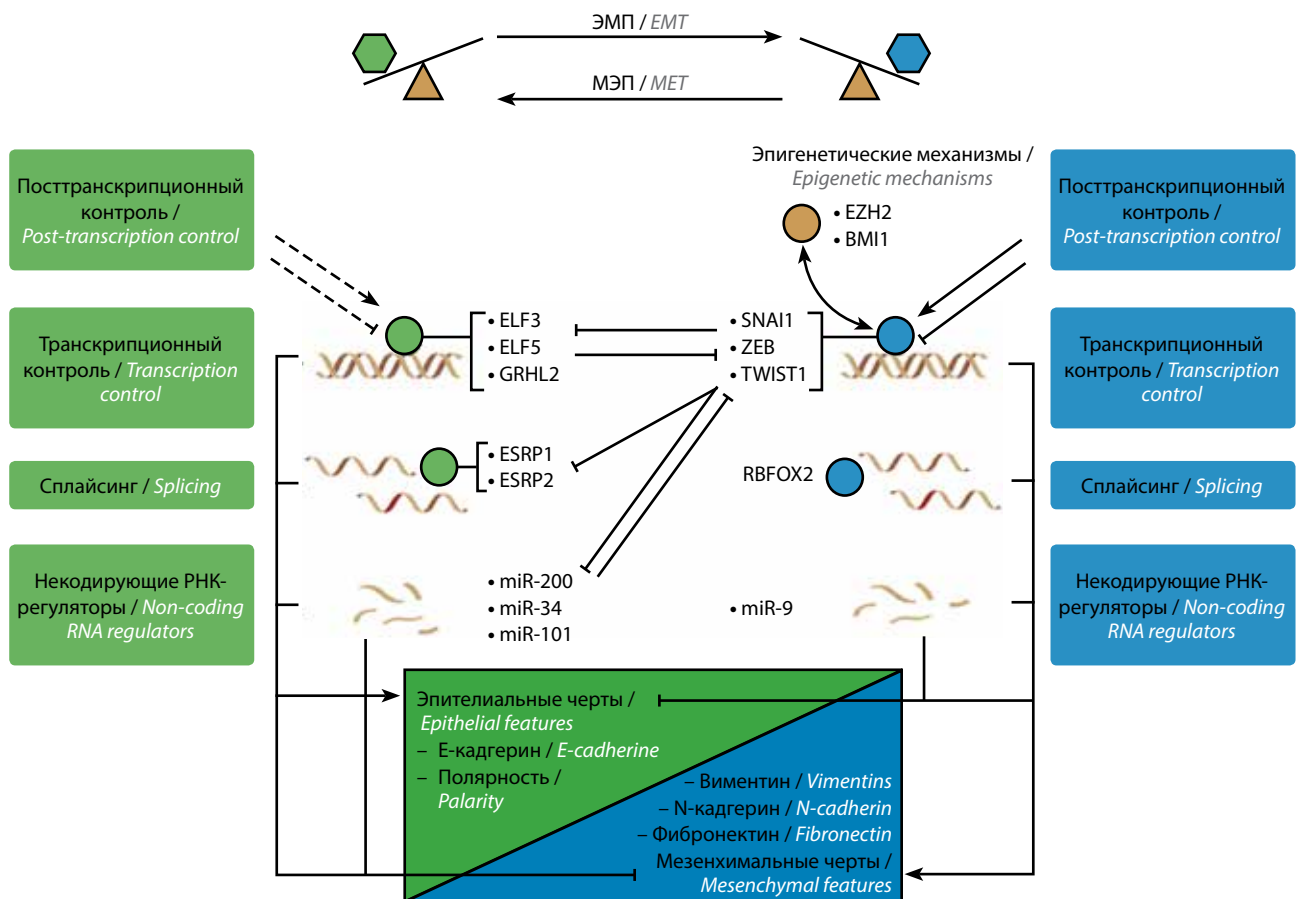


Рис. 2. Группы молекул эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) (адаптировано из [8])

Fig. 2. Groups of epithelial-mesenchymal transition (EMT) molecules (adapted from [8])

эпителиальных признаков. Хотя эпителиально-специфические факторы транскрипции мало изучены в контексте ЭМП, известно, что они определяют дифференцировку эпителиальной клетки.

Отмечено, что при эпителиальном статусе клетки преобладают несколько некодирующих РНК, определяющих другие пути, контролирующие ЭМП. Плотная петля отрицательной обратной связи образована miR-200 и miR-34 с несколькими факторами транскрипции ЭМП. Эпителиальный фенотип также поддерживается miR-101, которая способствует экспрессии E-кадгерина. Некодирующие РНК при мезенхимальном фенотипе, по-видимому, просто поддерживают его. Сплайсинг как при эпителиальном, так и при мезенхимальном фенотипе характеризуется определенными сплайсинговыми факторами (на рис. 2 – ESRP1, ESRP2, RBFOX2), которые определяют его специфические варианты. Белки, участвующие в различных регуляторных сетях, дополнительно контролируются как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне, обеспечивая либо дополнительную поддержку, либо дестабилизируя их функцию. В настоящее время доказательства этого регуляторного уровня доступны для факторов транскрипции ЭМП (на рис. 2 отмечено сплошными стрелками) и менее ясны для транскрипционных факторов (ELF3, ELF5, GRHL2), которые поддерживают эпителиальный фенотип (на рис. 2 – пунктирные стрелки). ЭМП инициируется, когда баланс в этих регуляторных сетях нарушается (например, внеклеточными сигналами или неправильной регуляцией белка). Вместе с тем степень ЭМП и, соответственно, приобретение мезенхимальных или эпителиальных черт опухолевой клеткой дополнительно определяются тем, условно говоря, насколько наклонены весы в том или ином направлении.

Ключевым регулятором в индукции ЭМП при меланоме является сигнальный путь Notch, который при активации ускоряет экспрессию N-кадгерина, что сообщает клеткам инвазивную способность. Белок Notch является транспортным рецептором, осуществляющим передачу регуляторных воздействий при непосредственном контакте с клетками. При его участии осуществляется регуляция клеточной пролиферации, апоптоза, процессов метастазирования. Аберрантная активация сигнального пути Notch задействована в процессах формирования метастатических ниш, в поддержании выживания клеток-предшественников меланоцитов, меланобластов и стволовых клеток (СК) меланоцитов. Гиперэкспрессия рецепторов Notch и их лигандов (Jagged-1, Jagged-2 и Delta) коррелирует с ростом и прогрессированием меланомы [15].

Кроме того, ЭМП регулируется множеством других путей – RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ β -катенин. Дисрегуляция сигнальных путей

Notch, Hedgehog, Wnt является причиной развития устойчивости меланомы к традиционным видам терапии, поскольку сигнальными молекулами Notch, Wnt обеспечивается баланс между самообновлением и дифференцировкой, покоем и пролиферацией ОСК, которые отличаются лекарственной резистентностью [16]. В связи с этим некоторые сигнальные пути рассматриваются как потенциальные терапевтические мишени. G. Kaushik и соавт. показали, что ингибирование передачи сигналов Notch-2 в клетках меланомы, обработанных Honokiol, приводит к ослаблению свойств ОСК меланомы [17].

Роль кадгеринов при меланоме

Кадгерины – кальций-зависимые молекулы, представляющие собой трансмембранные гликопротеины, участвующие в клеточной адгезии. В коже кадгерины обеспечивают плотные контакты между меланоцитами и/или кератиноцитами. Исследования *in vitro* показали, что снижение регуляции мембранной экспрессии эпителиального E-кадгерина и увеличение экспрессии нейронного N-кадгерина – параллельные процессы, обеспечивающие миграцию опухолевых клеток меланомы из первичного очага [18–21]. Одним из важных ранних этапов развития меланомы является нарушение опосредованного E-кадгерином адгезивного взаимодействия между меланоцитами и кератиноцитами, сопровождающееся повышенной экспрессией N-кадгерина, что способствует пролиферации и инвазивному поведению клеток меланомы. Экспрессия N- и E-кадгеринов частично регулируется геном ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (CYLD) и белком цинкового пальца, кодируемым геном транскрипционного супрессора 1 семейства SNAIL (SNAI1) [22].

Исследования, включающие анализ опухолевой ткани из первичных очагов меланомы и ее метастазов, подтверждают роль нисходящей регуляции E-кадгерина в метастатическом потенциале [9, 23–25]. В этих работах провели сравнение экспрессии кадгерина в первичных и метастатических очагах меланомы, а также при доброкачественных поражениях и при меланоме [9, 10, 25, 26]. Основная концепция данных исследований заключается в том, что пониженная регуляция E-кадгерина является одним из аспектов сложного процесса, который позволяет опухолевой клетке «вырваться» из первичного места локализации в эпидермисе кожи. Например, G.M. Kreizenbeck и соавт. сообщили о статистически значимом снижении регуляции E-кадгерина при сравнении первичной опухоли с метастатическим очагом, а также установили корреляцию между улучшением выживаемости больных меланомой и повышением экспрессии E-кадгерина. Кроме того, авторы выявили, что некоторые первичные очаги меланомы с повышенным

уровнем N-кадгерина были более склонны к метастазированию в сравнении с другими очагами, которые имели более дифференцированный фенотип [10]. Интересные данные получены в работе R. Massoumi и соавт., которые обнаружили, что экспрессия *SNAIL* коррелирует с потерей экспрессии *CYLD* и активацией промотора N-кадгерина, а также связана с инвазивным поведением клеток и степенью инвазии меланомы [27]. В другом исследовании сообщается, что потеря E-кадгерина ассоциирована с мутацией протоонкогена *BRAF* и толщиной опухоли по Бреслоу более 1 мм, что было установлено при изучении образцов первичной опухоли у 68 больных меланомой [28]. В отношении *BRAF* интересные данные получены Q. Guo и соавт., которые показали, что *BRAF* активирует длительное некодирование РНК (*BANCR*), что индуцирует процессы ЭМП и способствует миграции опухолевых клеток [29].

Результаты изучения прогностической значимости E- и N-кадгерина при меланоме противоречивы. M.G. Tucci и соавт. показали, что низкий уровень E-кадгерина при меланоме является фактором неблагоприятного прогноза [30]. В другом исследовании I.M. Bachmann и соавт. сообщают, что экспрессия E- и N-кадгерина не имеет статистической значимости для прогнозирования выживаемости. При этом авторами обнаружено снижение экспрессии E-кадгерина и увеличение экспрессии N-кадгерина от первичной меланомы до метастатической меланомы [31]. G.M. Kreizenbeck и соавт. показали, что повышенная экспрессия N-кадгерина улучшала общую выживаемость, но значимость этого вывода была опровергнута при корректировке по клинико-патологическим параметрам [10].

В исследовании Sh. Yan и соавт. установлено, что более чем у половины больных меланомой наблюдалась картина E-кадгерин-положительной/N-кадгерин-отрицательной экспрессии в исследуемых образцах опухоли (64,3 % при первичной и 54,8 % при метастатической меланоме соответственно), в то время как около 1/3 пациентов имели положительную экспрессию обоих белков (31 % при первичной меланоме и 31 % при метастатической) [32]. Только в 4,8 % образцов первичной опухоли и 9,5 % образцов метастатических меланом обнаружен паттерн E-кадгерин-отрицательной/N-кадгерин-положительной экспрессии. В целом положительная экспрессия N-кадгерина наблюдалась в 35,7 % случаев при первичной меланоме и в 40,5 % — при метастатической, что свидетельствует о том, что обратная связь экспрессии N-кадгерина и E-кадгерина не является абсолютной.

Аналогичные гетерогенные паттерны экспрессии E-кадгерина и N-кадгерина были описаны L.M. Mikesch и соавт., которые проанализировали 695 образцов [21],

большинство из которых были получены из метастатических очагов меланомы. В своем исследовании авторы установили, что 36 % образцов опухоли были E-кадгерин-положительными/N-кадгерин-отрицательными, 23 % случаев — обратными. Кроме того, выявлено, что некоторые образцы характеризовались экспрессией обоих белков (17 %), а также полным отсутствием экспрессии (11 %). Некоторые опухоли не экспрессировали E-кадгерин или N-кадгерин, что, по мнению авторов, отражает более сложный контроль ЭМП. Также была оценена экспрессия кадгерина в 12 клеточных линиях меланомы. В то время как большинство клеточных линий экспрессировали N-кадгерин (58 %), только 25 % клеточных линий были E-кадгерин-положительными. Полученные результаты показывают, что в образцах опухоли больных меланомой более гетерогенные паттерны экспрессии, чем в клеточных линиях, что указывает на более сложный контроль ЭМП в интактном микроокружении опухоли.

Интересно, что меланомы *in situ* могут экспрессировать другие кадгерины, такие как дизаггерин или сосудистый эндотелиальный кадгерин, которые ассоциированы с агрессивным поведением опухоли и плохим прогнозом [33]. Авторы полагают, что, возможно, эти или другие кадгерины регулируются механизмами, выходящими за пределы сетей ЭМП. Поэтому требуются дальнейшие исследования микроокружения опухоли, продукции им цитокинов и их влияния на ЭМП.

CD133, факторы транскрипции

Совокупные мировые данные свидетельствуют, что метастазирование и рецидивирование меланомы тесно связаны с биологией CD133⁺ ОСК [34]. Известно, что CD133⁺-клетки проявляют ЭМП-фенотип и сохраняют свойства СК [35, 36]. Наряду с этим преобладание процессов ЭМП способствует генерации опухолевых клеток со стволовыми свойствами. При этом экспрессия CD133 посредством вовлечения ERK-путей облегчает процессы ЭМП. Вместе с тем такой медиатор ЭМП, как белок S100A4 — индуктор инвазивности опухолевых клеток, поддерживает способность ОСК к самообновлению, пластичности и сохранению стволовых свойств [37]. Так, S.A. Mani и соавт. показали, что ЭМП способствует развитию фенотипа ОСК: чрезмерная экспрессия транскрипционных факторов TWIST и SNAIL усиливает ЭМП в эпителиоцитах молочной железы человека, что проявляется экспрессией клетками CD44^{high}/CD24^{low} и более выраженной способностью образовывать маммосферы [38, 39].

Известно, что сигнальные пути Notch, Hedgehog, Wnt обеспечивают баланс между самообновлением и дифференцировкой, покоем и пролиферацией ОСК

при меланоме. Интересные данные получены D. Kumar и соавт., которые в своем исследовании показали, что рост и ангиогенез меланомы потенцируются популяцией ОСК (CD133⁺), что регулируется через сигнальный путь Notch1 – MAPK. Подавление экспрессии CD133 вело к уменьшению экспрессии гена *SNAIL* [40]. Последнее, учитывая, что данные транскрипционные факторы *SNAIL* играют ключевую роль в подавлении экспрессии эпителиальных белков, является важным событием. J. Yao и соавт. в экспериментальной работе выявили, что регуляторный белок сплайсинга эпителия 1 (ESRP1) был ассоциирован с ЭМП при меланоме, так же как и *SLUG* (*SNAIL2*), *SNAIL1* и *ZEB*. Авторы установили, что экспрессия эпителиальных маркеров была выше в опухолях с высоким уровнем ESRP1. Напротив, в опухолях с низким уровнем ESRP1 отмечалась более высокая экспрессия мезенхимальных маркеров [41].

Недавние исследования показали, что индукторы ЭМП могут обладать антагонистическим влиянием в отношении прогрессирования меланомы. Повышенная экспрессия *SNAIL2* и *ZEB2* меланоцитами потенцирует онкосупрессорный эффект, тогда как активация *TWIST1* и *ZEB1* способствует неопластической трансформации меланоцитов [42]. *ZEB1* совместно с miR-200с играют ключевую роль в регуляции процессов ЭМП при меланоме. Экспрессия этого транскрипционного фактора регулируется *SLUG* (*SNAIL2*) через связывание с Е-боксами промотора [43]. Отмечено, что экспрессия *ZEB1* очень тесно связана с поддержанием стволовых свойств в клеточной линии меланомы B16F10 [44]. Нокдаун гена *ZEB1* приводил к ингибированию опухолевой активности линии B16F10: отмечалось снижение способности *ZEB1*-CD133⁺CD44⁺-клеток к пролиферации, миграции, инвазии, а также снижение их лекарственной устойчивости. Кроме того, авторами проведен эксперимент на мышах, которым перевивали линию *ZEB1*-CD133⁺CD44⁺-клеток меланомы. Отмечено подавление в опухолевой ткани экспрессии N-кадгерина и виментина, повышение экспрессии Е-кадгерина, что свидетельствовало о реверсии процессов ЭМП. Эти данные демонстрируют, что транскрипционный фактор *ZEB1* поддерживает фенотип ОСК и ЭМП в клетках меланомы [37]. Другими авторами также отмечено, что подавление экспрессии *ZEB1*, а также *TWIST1*, *SNAIL* ослабляет инвазивные свойства клеток меланомы [45]. *ZEB1* на сегодняшний день рассматривается как потенциальная терапевтическая мишень.

Высокая экспрессия фактора транскрипции *GLI2* в клетках меланомы связана с повышенным инвазивным потенциалом и потерей экспрессии Е-кадгерина [46]. Транскрипционный фактор *GLI2* рассматривается как эффектор сигнального пути Hedgehog [47].

Группа C.Y. Perrot и соавт. получили данные, показывающие, что *GLI2* посредством усиления транскрипции *ZEB1*, известного индуктора ЭМП, является значимым модулятором переключения процессов ЭМП и МЭП при меланоме. Подавление фактора *GLI2* приводило к восстановлению экспрессии Е-кадгерина в клеточной линии меланомы, за исключением тех линий, в которых он был гиперметилирован [46].

Транскрипционный фактор, связанный с микрофтальмом (Transcription factor associated with microphthalmos, *MITF*), также определяет судьбу меланоцитов. Через регуляцию транскрипционной сети *MITF* – *ZEB1* посредством *ZEB2* происходит правильная дифференцировка меланоцитов. В случае нокдауна *ZEB2* отмечается нарушение регулирующего влияния *MITF*, а параллельное повышение экспрессии *ZEB1*, молекул виментина и фибронектина приводит к прогрессированию меланомы [48].

Инсулиноподобный фактор роста, связывающий белок 5 (*IGFBP5*), оказывает супрессорное действие на процессы прогрессирования меланомы человека. В эксперименте установлено, что выраженная экспрессия *IGFBP5* приводит к подавлению процессов ЭМП и ослаблению экспрессии ключевых маркеров СК, таких как *NANOG*, *SOX2*, *OCT4*, *KLF4* и *CD133*. Нокдаун *IGFBP5* приводит к подавлению эпителиального и индуцированию мезенхималоподобного фенотипа, способствует миграции, инвазии и приобретению клетками свойств, характерных для ОСК. Поскольку фактор *IGFBP5* подавляет опухолевый рост и метастазирование меланомы, что происходит посредством ингибирования сигнальных путей *ERK1/2* и *P38*-MAPK, он может рассматриваться как терапевтическая мишень при меланоме. Белок семейства GTPase *IRGMI* индуцирует миграцию клеток меланомы линии B16, инвазию и ЭМП через полимеризацию F-актина [49].

Исследование факторов EphA2 или RacN17 позволило выявить, что в результате их гиперэкспрессии происходит индуцирование ЭМП, сопровождающееся усилением способности клеток меланомы к пролиферации, приобретением ими стволовых свойств, увеличением инвазивности опухоли [50]. TGF- β также действует как ключевой фактор в приобретении клетками мезенхимального фенотипа, приводящем к миграции клеток и их диссеминации, что продемонстрировано при нескольких видах злокачественных опухолей, включая меланому [39, 51, 52].

Известно, что некоторые солидные опухоли, включая меланому, характеризуются внеклеточным ацидозом. Интересные данные получены S. Peppicelli и соавт., которые в своей экспериментальной работе показали, что экспонирование клеток меланомы в кислой внеклеточной среде (pH = 6,7) приводит к повышению экспрессии мезенхимальных маркеров,

таких как N-кадгерин, виментин, в то время как экспрессия эпителиального специфического маркера, такого как E-кадгерин, снижается. Кроме того, авторы отметили, что кислая среда усиливала инвазивные свойства клеток меланомы и колонизацию опухолевыми клетками отдаленных органов, что происходило за счет усиления активности металлопротеиназ MMP-9 [53].

Заключение

Несмотря на новейшие разработки и использование современных лекарственных средств, результаты лечения меланомы далеки от удовлетворительных. Гетерогенность опухоли и непредсказуемость ее клинического поведения приводят к неэффективности традиционной терапии, что отражается на выживаемости больных. В статье отражена сложность процессов ЭМП при меланоме, описаны молекулы, сигнальные пути и транскрипционные факторы ЭМП и МЭП, которые играют решающую роль в канцерогенезе. Основным проявлением ЭМП является на-

рушение межклеточной адгезии и клеточной полярности.

Ключевую роль в индукции ЭМП при меланоме играет сигнальный путь Notch. Дисрегуляция сигнальных путей служит причиной развития лекарственной устойчивости меланомы, поскольку они обеспечивают баланс между самообновлением и дифференцировкой, покоем и пролиферацией ОСК.

Некоторые транскрипционные факторы детально изучены, и доказана их роль в прогрессировании меланомы. Факторы ZEB1, IGFBP5 рассматриваются в качестве перспективных терапевтических мишеней.

Гетерогенность экспрессируемых молекул, определяющих мезенхимальный или эпителиальный фенотип опухолевой клетки, требует более детального изучения, поскольку данные на этот счет недостаточны и противоречивы. Необходимы дальнейшие исследования микроокружения опухоли, метаболических изменений, продукции растворимых факторов и их влияния на ЭМП.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer Statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69:7.
2. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2019. 250 с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Moscow: FGBU "MNI OI im. P.A. Gertsena" Ministry of Health of Russia, 2019. 250 p. (In Russ.)].
3. DeVita V.T., Rosenbergs S.A., Lawrence T.S. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 11th edition. Wolters Kluwer, 2018. 1346 p.
4. Nieto M.A., Huang R.Y.-J., Jackson R.A., Thiery J.P. EMT: 2016. *Cell* 2016;166:21–45. DOI: 10.1016/j.cell.2016.06.028.
5. Lambert A.W., Pattabiraman D.R., Weinberg R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* 2017;168:670–91. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
6. Moustakas A., de Herreros A.G. Epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Mol Oncol* 2017;11:715–7. DOI: 10.1002/1878-0261.12094.
7. Jolly M.K., Boareto M., Huang B. et al. Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol* 2015;5:155. DOI: 10.3389/fonc.2015.00155.
8. De Craene B., Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13:97–110. DOI: 10.1038/nrc3447.
9. Sanders D.S., Blessing K., Hassan G.A. et al. Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours. *Mol Pathol* 1999;52(3):151–7. DOI: 10.1136/mp.52.3.151.
10. Kreizenbeck G.M., Berger A.J., Subtil A. et al. Prognostic significance of cadherin-based adhesion molecules in cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(4):949–58. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-07-2729.
11. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Heide L.F. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2020;15(2):117–34. DOI: 10.1007/s10911-010-9178-9.
12. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15(3):178–96. DOI: 10.1038/nrm3758.
13. Sistigu A., Di Modugno F., Manic G., Nisticò P. Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2017;36:67–77. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2017.05.008.
14. Marcucci F., Stassi G., De Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:311–25. DOI: 10.1038/nrd.2015.13.
15. Moriyama M., Osawa M., Mak S.S. et al. Notch signaling via Hes1 transcription factor maintains survival of melanoblasts and melanocyte stem cells. *J Cell Biol* 2006;173:333–9. DOI: 10.1083/jcb.200509084.
16. Чулкова С.В., Маркина И.Г., Чернышева О.А. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в развитии лекарственной резистентности меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(2):6–14. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-6-14. [Chulkova S.V., Markina I.G., Chernysheva O.A. et al. The role of stem tumor cells in the development of drug resistance of melanoma. *Rossiyskiy*

- bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(2):6–14. (In Russ.).
17. Kaushik G., Venugopal A., Ramamoorthy P. et al. Honokiol inhibits melanoma stem cells by targeting notch signaling. *Mol Carcinog* 2015;54(12):1710–21. DOI: 10.1002/mc.22242.
 18. Hsu M.Y., Meier F.E., Nesbit M. et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 2000;156(5):1515–25. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)65023-7.
 19. Li G., Satyamoorthy K., Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res* 2001; 61(9):3819–25. PMID: 11325858.
 20. Kim J.E., Leung E., Baguley B.C., Finlay G.J. Heterogeneity of expression of epithelial-mesenchymal transition markers in melanocytes and melanoma cell lines. *Front Genet* 2013;4:97. DOI: 10.3389/fgene.2013.00097.
 21. Mikesh L.M., Kumar M., Erdag G. et al. Evaluation of molecular markers of mesenchymal phenotype in melanoma. *Melanoma Res* 2010;20(6):485–95. DOI: 10.1097/CMR.0b013e32833fab4.
 22. Barrallo-Gimeno A., Nieto M.A. The SNAIL genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 2005;132(14):3151–61. DOI: 10.1242/dev.01907.
 23. Sakamoto K., Imanishi Y., Tomita T. et al. Overexpression of SIP1 and down-regulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. *Ann Surg Oncol* 2012;19(2):612–9. DOI: 10.1245/s10434-011-2052-1.
 24. Hazan R.B., Phillips G.R., Qiao R.F. et al. Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *J Cell Biol* 2000;148(4):779–90. DOI: 10.1083/jcb.148.4.779.
 25. Sylve R., Karayiannakis A.J., Syrigos K.N. et al. E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions. *J Pathol* 1998;186(4): 350–5. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199812)186:4<350::AID-PATH181>3.0.CO;2-K.
 26. Valencak J., Kittler H., Schmid K. et al. Prognostic relevance of hypoxia inducible factor-1alpha expression in patients with melanoma. *Clin Exp Dermatol* 2009;34(8):e962–4. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2009.03706.x.
 27. Massoumi R., Kuphal S., Hellerbrand C. et al. Down-regulation of CYLD expression by SNAIL promotes tumor progression in malignant melanoma. *J Exp Med* 2009;206(1):221–32. DOI: 10.1084/jem.20082044.
 28. Mitchell B., Leone D.A., Feller J.K. et al. BRAF and epithelial-mesenchymal transition in primary cutaneous melanoma: a role for SNAIL and E-cadherin? *Hum Pathol* 2016;52:19–27. DOI: 10.1016/j.humpath.2015.12.030.
 29. Guo Q., Zhao Y., Chen J. et al. BRAF-activated long non-coding RNA contributes to colorectal cancer migration by inducing epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett* 2014;8(2):869–75. DOI: 10.3892/ol.2014.2154.
 30. Tucci M.G., Lucarini G., Brancorsini D. et al. Involvement of E-cadherin, beta-catenin, Cdc42 and CXCR4 in the progression and prognosis of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2007;157(6):1212–6. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2007.08246.x.
 31. Bachmann I.M., Straume O., Puntervoll H.E. et al. Importance of P-cadherin, beta-catenin, and Wnt5a/frizzled for progression of melanocytic tumors and prognosis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(24 Pt 1):8606–14. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0011.
 32. Yan Sh., Holderness B.M., Li Zh. et al. Epithelial-Mesenchymal Expression Phenotype of Primary Melanoma and Matched Metastases and Relationship with Overall Survival. *Anticancer Res* 2016;36(12):6449–56. DOI: 10.21873/anticancer.11243. PMID: 27919967.
 33. Nishizawa A., Nakanishi Y., Yoshimura K. et al. Clinicopathologic significance of dysadherin expression in cutaneous malignant melanoma: immunohistochemical analysis of 115 patients. *Cancer* 2005;103(8):1693–700. DOI: 10.1002/cncr.20984.
 34. Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгенорадиологии* 2018;18(4):100–6. [Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. Role of stem tumor cells in carcinogenesis and prognosis of melanoma. *Vestnik Rossiyskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii* = Bulletin of the Russian scientific center of roentgenology and radiology 2018;18(4):100–6. (In Russ.)].
 35. Ding Q., Miyazaki Y., Tsukasa K. et al. CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the ERK pathway in pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer* 2014; 13:15. DOI: 10.1186/1476-4598-13-15.
 36. Moon Y., Kim D., Sohn H., Lim W. Effect of CD133 overexpression on the epithelial-to-mesenchymal transition in oral cancer cell lines. *Clin Exp Metastasis* 2016;33(5):487–96. DOI: 10.1007/s10585-016-9793-y.
 37. Lo J.F., Yu C.C., Chiou S.H. et al. The epithelial-mesenchymal transition mediator S100A4 maintains cancer-initiating cells in head and neck cancers. *Cancer Res* 2011;71(5):1912–23. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2350.
 38. Morel A.P., Lièvre M., Thomas C. et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 2008;3(8):e2888. DOI: 10.1371/journal.pone.0002888.
 39. Mani S.A., Guo W., Liao M.J. et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 2008;133(4):704–15. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.027.
 40. Kumar D., Kumar S., Gorain M. et al. Notch1-MAPK signaling axis regulates CD133+ cancer stem cell-mediated melanoma growth and angiogenesis. *J Invest Dermatol* 2016;136(12):2462–74. DOI: 10.1016/j.jid.2016.07.024.
 41. Yao J., Caballero O.L., Huang Y. et al. Altered expression and splicing of ESRP1 in malignant melanoma correlates with epithelial-mesenchymal status and tumor-associated immune cytolytic activity. *Cancer Immunol Res* 2016;4(6):552–61. DOI: 10.1158/2326-6066.cir-15-0255.
 42. Richard G., Puisieux A., Caramel J. Antagonistic functions of EMT-inducers in melanoma development: implications for cancer cell plasticity. *Cancer Cell Microenviron* 2014;1(1):e61. DOI: 10.14800/ccm.61.
 43. Wels C., Joshi S., Koefinger P. et al. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011;131(9):1877–85. DOI: 10.1038/jid.2011.142.
 44. Zhao F., He X., Wang Y. et al. Decrease of ZEB1 expression inhibits the B16F10 cancer stem-like properties. *Biosci Trends* 2015;9(5):325–34. DOI: 10.5582/bst.2015.01106.
 45. Asnaghi L., Gezgini G., Tripathy A. et al. EMT-associated factors promote invasive properties of uveal melanoma cells. *Mol Vis* 2015;21:919–29. PMID: 26321866.
 46. Perrot C.Y., Gilbert C., Marsaud V. et al. GLI2 cooperates with ZEB1 for transcriptional repression of CDH1 expression in human melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 2013;26(6): 861–73. DOI: 10.1111/pcmr.12149.
 47. Hui C.C., Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2011;27:513–37.

- DOI: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154048.
48. Denecker G., Vandamme N., Akay O. et al. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death Differ* 2014;21(8):1250–61. DOI: 10.1038/cdd.2014.44.
 49. Tian L., Li L., Xing W. et al. IRGM1 enhances B16 melanoma cell metastasis through PI3K-Rac1 mediated epithelial mesenchymal transition. *Sci Rep* 2015;5:12357. DOI: 10.1038/srep12357.
 50. Taddei M.L., Giannoni E., Morandi A. et al. Mesenchymal to amoeboid transition is associated with stem-like features of melanoma cells. *Cell Commun Signal* 2014;12:24. DOI: 10.1186/1478-811X-12-24.
 51. Schlegel N.C., von Planta A., Widmer D.S. et al. PI3K signalling is required for a TGF β -induced epithelial-mesenchymal-like transition (EMT-like) in human melanoma cells. *Exp Dermatol* 2015;24(1):22–8. DOI: 10.1371/journal.pone.0049419.
 52. Cantelli G., Orgaz J.L., Rodriguez-Hernandez I. et al. TGF β -induced transcription sustains amoeboid melanoma migration and dissemination. *Curr Biol* 2015;25(22):2899–914. DOI: 10.1016/j.cub.2015.09.054.
 53. Peppicelli S., Bianchini F., Torre E., Calorini L. Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2014;31(4):423–33. DOI: 10.1007/s10585-014-9637-6.

Вклад авторов

С.В. Чулкова: идея, анализ публикаций, написание статьи;
 Д.А. Рябчиков, И.В. Савченко: перевод публикаций, дизайн, оформление статьи;
 И.А. Дудина, А.В. Егорова: анализ рукописи, оформление статьи;
 И.А. Гладилина, Н.Н. Тупицын: анализ рукописи.

Authors' contributions

S.V. Chulkova: idea, analysis of publications, writing an article;
 D.A. Ryabchikov, I.V. Savchenko: translation of publications, design, article formatting;
 I.A. Dudina, A.V. Egorova: analysis of the manuscript, article design;
 I.A. Gladilina, N.N. Tupitsyn: analysis of the manuscript.

ORCID авторов/ ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
 Д.А. Рябчиков / D.A. Ryabchikov: <https://orcid.org/0000-0003-2670-236>
 И.А. Дудина / I.A. Dudina: <https://orcid.org/0000-0001-6410-7120>
 И.В. Савченко / I.V. Savchenko: <https://orcid.org/0000-0003-2142-661X>
 А.В. Егорова / A.V. Egorova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
 И.А. Гладилина / I.A. Gladilina: <https://orcid.org/0000-0002-2481-0791>
 Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 17.07.2020. Принята к публикации: 02.10.2020.

Article submitted: 17.07.2020. Accepted for publication: 02.10.2020.

РАК ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, СОВРЕМЕННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ И ВОЗМОЖНЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Е.А. Быкова, Н.А. Фалалеева, Л.Ю. Гривцова

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба –
филиал ФГБУ «Научный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России;
Россия, 249036 Обнинск, ул. Королева, 4

Контакты: Екатерина Александровна Быкова bykawayekaterina@yandex.ru

Распространенность рака поджелудочной железы (РПЖ) в популяции населения всех стран невысока, однако агрессивный характер течения заболевания приводит к тому, что РПЖ является одной из главных причин смерти больных онкологического профиля. Прогноз при РПЖ значительно ухудшается в случае метастатического распространения. Доказано, что аденокарцинома поджелудочной железы с самого начала является системным заболеванием с ранним микрометастатическим распространением, поэтому вопрос эффективного лекарственного лечения представляется крайне актуальным. Химиотерапия — основа лечения пациентов с метастатическим РПЖ. Однако, несмотря на многочисленные клинические исследования с использованием известных цитостатических и таргетных агентов, прогресс в лечении данного заболевания остается относительно скромным по сравнению с прогрессом, достигнутым в лечении других типов опухолей. Сложности терапии РПЖ объясняются наличием плотной соединительнотканной опухолевой стромы, которая является не просто барьером для опухолевых клеток — она оказывает значимое влияние на различные жизненно важные клеточные процессы, включая образование опухоли, инвазию, метастазирование, способствует формированию лекарственной устойчивости. РПЖ человека является гетерогенным по молекулярно-биологическим характеристикам. Многие генетические изменения, включая зародышевые линии и соматические мутации, способствуют развитию данного заболевания. Недавние исследования показали, что в каждом образце РПЖ обнаруживается в среднем 63 генетических изменения и 12 основных нарушений сигнального пути. Дальнейшие исследования маркеров микроокружения опухоли и расшифровка гетерогенности генома опухоли при РПЖ должны стать основой для персонализированного подхода к лечению. Вероятно, в будущем интеграция традиционных химиотерапевтических методов лечения и иммунологического подхода будет ключом к эффективному лечению этой смертельной болезни.

Ключевые слова: рак поджелудочной железы, химиотерапия, таргетная терапия, иммунотерапевтические стратегии

Для цитирования: Е.А. Быкова, Н.А. Фалалеева, Л.Ю. Гривцова. Рак поджелудочной железы, современные терапевтические подходы и возможные перспективы. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):18–28.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-18-28



PANCREATIC CANCER, CURRENT THERAPEUTIC APPROACHES AND POSSIBLE PROSPECTS

E.A. Bykova, N.A. Falaleeva, L. Yu. Grivtsova

A. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation; 4 Korolev street, Obninsk 249036, Russia

Prevalence of pancreatic cancer (PC) is not high in the population, but the aggressive nature of the disease leads to the fact that PC is one of the main causes of death in a group of patients with cancer. The prognosis for PC is significantly worse in the case of metastatic spread. It is proved that pancreatic adenocarcinoma from the very beginning is a systemic disease with early micrometastatic spread, so the question of effective drug treatment is extremely relevant. Chemotherapy is the basis for the treatment of patients with metastatic prostate cancer. However, despite numerous clinical studies using known cytostatic and targeted agents, progress in the treatment of this disease remains relatively modest compared to the progress made in the treatment of other types of tumors. The complexities of prostate cancer therapy are explained by the presence of a dense connective tissue tumor stroma, which is not just a barrier to tumor cells. It has a significant impact on various vital cellular processes, including tumor formation, invasion, metastasis, and contributes to the formation of drug resistance. Pancreatic cancer is heterogeneous in terms of molecular and biological characteristics. Many genetic changes, including germ lines and somatic mutations, contribute to the development of this disease. Recent studies have shown that each sample of prostate cancer includes an average of 63 genetic changes and 12 major signalling pathways. Further studies of tumor microenvironment markers and decoding the heterogeneity of the tumor genome in PC should become the basis for a “personalized” approach to treatment. It is likely

that in the future, the integration of traditional chemotherapeutic treatments and an immunological approach will be the key to effective treatment of this deadly disease.

Keywords: *pancreatic cancer, chemotherapy, targeted therapy, immunotherapy strategies*

For citation: *E.A. Bykova, N.A. Falaleeva, L. Yu. Grivtsova. Pancreatic cancer, current therapeutic approaches and possible prospects. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4):18–28. (In Russ.).*

Введение

Рак поджелудочной железы (РПЖ) — злокачественное новообразование, исходящее из эпителия железистой ткани или протоков поджелудочной железы. Морфологически более чем в 95 % случаев РПЖ представлен различными вариантами протоковой аденокарциномы [1].

Около 5–10 % случаев РПЖ обусловлены генетическими мутациями. Среди оставшихся 90 % к основным установленным факторам риска относятся табакокурение, инфицирование *Helicobacter pylori*, ожирение, сахарный диабет и факторы, связанные с пищевыми привычками [2, 3].

Распространенность РПЖ в популяции населения всех стран не столь высока, однако из-за агрессивного характера течения это заболевание является одной из главных причин смерти больных онкологического профиля [1, 4]. Прогноз данного заболевания значительно ухудшается в случае метастатического распространения. Доклинические и клинические исследования показали, что аденокарцинома поджелудочной железы с самого начала является системным заболеванием с ранним микрометастатическим распространением, поэтому вопрос эффективного лекарственного лечения представляется крайне актуальным [5].

Во всем мире заболеваемость и смертность от РПЖ ежегодно увеличиваются. В России абсолютный прирост численности больных на 100 тыс. населения за период с 2011 по 2017 г. составил 3,1 (с 10,0 до 13,1 соответственно) [6]. Средний возраст заболевших мужчин — 64,6 года, женщин — 70,3 года [7].

Несмотря на некоторые улучшения в диагностике за последние 3 десятилетия, 5-летняя общая выживаемость (ОВ) значимо не увеличилась и составляет около 9 % (для всех стадий) [2, 4, 8, 9]. При этом среднероссийский показатель несвоевременной диагностики (IV стадия заболевания) при РПЖ максимален и составляет 58,3 %, к 5 годам остаются живы лишь 3 % пациентов. ОВ пациентов с нерезектабельным неметастатическим раком (30–40 % случаев) также невысока и составляет 11–18 мес, 5-летняя выживаемость у пациентов после радикального хирургического лечения РПЖ (15–20 % случаев на момент установки диагноза) составляет около 30 %.

В структуре смертности от онкологических заболеваний в России РПЖ составляет 5,9 %, что соот-

ветствует 5-му месту после рака легкого, желудка, ободочной кишки и молочной железы; показатель одногодичной летальности равен 68,2 % [6]. Средний возраст умерших от РПЖ мужчин — 64,8 года, женщин — 71,3 года [7].

Вопросы скрининга

Как правило, РПЖ протекает бессимптомно на начальных стадиях, и без использования инвазивных диагностических процедур (эндоскопические ультразвуковые исследования) современные методы скрининга не позволяют достичь эффективной ранней диагностики [1, 2, 4, 9].

В течение многих лет в клиниках для диагностики РПЖ используется оценка опухолеассоциированных антигенов СА 19–9, СА 242, СА 125, СА 72–4, α -фетопротеина, опухолевой пируваткиназы типа М2 и СА 50. Рекомендованным стандартом является оценка онкомаркеров РЭА, СА 19–9. Однако следует учитывать тот факт, что чувствительность и специфичность применяемых методов составляет около 80 %. Примерно у 5–10 % населения уровень СА 19–9 остается нормальным на фоне активного роста злокачественной опухоли поджелудочной железы. Это обусловлено отсутствием у таких пациентов антигена Льюиса, вследствие чего СА 19–9 не вырабатывается в большом количестве. Таким образом, оценка опухолеассоциированных антигенов не может быть использована с целью скрининга РПЖ [1, 2, 4].

Раннее выявление и лечение аденоматозных полипов, рака *in situ* и других предраковых или потенциально злокачественных образований толстой кишки и молочной железы привело к снижению смертности от этих видов рака. В настоящее время считается, что аденокарцинома протоков поджелудочной железы возникает в результате серии сходных прогрессирующих генетических мутаций и специфических предраковых поражений, таких как интраэпителиальная неоплазия поджелудочной железы, внутрипротоковые папиллярные слизистые новообразования и муцинозные кистозные новообразования. Однако на сегодняшний день отсутствуют оптимальные методики скрининга для раннего выявления диспластических процессов в поджелудочной железе и рака *in situ* [2, 10, 11].

Молекулярно-биологические аспекты РПЖ

Химиотерапия является основой лечения пациентов с метастатическим РПЖ [1, 8]. Однако большинство существующих противоопухолевых лекарственных препаратов малоэффективны, их применение оказывает лишь незначительное влияние на общую и безрецидивную выживаемость [1].

Обращаясь к механизму первичной резистентности РПЖ, следует отметить, что опухолевые клетки обладают высокой устойчивостью к воздействию химиотерапевтических препаратов вследствие гипоксии опухоли, аномальных уровней экспрессии генов, генетических мутаций, обуславливающих активацию или ингибирование клеточных сигнальных путей.

РПЖ человека является гетерогенным по молекулярно-биологическим характеристикам [8]. Многие генетические изменения, включая зародышевые линии и соматические мутации, способствуют развитию данного заболевания. Недавние исследования показали, что в каждом образце РПЖ обнаруживается в среднем 63 генетических изменения и 12 основных нарушений сигнального пути [1]. Наиболее часто мутации выявляются в семействе генов и сигнальных путей *KRAS* (более чем 90 % инвазивного РПЖ), но возможны и другие драйверные мутации, такие как *Ink4a*, *BRCA2*, *LKB1*, *P16/CDKN2A*, *p53*, *SMAD4*, *MLH1*, *PRSS1*; *BRAF*, *MAPK*, *PI3K*, *Akt*; *VEGF*, *IGF1R*. Необходимо более масштабные исследования, чтобы определить, являются ли эти мутации особенно распространенными среди конкретных демографических групп и влияют ли они на онкологические результаты [3, 4, 8, 10–13].

В последнее десятилетие большой исследовательский интерес вызывает микроокружение опухоли. Микросреда опухоли поджелудочной железы содержит обильную фиброзную строму, которая включает различные типы клеток и компоненты внеклеточного матрикса, такие как коллаген, фибронектин, гиалуроновая кислота и N-ацетилглюкозамин. Строма — не просто барьер для опухолевых клеток, она оказывает значимое влияние на различные жизненно важные клеточные процессы, включая образование опухоли, инвазию, метастазирование, способствует формированию лекарственной устойчивости. Строма опухоли создает барьер для доставки многих терапевтических агентов, включая небольшие молекулы, препараты на основе антител с более высокой молекулярной массой и составы наночастиц. Недавние исследования показали, что строма поджелудочной железы участвует в процессах метаболизма опухолевых клеток, рекрутирования иммунных клеток и регуляции ацинарно-протоковой метаплазии при прогрессировании рака. Дальнейшие исследования маркеров микроокружения опухоли представляются актуальными

в контексте разработки терапевтических мишеней для РПЖ [1, 4, 12].

Лечение РПЖ

Современное состояние. Стандартные подходы к лечению злокачественных образований включают хирургическое вмешательство, лучевую и химиотерапию, химиолучевую и таргетную терапию. Существует несколько химиотерапевтических режимов лечения диссеминированного РПЖ [14].

Известно, что химиотерапия на основе 5-фторурацила (5-ФУ) повышает ОВ на 3 мес по сравнению с проведением только симптоматической терапии [15].

Монотерапия гемцитабином считалась стандартом лечения метастатического РПЖ с 1997 г., после того как было показано, что он обеспечивает больший клинический эффект и некоторое повышение ОВ по сравнению с 5-ФУ. Медиана общей выживаемости (мОВ) больных с метастатической формой рака в группе гемцитабина составила 6,8 мес, а в группе 5-ФУ — 5,8 мес [2, 8].

В 2005 г. опубликованы результаты исследования фазы I, по данным которого впервые высокую противоопухолевую активность при РПЖ продемонстрировала комбинация цитостатиков: 5-ФУ, иринотекана и оксалиплатина (режим FOLFIRINOX) [2, 16].

Результаты фаз II–III рандомизированных многоцентровых исследований PRODIGE 4/ACCORD 11 (2011 г.) продемонстрировали достоверное увеличение мОВ до 11,1 мес в группе больных метастатическим РПЖ, получавших лечение в режиме FOLFIRINOX, по сравнению с группой пациентов, у которых применялся гемцитабин в монорежиме — 6,8 мес ($p < 0,001$). Данный режим в настоящее время рассматривается как один из наиболее эффективных вариантов 1-й линии терапии для пациентов с ECOG-статусом 0–1 [2, 3, 8, 10, 17].

Таргетирование опухолевой стромы считается одним из возможных механизмов действия Nab-паклитаксела (точка приложения SPARC, тем самым улучшается доставка химиопрепаратов к опухоли). В 2013 г. в США Nab-паклитаксел был зарегистрирован для лечения метастатического РПЖ. По данным международного исследования фазы III MPACT, в которую был включен 861 пациент, комбинация Nab-паклитаксела и гемцитабина показала более высокую частоту достижения общего ответа (23 % против 7 %, $p < 0,001$) и увеличение мОВ (8,5 мес против 6,7 мес, $p < 0,001$) по сравнению с монотерапией гемцитабином [1–4, 8, 10].

Учитывая потенциальную синергию, наблюдаемую в доклинических моделях, Nab-паклитаксел и гемцитабин комбинировали с капецитабином,

но, вероятно, из-за более низких введенных доз результаты были скромными: частота ответов 14 % и мОВ 7,5 мес [3].

Таким образом, стандартом лечения метастатического РПЖ в настоящее время являются 2 режима: FOLFIRINOX и комбинация препаратов Nab-паклитаксел с гемцитабином [14, 18].

При сравнении эффективности данных режимов в ретроспективном общенациональном анализе медицинских карт в США было установлено, что мОВ составила 12,1 и 13,8 мес при терапии в режимах гемцитабин + Nab-паклитаксел и FOLFIRINOX соответственно (отношение рисков (ОР) 0,99; $p = 0,96$). У пациентов со статусом ECOG ≤ 1 мОВ оказалась равна 14,1 и 13,7 мес соответственно (ОР 1,00; $p = 0,99$). Также было установлено, что среди больных, получавших 1-ю линию терапии в режимах гемцитабин + Nab-паклитаксел и FOLFIRINOX, соответственно 36,1 и 41,3 % смогли получить 2-ю линию лечения. При этом показатели ОВ достигли 16,3 и 16,6 мес соответственно (ОР 1,04; $p = 0,76$). Частота развития нежелательных явлений, зарегистрированных в медицинских картах пациентов, получавших терапию 1-й линии режимами гемцитабин + Nab-паклитаксел и FOLFIRINOX, статистически значимо не различалась (соответственно 35,0 и 33,6 %; $p = 0,79$). Диарея, стоматит, утомляемость, мукозит, тошнота и рвота статистически значимо чаще встречались при применении режима FOLFIRINOX по сравнению с режимом гемцитабин + Nab-паклитаксел; в группе гемцитабин + Nab-паклитаксел достоверно чаще наблюдали токсическую нейропатию. По результатам данного анализа в 2018 г. сделаны выводы, что в реальной клинической практике ОВ пациентов, получавших в качестве терапии 1-й линии гемцитабин + Nab-паклитаксел или FOLFIRINOX, а также больных, получивших активную терапию 2-й линии, не различается [18]. Более благоприятный профиль безопасности препаратов и более широкая популяция включенных в исследование MPACT пациентов позволяют сделать вывод, что комбинация гемцитабина и Nab-паклитаксела имеет более широкие показания [19].

В клинических исследованиях и медицинской практике оценено множество комбинаций гемцитабина с другими препаратами, включая такие цитотоксические агенты, как иринотекан, 5-ФУ, цисплатин, оксалиплатин и капецитабин. Ни одна из этих схем не показала более высокой эффективности в отношении увеличения ожидаемой продолжительности жизни [2].

Перспективы. За последние несколько лет опубликованы обнадеживающие результаты многочисленных клинических испытаний фазы III, которые расширили терапевтические возможности для пациентов с распространенным РПЖ [20–23].

Самые последние разработки привели к утверждению FDA (Food and Drug Administration, США) нанопилосомального иринотекана, nal-IRI, в октябре 2015 г. (по результатам исследования NAPOLI-1). Данный факт очень важен, поскольку nal-IRI – это первый агент, специально одобренный для использования при лечении 2-й линии метастатического РПЖ. мОВ в группе пациентов, получавших иринотекан с 5-ФУ/лейковорином в качестве терапии 2-й линии, составила 6,1 мес, тогда как в группе больных, получавших лечение только 5-ФУ/лейковорином – 4,2 мес [2, 24].

Таргетная терапия является достаточно новой концепцией в онкологии, которая обеспечивает эффективность лекарственного средства с учетом индивидуальных особенностей опухоли [25]. В последние несколько лет тестировались различные целевые агенты для лечения РПЖ: ингибиторы EGFR (эрлотиниб, цетуксимаб, панитумумаб), ингибиторы VEGFR (сорафениб), HER2 (трастузумаб, киксцутумаб, лапатиниб), MEK (селуметиниб, траметиниб, рефаметиниб, пимасертиб), PI3K/mTOR (ригосертиб, бупарлисиб, еверолимус), Hedgehog (висмодегиб), Notch/Dll4 (тарекстумаб, демцизумаб), Src (дасатиниб), JAK/STAT (руксолитиниб). К сожалению, большинство этих препаратов оказались неэффективны или показали эффективность у очень небольшого числа пациентов, причиной этого, вероятно, является высокая молекулярная гетерогенность опухоли [12, 25].

Ангиогенез имеет решающее значение для роста злокачественных новообразований. **Антиангиогенная терапия** оказалась высокоэффективной при почечно-клеточном раке, колоректальном раке, раке легких, глиобластоме и раке яичников. В ряде исследований была оценена эффективность антиангиогенной терапии при РПЖ. Гиперэкспрессия VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) выявляется более чем у 90 % пациентов с РПЖ, что, казалось бы, полностью оправдывает назначение VEGF-направленной терапии. Однако по результатам рандомизированного исследования фазы III CALGB 80303 не выявлено различий в показателях ОВ пациентов, которым проводили лечение комбинацией бевацизумаб + гемцитабин, по сравнению с результатами тех, кто принимал гемцитабин и плацебо [26].

Все попытки использовать ингибиторы TK VEGFR, такие как сорафениб и акситиниб, были неудачными. В настоящее время продолжается исследование фазы II с использованием нового антиангиогенного препарата TL-118 в сочетании с гемцитабином для лечения метастатического РПЖ [27, 28].

Мультикиназный ингибитор форетиниб действует в отношении рецепторов VEGFR, RON (семейство протоонкогенов *MET*), c-Met (рецептор фактора

роста гепатоцитов), с-KIT (ингибиторы рецепторов тирозинкиназы), FLT-3 (fms-подобная тирозинкиназа 3) и PDGFR (рецептор тромбоцитарного фактора роста). Как показывают данные, форетиниб нацелен на множественные дополнительные киназы, что приводит к ингибированию роста опухолей. Поскольку HGF (фактор роста гепатоцитов) и с-MET часто сверхэкспрессируются при РПЖ, ориентация на эти сигнальные пути привлекла большое внимание. Согласно выводам из недавнего исследования форетиниб ингибирует рост опухоли, ангиогенез и лимфангиогенез у ксенотрансплантатов животных, ингибируя не только передачу сигналов с-MET, но и VEGFR-2, VEGFR-3 и TIE-2 (мембранный белок, рецептор ангиопоэтина 1) [29].

Другой целевой мишенью при РПЖ может быть сигнальный путь EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), входящий в семейство ErbB (гомолог В вирусного онкогена эритробластной лейкемии птиц) трансмембранных рецепторов тирозинкиназы [12]. Аберрантная активность EGFR приводит к димеризации рецептора и впоследствии активирует нисходящие сигналы, включая участников путей *RAS* и PI3K/Akt/mTOR. Гиперэкспрессия этого рецептора наблюдается более чем в 90 % случаев РПЖ. Устойчивая активация EGFR отмечена в клеточных линиях РПЖ, обнаружено, что ингибиторы EGFR приводят к снижению пролиферации опухолевых клеток. В настоящее время в качестве ингибиторов EGFR используются препараты цетуксимаб, панитумумаб, эрлотиниб, gefitinib, afatinib и др. Результаты применения блокаторов активности EGFR противоречивы. Так, клинические испытания с использованием антител против EGFR и антител против *ErbB2* при РПЖ дали отрицательные результаты [12, 30].

Однако в рандомизированном исследовании фазы III NCIC, в котором пациентам с РПЖ назначали комбинацию гемцитабина с эрлотинибом или без него, сообщалось, что у пациентов, получивших указанную комбинацию, наблюдалось умеренное, но статистически значимое увеличение мОВ ($p = 0,038$) и выживаемости без прогрессирования ($p = 0,004$). Данные поднабора анализа этого исследования не дали ответа на вопрос, был ли статус мутации *KRAS* или EGFR прогностическим маркером терапевтического ответа на эрлотиниб. Несмотря на то что мОВ составила 6,2 мес и 5,9 мес соответственно, это исследование заслуживает внимания, поскольку показало улучшение отдаленных результатов лечения при использовании комбинации гемцитабин/эрлотиниб у больных метастатическим РПЖ. С другой стороны, при использовании указанного сочетания препаратов должны быть учтены потенциальные осложнения, некоторые из которых, как сообщалось, приводили к летальному исходу [2, 3, 10].

Применение другого моноклонального антитела к EGFR, нимотузумаба, в комбинации с гемцитабином по сравнению с гемцитабином в монорежиме позволило улучшить показатели ОВ у пациентов с местнораспространенным РПЖ (8,7 мес против 6,1 мес) с приемлемой токсичностью [31].

Клинические исследования по оценке эффектов нимотузумаба в сочетании с гемцитабином продолжаются у пациентов с местнораспространенным или метастатическим РПЖ, не имеющими мутации генов *RAS* [32].

Путь IGF1R. IGF1R (рецептор инсулиноподобного фактора роста) обычно гиперэкспрессирован при РПЖ. Его активация приводит к сигнальному каскаду, который запускает несколько путей (ERK и PI3K/Akt/mTOR). Он также стимулирует рост опухоли через *RAS*-зависимые и независимые пути. Ингибирование передачи сигналов IGF1R усиливает цитотоксичность гемцитабина в ксенотрансплантатах РПЖ [33].

Однако ингибитор IGF1R AMG-479 и моноклональное антитело киксutumумаб не смогли обеспечить каких-либо преимуществ в показателях ОВ в предыдущем исследовании [34, 35].

По мнению некоторых исследователей, использование сочетания блокаторов IGF1R и ErbB может оказаться перспективной стратегией для преодоления химиорезистентности, распространенной при РПЖ [36–38].

Более раннее исследование продемонстрировало, что одновременная блокада IGF1R и EGFR/Her-2 синергически ингибирует рост опухоли поджелудочной железы и полностью устраняет активацию фосфорилирования IRS-1, Akt и MAPK (митогенактивируемая протеинкиназа). Одновременная блокада IGF-IR и EGFR/Her-2 с использованием NVP-AEW541 и лапатиниба может преодолеть лекарственную устойчивость при РПЖ [35].

Путь RAS. Семейство генов *RAS* (Retrovirus Associated DNA Sequences) включает 3 гена: *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*. Сигнальный путь митогенактивируемой протеинкиназы (MAPK) *RAS/RAF/MEK/ERK* активируется многочисленными сигналами роста через их рецепторы, включая EGFR, и имеет решающее значение для опосредования неконтролируемого роста опухоли. MAPK играет решающую роль в развитии РПЖ. К сожалению, траметиниб, ингибитор MEK (одобрен для лечения меланомы), в сочетании с гемцитабином при распространенном РПЖ не продемонстрировал положительного влияния на показатели ОВ больных. В настоящее время проводится фаза II испытания другого ингибитора MEK, AZD6244, в сочетании с эрлотинибом в качестве лечения 2-й линии при распространенном РПЖ [3, 12, 39].

Путь MAPK является важным сигнальным каскадом для различных рефрактерных к стандартной

химиотерапии видов рака, например с мутантным *KRAS* (*mKRAS*) и *BRAF* (*mBRAF*) [40].

Данные виды мутаций способствуют развитию многих злокачественных новообразований у человека, включая РПЖ, рак толстой кишки, легких и меланому [41].

Рак *mBRAF* имеет общий каскад *RAF/MEK/ERK* с раком *mKRAS*. Однако, несмотря на разработку определенных ингибиторов специфических киназ, терапия не увенчалась значительным успехом. Более того, использование некоторых ингибиторов *RAF* вызывает *ERK*-зависимые эффекты обратной связи, которые, наоборот, вызывают усиление роста опухоли [42, 43].

Путь PI3K/Akt/mTOR. После активации внутриклеточных сигналов с помощью *RAS* или *EGFR* PI3K (ферменты фосфоинозитид-3-киназы) активируют Akt (семейство протеинкиназ В человека), которые впоследствии запускают несколько нижестоящих мишеней, таких как mTOR (мишень рапамицина млекопитающих). Это приводит к регуляции многих важных клеточных процессов, включая рост клеток, метаболизм, метастазирование и устойчивость к химиотерапии [44]. Путь PI3K-Akt активируется у 59 % пациентов с РПЖ [45]. Дерегуляция этого пути через отсутствие или снижение экспрессии PTEN (гомолог фосфатазы и тензина, природного антагониста PI3K) часто обнаруживается при РПЖ [46].

На этапе II в настоящее время проводится тестирование комбинации антисмыслового олигонуклеотида Akt, RX-0201, с гемцитабином при метастатическом РПЖ [47].

Начата фаза I клинических исследований BKM120, ингибитора PI3K 1A, в сочетании с mFOLFOX6 у пациентов с метастатическим РПЖ [48].

Эверолимус, ингибитор mTOR, проявляет противоопухолевую активность, включая ингибирование пролиферации клеток, апоптоз и ангиогенез, и проявляет синергетический эффект в сочетании с другими противораковыми агентами [49]. Фаза II клинических исследований проведена для изучения лечебной активности комбинации капецитабина с эверолимусом у пациентов с распространенным РПЖ. Частота ответа составила 6,5 %, а ОВ достигла 8,9 мес. Таким образом, эта комбинированная терапия может повысить эффективность капецитабина [50]. Было подтверждено, что сорафениб, мультикиназный ингибитор, нацеленный на *Raf-1*, *BRaf*, *VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3* и *PDGFRβ*, эффективен при прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциноме [51]. Он действует путем ингибирования *RAF-1* и *BRAF*, а также активности рецепторов факторов роста эндотелия сосудов (*VEGFR1*, *VEGFR2*, *VEGFR3* и *PDGFRβ*). Фаза I/II клинического исследования сорафениба и эверолимуса при распространенном

РПЖ была завершена, но результаты еще не опубликованы [52].

Метформин, гипогликемический препарат, который оказывает непосредственное метаболическое действие за счет активации аденозинмонофосфат-активируемых протеинкиназ, может ингибировать путь mTOR, активируя ген-супрессор опухолей *TSC2* (комплекс туберозного склероза 2). В рандомизированном исследовании фазы II изучалась активность и безопасность эрлотиниба и метформина в сочетании с гемцитабином у пациентов с метастатическим РПЖ [12, 53].

Путь Src. Src (семейство протоонкогенных рецепторных протеин-тирозинкиназ) играет ключевую роль в регуляции путей множественной сигнальной трансдукции посредством своих взаимодействий с рядом белков, включая рецепторные тирозинкиназы и рецепторы, связанные с G-белком (семейство белков, относящихся к ГТФамам и функционирующих в качестве вторичных посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах). C-Src — протоонкоген тирозинкиназы Src, часто сверхэкспрессируется и/или aberrантно активируется при ряде злокачественных новообразований, включая 70 % случаев РПЖ [30]. Дазатиниб обладает двойным действием: подавляет активность химерной тирозинкиназы BCR-ABL (гибридный белок, продукт гибридного гена *BCR-ABL1*, формирующегося в результате реципрокной транслокации между хромосомами 9 и 22) и тирозинкиназ Src-семейства. Дазатиниб был изучен в исследовании фазы II у пациентов с метастатическим РПЖ, однако обнадеживающие результаты не были получены. Было инициировано исследование фазы II FOLFOX-D для изучения эффективности дазатиниба в сочетании с 5-ФУ, лейковорином и оксалиплатином в отношении метастатического РПЖ [12, 54, 55].

ЯК/STAT-пути. Активация пути Janus-киназы, сигнального преобразователя и активатора транскрипции (ЯК/STAT), была обнаружена во многих опухолях человека [56].

ЯК представляют собой семейство цитоплазматических тирозинкиназ, состоящее из 4 членов — ЯК1, ЯК2, ЯК3 и Tyk2 (нерецепторная тирозин-протеинкиназа). Активация ЯК происходит при связывании лиганда с рецепторами клеточной поверхности, что приводит к созданию сайтов для взаимодействия с белками, содержащими SH2 (фосфотирозин-связывающие домены гомологии Src 2). STATs (семейство нижестоящих транскрипционных факторов для ЯКs) содержат остаток тирозина, фосфорилированный с помощью ЯК, что приводит к ядерной транслокации [57]. В ядре STATs служат факторами, которые инициируют транскрипцию нижестоящих генов-мишеней. Аномалии пути ЯК/STAT вносят непосредственный вклад в клеточную трансформацию,

повышенную пролиферацию клеток, апоптоз и ангиогенез.

Сообщалось о мутациях JAK и активации STAT при РПЖ [13, 55]. В рандомизированном исследовании фазы II RECAP ингибитор JAK 1/2, руксолитиниб, оценивался в комбинации с капецитабином у пациентов с метастатическим РПЖ. В предварительном анализе подгруппы пациентов с повышенным уровнем С-реактивного белка (показатель высокого уровня системного воспаления, связанного с кахексией, опосредованной раком) мОВ была значительно выше у пациентов, получивших руксолитиниб в комбинации с капецитабином, по сравнению с принимавшими капецитабин в монорежиме (83 дня против 55 дней). Полученные результаты позволили начать два исследования фазы III (JANUS 1 и JANUS 2), которые проводятся в настоящее время для оценки руксолитиниба у пациентов с резистентным к гемцитабину РПЖ и высоким уровнем С-реактивного белка [12].

В настоящее время также проводится ранняя фаза клинических испытаний руксолитиниба и гемцитабина с Nab-паклитакселом или без него [23].

Мутации BRCA. При наличии герминальной или соматической мутации *BRCA* (ген-супрессор опухолей), или при наличии 2 и более родственников 1–3-й степени родства, страдавших раком яичников, раком молочной железы или РПЖ, показана комбинация гемцитабина и препаратов платины: цисплатина, карбоплатина, оксалиплатина [2, 7].

Больные РПЖ с дефицитом *BRCA* выигрывают от лечения ингибиторами PARP – фермента, катализирующего поли-АДФ-рибозилирование, один из видов посттрансляционной модификации белков [3]. В 2012 г. было инициировано рандомизированное исследование фазы II по изучению эффективности комбинации цисплатина и гемцитабина с велипарибом (селективный ингибитор PARP) или без него у пациентов с местнораспространенным или метастатическим РПЖ [58].

Применение другого ингибитора PARP, олапариба, было одобрено в США и в ряде других стран в 2019 г. в качестве 1-й линии поддерживающей терапии у пациентов с метастатическим РПЖ с герминальными мутациями в генах *BRCA 1/2* на основании результатов исследования фазы III POLO. В исследовании было показано, что терапия олапарибом почти в 2 раза увеличивает медиану выживаемости без прогрессирования у пациентов с герминальными мутациями в генах *BRCA 1/2* – до 7,4 мес по сравнению с 3,8 мес на фоне плацебо [59, 60].

Олапариб также исследуется у пациентов с распространенным РПЖ в комбинации с гемцитабином. В рандомизированном многоцентровом исследовании фазы I/II в настоящее время изучаются эффекты

иринотекана, цисплатина и митомицина С в сочетании с олапарибом в когорте больных с распространенным РПЖ [3].

NTRK. Менее 5 % случаев РПЖ демонстрируют слияние генов *NTRK* (нейротрофная рецепторная тирозинкиназа), что приводит к конститутивной активации нескольких нижестоящих сигнальных путей, включая RAS-MAPK (пролиферация), PI3K-AKT (выживание/антиапоптоз) или PLCγ-PKC (дифференциация). Ингибиторы *NTRK* получили одобрение для лечения любых опухолей с признаками слияния *NTRK*, независимо от локализации первичной опухоли. Так, NCCN (National Comprehensive Cancer Network, США) рекомендует ларотректиниб и энтректиниб для лечения метастатической формы РПЖ, несущей слияние генов *NTRK* [61].

Активно изучаются вещества, направленные на разрушение плотной десмопластической опухолевой стромы (ориентация на муцины, мезотелин, гиалуроновую кислоту и переносчики тяжелых металлов (транспортер цинка ZIP4)) [1, 3, 8].

Для усиления противоопухолевого эффекта с учетом иммунного распознавания РПЖ активно внедряются в практику методы иммунотерапии (адоптивная Т-клеточная терапия, вакцины, интерфероны, ингибиторы PD-L1) [3, 62]. Так, NCCN во 2-й линии терапии рекомендует применение пембролизумаба при наличии MSI-H (микросателлитная нестабильность)/dMMR (наличие дефицита репарации ошибочного спаривания) [62]. Последнее обнаруживается с частотой около 1 % при РПЖ. В исследовании фазы II KEYNOTE-158 медиана выживаемости без прогрессирования и ОВ в когорте из 22 ранее леченных пациентов с РПЖ составили всего 2,1 и 4,0 мес соответственно. Однако было получено 4 объективных ответа (18 %), 1 из которых был полным [61].

В апреле 2020 г. в США были опубликованы результаты ретроспективного анализа «Знай свою опухоль» (The Know Your Tumor, KYT). Из 1856 пациентов с РПЖ, которые были включены в программу KYT в период с 2014 по 2019 г., 1082 (58 %) пациента получили персонализированные отчеты, в которых сообщались результаты молекулярных тестов и подробные варианты лечения. Из 1028 пациентов с РПЖ (аденокарцинома, аденосквамозная карцинома и ацинарно-клеточная карцинома) у 282 (26 %) опухолевые профили имели значимые молекулярные изменения. Из-за агрессивного характера течения болезни либо логистических и экономических проблем менее 5 % пациентов смогли получить персонализированную терапию (ингибиторы иммунных контрольных точек, *TRK*, *RAF-MEK* и *PARP*). Однако результаты показывают, что пациенты, у которых есть действенные молекулярные изменения, могут получить значительную пользу от приема индивидуально

подобранной терапии. Показано, что средняя ОВ пациентов с распространенным РПЖ и значимыми изменениями, получавших индивидуально подобранную терапию, на 1 год больше, чем у пациентов со значимыми изменениями, получавших стандартную терапию, или пациентов без значимых изменений. Никакой другой терапевтический метод в мире на данный момент не дал этой популяции пациентов преимущества такого масштаба. Таким образом, эти результаты создают основу для проспективных клинических испытаний, основанных на молекулярном профилировании [62, 63].

Пока иммунотерапевтические стратегии на практике не дали впечатляющих результатов при РПЖ, предпринимаются попытки использования клеточной терапии. Разработана генетическая конструкция CRS-207 (AduroBiosciences, Беркли, Калифорния, США), принадлежащая к семейству продуктов на так называемой платформе LADD Aduro, в которой используются бактерии *Listeria* для активации иммунного ответа против специфических опухолевых антигенов [3]. Создана GVAX — еще одна аллогенная цельноклеточная вакцина, в которой модифицированные клетки РПЖ экспрессируют GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), действующий как фактор созревания для антигенпрезентирующих клеток/дендритных клеток [64].

В фазе IIb исследования ECLIPSE пациенты с ранее пролеченной метастатической аденокарциномой поджелудочной железы были рандомизированы в соотношении 1 : 1 : 1 для получения: циклофосфамид/GVAX + CRS-207 (группа А), CRS-207 (группа В) или химиотерапии 1 агентом по выбору врача — гемцитабин/капецитабин/5-ФУ с лейковорином или без него/иринотекан/эрлотиниб (группа С). Первичная группа включала пациентов, у которых была неэффективной терапия двумя и более линиями, включая препарат гемцитабин. Основной задачей было сравнение ОВ между группами А и С в основной когорте. В когорту 2-й линии были включены пациенты, которые ранее получали 1 линию терапии. Дополнительные цели включали сравнение ОВ между всеми группами лечения, оценку безопасности и реакцию опухоли. В заключительном анализе исследования медиана ОВ (95 % доверительный интервал) в первичной когорте ($n = 213$) составила 3,7 (2,9–5,3), 5,4 (4,2–6,4) и 4,6 (4,2–5,7) мес в группах А, В и С

соответственно, без существенной разницы между группами А и С ($p =$ несущественно, 95 % доверительный интервал 0,84–1,64). Наиболее частыми побочными эффектами во всех группах лечения были озноб, гипертермия, усталость и тошнота. Случаев смерти не было. В выводах, опубликованных в 2018 г., показано, что комбинация циклофосфамид/GVAX + CRS-207 не улучшала ОВ по сравнению с химиотерапией [65, 66].

Это послужило причиной для проведения новых исследований, цель которых — сравнение комбинаций вакцин с химиотерапией, а также оценка эффективности вакцин в сочетании с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа в качестве лекарственной терапии РПЖ во 2-й и 3-й линии.

В настоящий момент проводится набор на 2 новых исследования фазы II, которые позволят оценить безопасность и эффективность CRS-207 в сочетании с другими противоопухолевыми препаратами у пациентов с РПЖ (соответственно циклофосфамид, ниволумаб, ипилимумаб, GVAX PancreasVaccine, CRS-207 и циклофосфамид, эпикадостат, пембролизумаб, CRS-207, GVAX PancreasVaccine) [67, 68].

Заключение

Таким образом, несмотря на многочисленные клинические исследования с использованием известных цитостатических и таргетных агентов, прогресс в лечении РПЖ остается относительно скромным по сравнению с прогрессом, достигнутым в лечении других типов опухолей.

Представленные данные диктуют острую необходимость поиска и разработки новых методов лечения данного заболевания [1].

Расшифровка гетерогенности генома опухоли при РПЖ должна стать основой для персонализированного подхода к лечению. Несомненно, в будущем интеграция традиционных химиотерапевтических методов лечения и иммунологического подхода будет ключом к эффективному лечению этой смертельной болезни.

Современные онкологи должны сосредоточиться на дальнейшем понимании генетических и молекулярных факторов РПЖ, способствующих онкогенезу, и на разработке более целенаправленной и менее токсичной системной терапии с привлечением в том числе и иммунотерапевтических подходов [3, 10].

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

- Zhu L., Staley C., Kooby D. et al. Current Status of Biomarker and Targeted Nanoparticle Development: The Precision Oncology Approach for Pancreatic Cancer Therapy. *Cancer Lett* 2017;388:139–48. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.11.030.
- Ducreux M., Cuhna A., Caramella C. et al. Cancer of the Pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2015;26(suppl 5):v56–v68.
- Chiorean E.G., Covelev A.L. Pancreatic cancer: optimizing treatment options, new, and emerging targeted therapies. *Drug Des Devel Ther* 2015;9:3529–45. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S60328>.
- Rossi M., Rehman A., Gondi C. Therapeutic options for the management of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(32):11142–59. DOI: 10.3748/wjg.v20.i32.11142.
- Bonucci M., Pastore C., Ferrera V. et al. Integrated Cancer Treatment in the Course of Metastatic Pancreatic Cancer: Complete Resolution in 2 Cases. *Integr Cancer Ther* 2018;17(3):994–9. DOI: 10.1177/1534735418755479.
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2017 году (заболеваемость и смертность). М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 2018. С. 18–31. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. Malignant neoplasms in Russia in 2017 (morbidity and mortality). Moscow: FGBU “MNIIOI im. P.A. Gertsena” Ministry of Health of Russia, 2018. Pp. 18–31 (In Russ.).]
- Давыдов М.И., Петровский А.В. Онкология. Клинические рекомендации, 2018. С. 240–59. [Davydov M.I., Petrovsky A.V. Oncology. Clinical recommendations, 2018. Pp. 240–59. (In Russ.).]
- Frank T., Sun X., Zhang Y. et al. Genomic Profiling Guides the Choice of Molecular Targeted Therapy of Pancreatic Cancer. *Cancer Lett* 2015;363(1):1–6. DOI: 10.1016/j.canlet.2015.04.009.
- Zhu H., Li T., Du Y. et al. Pancreatic cancer: challenges and opportunities. *BMC Med* 2018;16:214. DOI: 10.1186/s12916-018-1215-3.
- Mohammed S., Van Buren G. 2nd, Fisher W.E. et al. Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J Gastroenterol* 2014;20(28):9354–60. DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9354.
- Neureiter D., Jäger T., Ocker M., Kiesslich T. Epigenetics and pancreatic cancer: Pathophysiology and novel treatment aspects. *World J Gastroenterol* 2014;20(24):7830–48. DOI: 10.3748/wjg.v20.i24.7830.
- Matsuoka T., Yashiro M. Molecular targets for the treatment of pancreatic cancer: Clinical and experimental studies. *World J Gastroenterol* 2016;22(2):776–89. DOI: 10.3748/wjg.v22.i2.776.
- Müller S., Raulefs S., Bruns P. et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2015;14:94. DOI: 10.1186/s12943-015-0358-5.
- Рак поджелудочной железы. Клинические рекомендации. Министерство здравоохранения РФ, 2018. С. 14–23. [Pancreatic cancer. Clinical recommendations. Ministry of Health of the Russian Federation, 2018. Pp. 14–23. (In Russ.).]
- Lee H., Park S. Systemic Chemotherapy in Advanced Pancreatic Cancer. *Gut Liver* 2016;10(3):340–7. DOI: 10.5009/gnl15465.
- Conroy T., Paillot B., François E. et al. Irinotecan plus oxaliplatin and leucovorin-modulated fluorouracil in advanced pancreatic cancer – a GroupeTumeurs Digestives of the FédérationNationale des Centres de LutteContre le Cancer study. *J Clin Oncol* 2005;23:1228–36. DOI: 10.1200/JCO.2005.06.050.
- Попова А.С., Покатаев И.А., Тюляндин С.А. Комбинированные режимы химиотерапии при раке поджелудочной железы. *Медицинский совет* 2017;6:62–70. [Popova A. S., Pokataev I. A., Tyulyandin S. A. Combined chemotherapy regimens for pancreatic cancer. *Meditsinskiy sovet = Medical Council* 2017;6:62-70. (In Russ.).] DOI: 10.21518/2079-701X-2017-6-62-70.
- Sohal D.P., Mangu P.B., Khorana A.A. et al. Metastatic Pancreatic Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2016;34(23):2784–96. DOI: 10.1200/JCO.2016.67.1412.
- Kim S., Signorovitch J., Yang H. et al. Comparative Effectiveness of nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine vs FOLFIRINOX in Metastatic Pancreatic Cancer: A Retrospective Nationwide Chart Review in the United States. *Adv Ther* 2018;35:1564–77. DOI: 10.1007/s12325-018-0784-z.
- Результаты исследования по применению Нимотузаума у взрослых с раком поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00561990>.
- Результаты исследования по применению Селуметиниба и эрлотиниба в лечении пациентов с местнораспространенным или метастатическим раком поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01222689>.
- Результаты исследования по применению М402 в комбинации с Наб-паклитакселом и гемцитабином при раке поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01621243>.
- Результаты исследования по применению Гемцитабина и Цисплатина с Велипарибом или без него или только Велипариба при лечении пациентов с местнораспространенным или метастатическим раком поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01585805>.
- Andrew H.Ko. Nanomedicine developments in the treatment of metastatic pancreatic cancer: focus on nanoliposomal irinotecan. *Int J Nanomedicine* 2016;11:1225–35. DOI: 10.2147/IJN.S88084.
- Safran H., Iannitti D., Ramanathan R. et al. Herceptin and gemcitabine for metastatic pancreatic cancers that overexpress HER-2/neu. *Cancer Invest* 2004;22:706–12. DOI: 10.1081/cnv-200032974.
- Pang H., Starr M. Prognostic and predictive blood-based biomarkers in patients with advanced pancreatic cancer: results from CALGB80303 (Alliance). *Clin Cancer Res* 2013;19(24):6957–66. DOI: 10.1158/1078-0432.
- Kindler H., Niedzwiecki D., Hollis D. et al. Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the Cancer and Leukemia Group B (CALGB 80303). *J Clin Oncol* 2010;28:3617–22. DOI: 10.1200/JCO.2010.28.1386.
- Результаты исследования по применению комбинации антиангиогенных препаратов TI-118 для больных раком поджелудочной железы, которые начинают лечение гемцитабином. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01509911>.
- Chen H., Tsai C., Hung W. Foretinib inhibits angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor growth of pancreatic cancer in vivo by decreasing VEGFR-2/3 and TIE-2 signaling. *Oncotarget*

- 2015;6:14940–52. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3613>.
30. Philip P., Benedetti J., Corless C. et al. Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *J Clin Oncol* 2010;28:3605–10. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.7550.
 31. Mendelsohn J. Personalizing oncology: perspectives and prospects. *J Clin Oncol* 2013;31(15):1904–11. DOI: 10.1200/JCO.2012.45.3605.
 32. Результаты исследования по применению Нимотузумаба в сочетании с гемцитабином при местнораспространенном и метастатическом раке поджелудочной железы дикого типа K-RAS. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02395016>.
 33. Pollak M., Scherhammer E., Hankinson S. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004;4(7):505–18. DOI: 10.1038/nrc1387.
 34. Результаты исследования по применению гемцитабина и AMG 479 при метастатической аденокарциноме поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01231347>.
 35. Urtasun N., Vidal-Pla A., Pérez-Torras S., Mazo A. Human pancreatic cancer stem cells are sensitive to dual inhibition of IGF-IR and ErbB receptors. *BMC Cancer* 2015;15:223. DOI: 10.1186/s12885-015-1249-2.
 36. Ioannou N., Dalgleish A., Seddon A. et al. Anti-tumour activity of afatinib, an irreversible ErbB family blocker, in human pancreatic tumour cells. *Br J Cancer* 2011;105(10):1554–62. DOI: 10.1038/bjc.2011.396.
 37. Haluska P., Carboni J.M., TenEyck C. et al. HER receptor signaling confers resistance to the insulin-like growth factor-I receptor inhibitor, BMS-536924. *Mol Cancer Ther* 2008;7(9):2589–98. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0493.
 38. Lu Y., Zi X., Zhao Y., Pollak M. Overexpression of ErbB2 receptor inhibits IGF-I-induced Shc-MAPK signaling pathway in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313(3):709–15. DOI: 10.1016/j.bbrc.2003.12.007.
 39. Cox A. D., Feskis S.W., Kimmelman A.C. et al. Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:828–51. DOI: 10.1038/nrd4389.
 40. Dang C.V., Reddy E.P., Shokat K. M., Soucek L. Drugging the “undruggable” cancer targets. *Nat Rev Cancer* 2017;17:502–8. DOI: 10.1038/nrc.2017.36.
 41. McCormick F. c-Raf in KRas mutant cancers: A moving target. *Canc Cell* 2018;33:158–9. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.01.017.
 42. Yoshiro Niitsu, Yasushi Sato, Kunihiro Takamashi et al. A CRAF/glutathione-S-transferase P1 complex sustains autocrine growth of cancers with KRAS and BRAF mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117(32):19435–45. DOI: 10.1073/pnas.2000361117.
 43. Willems L., Tamburini J., Chapuis N. et al. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. *Curr Oncol Rep* 2012;14:129–38. DOI: 10.1007/s11912-012-0227-y.
 44. Schlieman M.G., Fahy B.N., Ramsamooj R. et al. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* 2003;89:2110–5. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601396.
 45. Asano T., Yao Y., Zhu J. et al. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2004;23:8571–80. DOI: 10.1038/sj.onc.1207902.
 46. Результаты исследования по оценке безопасности и эффективности RX-0201 плюс гемцитабин при метастатическом раке поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01028495>.
 47. Результаты исследования по применению BKM120 + mFOLFOX6 при терапии рака поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01571024>.
 48. Matsuzaki T., Yashiro M., Kaizaki R. et al. Synergistic antiproliferative effect of mTOR inhibitors in combination with 5-fluorouracil in scirrhous gastric cancer. *Cancer Sci* 2009;100:2402–10. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01315.x.
 49. Kordes S., Klumpen H.J., Weterman M.J. et al. Phase II study of capecitabine and the oral mTOR inhibitor everolimus in patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:1135–41. DOI: 10.1007/s00280-015-2730-y.
 50. Llovet J.M., Ricci S., Mazzaferro V. et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008;359:378–90. DOI: 10.1056/NEJMoa0708857.
 51. Результаты исследования по применению Сорафениба и Эверолимуса при лечении пациентов с прогрессирующими солидными опухолями и метастатическим раком поджелудочной железы, которые не реагируют на гемцитабин. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00981162>.
 52. Результаты исследования по применению Метформина в сочетании с химиотерапией рака поджелудочной железы (GEM). Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01210911>.
 53. Результаты II фазы исследования 5-ФУ, оксалиплатина плюс дазатиниба при метастатической аденокарциноме поджелудочной железы (ФОЛФОКС-Д). Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01652976>.
 54. Thomas S., Brugge J. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:513–609. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.13.1.513>.
 55. Jiatani S.S., Baker S.J., Silverman L.R., Reddy E.P. Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies. *Genes Cancer* 2010;1:979–93. DOI: 10.1177/1947601910397187.
 56. Seidel H.M., Lamb P., Rosen J. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. *Oncogene* 2000;19:2645–56. DOI: 10.1038/sj.onc.1203550.
 57. Результаты исследования по применению Руксолитиниба, получаемого с химиотерапией у пациентов с прогрессирующими солидными опухолями. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01822756>.
 58. Результаты исследования по применению Олапариба при мутировавшем раке поджелудочной железы gBRCA, заболевание которого не прогрессировало на первой линии платиновой химиотерапии (POLO). Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02184195>.
 59. Pancreatic Adenocarcinoma. NCCN Guidelines Version 1, 2020. Pp. 34–46.
 60. Franck C., Müller C., Rosania R. et al. Advanced Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Moving Forward. *Cancers (Basel)* 2020;12(7):1955. DOI: 10.3390/cancers12071955.
 61. Maloney E., Khokhlova T., Pillarisetty V. et al. Focused ultrasound for immunoadjuvant treatment of pancreatic cancer: an emerging clinical paradigm in the era of personalized oncotherapy. *Int Rev Immunol* 2017;36(6): 338–51. DOI: 10.1080/08830185.2017.1363199.
 62. Lutz E., Yeo C.J., Lillemo K.D. et al. A lethally irradiated allogeneic granulocyte-macrophage colony stimulating factor-secreting tumor vaccine for pancreatic adenocarcinoma. A Phase II trial of safety, efficacy, and immune activation. *Ann Surg* 2011;253(2):328–35. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3181fd271c.
 63. Pishvaian M., Blais E., Jonathan R. Overall survival in patients with pancreatic cancer receiving matched

- therapies following molecular profiling: a retrospective analysis of the Know Your Tumor registry trial. *The Lancet Oncology* 2020;21(4):508–18. DOI: 10.1016/S1470-2045(20)30074-7.
64. Результаты исследования по оценке безопасности и эффективности комбинированной вакцины против поджелудочной железы Listeria/GVAX при раке поджелудочной железы (ECLIPSE). Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02004262>.
65. Le D., Picozzi V., Ko A. et al. Results from a Phase IIb, Randomized, Multicenter Study of GVAX Pancreas and CRS-207 Compared with Chemotherapy in Adults with Previously Treated Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma (ECLIPSE Study). *Clin Cancer Res* 2019;25(18):5493–502. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2992.
66. Результаты исследования по применению CRS-207, ниволумаба и ипилимумаба с вакциной против рака поджелудочной железы GVAX или без нее (с Су) у пациентов с раком поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03190265>.
67. Результаты исследования по применению эпикадостата, пембролизумаба и CRS-207, с или без Су/GVAX у пациентов с метастатическим раком поджелудочной железы. Available by: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03006302>.
68. Lili L., Matyunina L., Walker L. et al. Evidence for the importance of personalized molecular profiling in pancreatic cancer. *Pancreas* 2014;43:198–211. DOI: 10.1097/MPA.000000000000020.

Вклад авторов

Е.А. Быкова: разработка дизайна исследования, анализ литературы, написание текста рукописи, обзор публикаций по теме статьи; Н.А. Фалалеева, Л.Ю. Гривцова: разработка дизайна исследования.

Authors' contributions

E.A. Bykova: developing the research design, analysis of the obtained data, writing the manuscript, reviewing publications on the topic; N.A. Falaleeva, L.Yu. Grivtsova: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

Е.А. Быкова / E.A. Bykova: <https://orcid.org/0000-0001-8218-6774>
 Н.А. Фалалеева / N.A. Falaleeva: <https://orcid.org/0000-0002-0023-4216>
 Л.Ю. Гривцова / L.Yu. Grivtsova: <https://orcid.org/0000-0001-9103-9688>

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: 14.11.2019. Принята к публикации: 22.10.2020

Article submitted: 14.11.2019. Accepted for publication: 22.10.2020

РОЛЬ ГЕПСИДИНА 25 В РАЗВИТИИ АНЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА, АССОЦИИРОВАННОГО СО ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

М.Н. Хагажеева, А.В. Снеговой, В.Н. Блиндарь, Д.А. Рябчиков, М.М. Добровольская, И.Б. Кононенко, А.М. Келеметов, А.М. Казаков, О.В. Пальчинская

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

Контакты: Мадина Назировна Хагажеева Khagazheeva.madina@mail.ru

Анемический синдром (АС) — частое осложнение онкологических заболеваний, которое ухудшает результаты лечения и снижает качество жизни пациентов. Обзор литературы посвящен роли пептидного гормона гепсидина 25 (ГП25), регулирующего системный и локальный гомеостаз железа, в развитии анемии. Основная биологическая функция ГП25 — снижение уровня железа в кровеносном русле — реализуется через снижение мобилизации железа из депо и уменьшение абсорбции железа в кишечнике. Современные подходы к диагностике и терапии АС при онкологических заболеваниях обязательно включают оценку уровня ГП25. Показано, что ГП25 участвует в патогенезе анемии при злокачественных новообразованиях. Онкологические заболевания часто сопровождаются высоким уровнем провоспалительных цитокинов, в частности интерлейкина 6 (IL-6), который вызывает повышение продукции ГП25. Под воздействием IL-6 ГП25 блокирует ферропортины и высвобождение железа макрофагами, что приводит к развитию функционального дефицита железа и железодефицитному эритропоэзу, таким образом, при длительном воздействии провоспалительных цитокинов развивается анемия хронического заболевания. Лечение АС, ассоциированного со злокачественными новообразованиями, является сложной задачей. Терапевтическое воздействие на ГП25 и IL-6 — многообещающая перспектива для коррекции анемии онкологических больных. Новые стратегии в патогенетической терапии пациентов с анемией связаны с применением антигепсидиновых препаратов, снижающих уровень ГП25 в крови. Однако в некоторых исследованиях показано, что увеличение содержания железа в кровеносном русле увеличивает его доступность для опухоли и способствует ее росту, поэтому необходимо дальнейшее более глубокое изучение проблемы коррекции АС у онкологических больных.

Ключевые слова: онкологические больные, анемия, интерлейкин 6, гепсидин 25

Для цитирования: Хагажеева М.Н., Снеговой А.В., Блиндарь В.Н. и др. Роль гепсидина 25 в развитии анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными заболеваниями. Российский биотерапевтический журнал 2020; 19(4):29–34.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-29-34



THE ROLE OF HEPcidIN 25 IN THE DEVELOPMENT OF ANEMIC SYNDROME ASSOCIATED WITH MALIGNANT DISEASES

M.N. Khagazheeva, A.V. Snegovoy, V.N. Blindar, D.A. Ryabchikov, M.M. Dobrovol'skaya, I.B. Kononenko, A.M. Kelemetov, A.M. Kazakov, O.V. Palchinskaya

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

Anemic syndrome (AC) is a frequent complication of cancer that gives poor results of treatment and reduces quality of life of patients. The literature review is devoted to the role of the peptide hormone hepcidin 25 (HP25), which regulates systemic and local iron homeostasis, in the development of anemia. The main biological function of HP25 is to reduce the level of iron in the bloodstream, which realizes a decrease of the mobilization of iron from the depot and a decrease of absorption of iron in the intestine. Modern approaches to the diagnosis and treatment of anemic disease in oncological practice necessarily include an assessment of the level of HP25. It was shown that HP25 is involved in the pathogenesis of anemia in malignant neoplasms. Oncological diseases are often accompanied by high levels of pro-inflammatory cytokines, in particular interleukin-6 (IL-6), which causes an increase in the production of HP25. Under the influence of IL-6, HP25 blocks ferroportins and iron release by macrophages, which leads to the development of functional iron deficiency and iron deficiency erythropoiesis, thus, with prolonged exposure to pro-inflammatory cytokines, anemia of chronic disease develops. The treatment of AC associated with malignant neoplasms is a complex procedure. Therapeutic effect on HP25 and IL-6 is a promising prospect for the correction of anemia in cancer patients. New strategies in the pathogenetic therapy of patients with anemia are associated with the use of antihepcidin drugs that reduce the level of HP25 in the blood. However, some studies have shown that an increase

in the iron content in the bloodstream increases its accessibility to the tumor and promotes its growth; therefore, further, more in-depth study of the problem of correcting AC in cancer patients is necessary.

Key words: cancer patients, anemia, interleukin-6, hepcidin 25

For citation: Khagazheeva M. N., Snegovoy A. V., Blindar V. N. et al. The role of hepcidin 25 in the development of anemic syndrome associated with malignant diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):29–34. (In Russ.).

Введение

Анемия является наиболее часто встречающимся осложнением злокачественных заболеваний. В среднем анемия различной степени тяжести встречается в 30–90 % случаев злокачественных новообразований [1]. Данное осложнение не только ухудшает результаты лечения и, как следствие, снижает общую выживаемость, но и снижает качество жизни пациентов, уменьшает приверженность лечению [2]. Широкий спектр проблем, связанных с анемическим синдромом (АС) и осложняющих лечение онкологического заболевания, делает задачу диагностики и эффективного лечения АС чрезвычайно востребованной и актуальной.

Одним из наиболее современных подходов к диагностике и терапии АС при онкологических заболеваниях является оценка уровня и терапевтическое воздействие на гепсидин 25 (ГП25) — секретируемый печенью пептидный гормон, который регулирует системный и локальный гомеостаз железа [3]. Оценка уровня ГП25 и воздействие на него играют роль при так называемой цитокининдуцированной анемии онкологических больных, не связанной с кровопотерей, поражением костного мозга или побочными эффектами химиотерапевтического лечения. Терапевтическое воздействие на ГП25 — многообещающая перспектива для коррекции этих патологических состояний. Существует несколько подходов, позволяющих увеличить или уменьшить эффекты ГП25, на основе которых разрабатывается ряд препаратов, способных влиять на уровень ГП25.

Анемический синдром при злокачественных новообразованиях

Анемия — это клинико-гематологический синдром, характеризующийся снижением концентрации гемоглобина (менее 130 г/л у мужчин и 120 г/л у женщин) и гематокрита (менее 39 % у мужчин и 36 % у женщин), обычно сопровождающийся снижением количества красных кровяных телец (эритроцитов), а также характерными клиническими симптомами. При онкологических заболеваниях, как и при других заболеваниях, анемия может различаться по этиологии. Выделяют анемию вследствие кровопотери (хронической или острой), анемию вследствие снижения эритропоэза — микроцитарную (железодефицитная и др.), нормоцитарную (апластическая), макроцитарную (дефицит витамина В₁₂ и фолатов), а также

гемолитические анемии (наследственные и приобретенные) [4].

Большинство видов анемии при онкологических заболеваниях, как правило, имеют четкую причину возникновения — кровотечение вследствие распада опухоли, являющееся причиной кровопотери, или опухолевое поражение желудка с нарушением выработки фактора Кастла, приводящее к В₁₂-дефицитной анемии. Железодефицитная анемия (ЖДА) является состоянием более разнообразным, с большим количеством этиологических и патогенетических звеньев, связанных с метаболизмом железа, и может встречаться при абсолютно любых формах злокачественных новообразований [5].

В настоящее время в клинической практике выделяют 3 железодефицитных синдрома: 1) абсолютный дефицит железа (АДЖ); 2) железодефицитный эритропоэз, который развивается в начальной стадии анемии хронического заболевания (АХЗ); 3) функциональный, или перераспределительный, дефицит железа (ФДЖ), связанный с депонированием и блокировкой железа в макрофагах на фоне цитокиновой дисрегуляции. АДЖ чаще ассоциируется с ЖДА. Но АДЖ также может развиваться при лечении рекомбинантными эритропоэтинами (ЭПО), витаминами В₁₂, фолиевой кислотой, при гемолитическом кризе, когда истощается запас железа в организме за счет усиленной стимуляции эритропоэза. Мы не согласны с рядом авторов, которые характеризуют это как ФДЖ. ФДЖ называют ситуацию, когда, несмотря на достаточные его запасы в депо, эритропоэз неадекватно обеспечивается железом.

Роль гепсидина 25 в развитии анемии

Кодированный геном *HAMP* в хромосоме 19 ГП25 синтезируется как пропептид, состоящий из 84 аминокислот [6]. В кровоток ГП25 секретируется в виде биоактивного пептидного гормона, состоящего из 25 аминокислот [6–8]. Данный гормон был впервые обнаружен и описан в 2001 г. как антибактериальный пептид (Hepcidin Antimicrobial Peptide), способный повреждать мембрану бактерий. Впоследствии установлено, что ГП25 является отрицательным регулятором абсорбции железа в кишечнике и его мобилизации из депо, тем самым выполняя свою основную биологическую функцию — снижение уровня железа в кровеносном русле [7, 8].

Гепсидин 25 индуцирует деградацию ферропортина, основного клеточного транспортера железа. Избыток ГП25 блокирует экспорт железа из клеток, таких как макрофаги и энтероциты. ГП25 также негативно регулируется эритропоэтическими сигнальными путями. В настоящее время считают, что предшественники эритроцитов продуцируют эритроферрон (ERFE) в ответ на ЭПО. ERFE затем выступает посредником снижения уровня ГП25 в гепатоцитах через неизвестные пути. К другим факторам, которые могут контролировать экспрессию ГП25 в печени, относятся гормоны, факторы роста, гепарины и ЭПО. Наряду с тем, что уровень ГП25 контролируется ЭПО, низкие концентрации кислорода также приводят к уменьшению синтеза ГП25. Известно, что в условиях низкого уровня кислорода стимулируется продукция эритроцитов, что приводит к повышенному спросу на железо [9].

Следует отметить, что у онкологических больных источником ГП25 могут быть сами опухолевые клетки. Повышенная экспрессия ГП25 в периферической крови при злокачественных новообразованиях сопровождается увеличением локальной мРНК опухолевых клеток. В свою очередь, ГП25 предотвращает экспорт железа посредством деградации ферропортина и увеличивает пул железа в опухолевых клетках, помогая им выживать и размножаться [10].

Дефицит ГП25 связан с такими заболеваниями, как β -талассемия и врожденная дизэритропоэтическая анемия, при которой и перегрузка железом, и анемия могут присутствовать одновременно [11, 12]. Эти комплексные заболевания характеризуются неэффективным эритропоэзом из-за преждевременного апоптоза эритроидных предшественников [13]. Отсутствие зрелых эритроцитов в кровотоке приводит к анемии и повышенному синтезу ЭПО с целью увеличить эритропоэз. В этих условиях синтез ГП25 подавляется факторами, секретируемыми эритроидными предшественниками, вероятно ERFE и/или GDF15 (growth differentiation factor 15) [14, 15].

По аналогии с наследственным гемохроматозом низкий уровень ГП25, в свою очередь, приводит к чрезмерному поглощению организмом железа и перегрузке данным микроэлементом [16]. Лечение пациентов с солидными опухолями включает гемотрансфузии и/или применение хелаторов железа. У пациентов, получавших переливание крови, анемия умеренно корректируется, уровень ГП25 может частично нормализоваться также из-за снижения интенсивности эритропоэза. Применение хелаторов железа может скорректировать перегрузку железом, однако данный вид лечения обладает рядом неблагоприятных побочных эффектов.

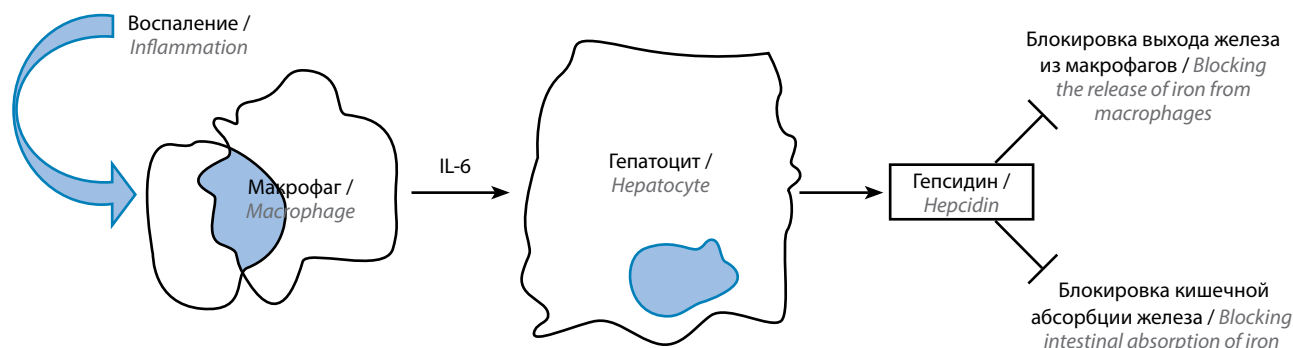
Существуют обратные ситуации, когда анемии возникают в результате избыточной продукции ГП25

и сопровождаются низким уровнем железа. Наиболее распространенная причина повышенного ГП25 — воспаление, связанное с хроническим заболеванием, которое может привести к развитию АХЗ. АХЗ наблюдается при широком спектре хронических заболеваний, включая болезни почек, травмы, инфекционные, злокачественные, ревматологические, а также воспалительные заболевания различного генеза [17]. Этиотропная терапия — предпочтительный вариант лечения АХЗ, но этот вариант не всегда доступен. Кроме того, существуют 2 редкие причины повышенного уровня синтеза ГП25 — ГП25-продуцирующие гепатомы и железорефрактерные железодефицитные анемии (последние характеризуются резистентностью к пероральной терапии железом и вызываются наследственными мутациями ингибитора ГП25 TMPRSS6 [18, 19]). Распространенность анемий, связанных с избытком ГП25, стимулировала изучение антагонистов ГП25.

Таким образом, уровень ГП25 является критически важным звеном в патогенезе анемии.

Влияние опухолевого процесса на уровень гепсидина 25

Одним из механизмов влияния злокачественного новообразования на уровень ГП25 и, как следствие, на развитие АС, является повышенный уровень интерлейкина 6 (IL-6). По данным литературы [20], на экспериментальных моделях и у добровольцев внутривенное введение IL-6 сопровождается повышением продукции ГП25 с последующим развитием гипoferремии и железодефицитного эритропоэза, а при длительном воздействии провоспалительных цитокинов развивается АХЗ. IL-6 играет важную роль в иммунном ответе, воспалении и гемопоэзе. IL-6 оказывает различное биологическое воздействие на клетки посредством связывания с трансмембранным рецептором IL-6, а также с растворимым рецептором IL-6. Нарушение регуляции продукции IL-6 отдельной популяцией клеток играет патологическую роль в различных воспалительных аутоиммунных заболеваниях. Кроме того, IL-6 участвует в развитии и прогрессии злокачественных новообразований. Высокие уровни циркулирующего IL-6 наблюдаются почти при всех типах рака и являются негативными предикторами [21]. Уровни IL-6 отрицательно коррелируют с уровнями гемоглобина у больных с распространенным эпителиальным раком яичников, раком молочной железы, раком тела матки и др. [22]. Имеются прямые доказательства того, что лечение рекомбинантным человеческим IL-6 (rhIL-6) в качестве противоопухолевой иммунотерапии вызывает анемию у онкологических больных и что эта анемия обратима после прекращения лечения rhIL-6 [23]. Под воздействием IL-6 ГП25 блокирует ферропортины



Регуляция продукции гепсидина при воспалении [24]

Regulation of hepcidin production in inflammation [24]

и высвобождение железа макрофагами (см. рисунок). Развивается ФДЖ. В периферической крови появляются эритроциты с низким объемом и гипохромией.

Такая же морфологическая картина отмечается при ЖДА, поэтому необходим дифференциально-диагностический критерий выявления АС с ФДЖ. Одним из таких критериев может быть определение ГП25 в комплексе с IL-6 [25]. Однако уровень IL-6 не всегда повышается при онкологическом заболевании и связан с гистологией опухоли, а также интенсивностью воспалительных реакций в организме, которая различается при ранних и распространенных стадиях опухолевого процесса. Выраженность воспаления значительно увеличивается при распространенном раке по сравнению с ранними стадиями заболевания [26].

Лечение АС, ассоциированного со злокачественными новообразованиями, представляет сложную задачу. Достижения в понимании патофизиологии АС позволили определить основные подходы к терапии: лечение основного заболевания, использование агентов, усиливающих эритропоэз (рекомбинантные ЭПО) и улучшающих доступность железа. Недавно в клинической практике появился новый препарат для внутривенного введения — железа карбоксималтозат (феринжент), показавший высокую эффективность как в комбинации с ЭПО, так и в монорежиме. Считают, что феринжент обладает хорошей переносимостью и минимальным риском развития аллергических реакций. Однако стратегию лечения в перспективе связывают с применением антагонистов ГП25 — с целью преодоления задержки железа в ретикулоэндотелиальной системе, а также гормонов или цитокинов — для эффективной стимуляции эритропоэза при хроническом воспалении. При АС, часто устойчивом к терапии ЭПО, подавление ГП25 может привести к выходу депонированного в макрофагах железа и, соответственно, нормализации уровня гемоглобина. В настоящее время проводится изучение новых лекарственных средств, мишенью которых являются основные патогенетические звенья АС,

в частности цитокины, это корректоры ветви IL-6—ГП25—ферропортин. В эксперименте [27] показано воздействие рекомбинантного ГП25 на кроветворение. В другом эксперименте [28] антитела к рецептору IL-6 способствовали снижению выработки ГП25 и нормализации кроветворения. Большая часть разработок находится в стадии экспериментальных исследований, однако некоторые — на разных стадиях клинических испытаний [27, 28]. Новые стратегии в патогенетической терапии больных с анемией при хронических болезнях и опухолях связаны с применением антигепсидиновых препаратов, представленных антителами к гормону, ингибиторами и блокаторами его экспрессии, включая ERFЕ, гормон эритробластов [25, 27, 28].

Перспективы и актуальные вопросы применения модуляторов гепсидина 25

Содержание железа имеет критически важное значение для нормального функционирования клеток. ГП25 благодаря контролю ферропортина, поставляющего железо внутрь клетки, регулирует потребление железа, поступающего с пищей и поступающего из макрофагов. Дисрегуляция ГП25 вызывает патологические нарушения из-за измененного уровня железа в крови. Примеры расстройств, связанных с неадекватным синтезом ГП25, включают наследственный гемохроматоз и анемию. Лечение этих расстройств в настоящий момент остается недостаточно эффективным, что требует изучения препаратов, воздействующих на ГП25. Один из подходов — использование агонистов ГП25, таких как минигепсидины, которые действуют как миметики ГП25. Ранние результаты их изучения показывают, что минигепсидины могут обеспечить эффективную стратегию лечения нарушений, связанных с перегрузкой железом. Это небольшие пептиды, которые легче синтезировать, чем полноразмерный ГП25, они поддерживают функциональную деградацию ферропортина в моделях на животных. Также значительный интерес представляет изучение антагонистов ГП25, некоторые

из которых уже одобрены для клинического применения по другим показаниям. Например, силтуксимаб и тоцилизумаб являются одобренными FDA (Food and Drug Administration) ингибиторами передачи IL-6, которые снижают уровень ГП25 и увеличивают уровень гемоглобина у пациентов с мультицентрической болезнью Кастлемана или с артритом [29]. Изменение показаний для применения этих лекарств может ускорить путь к эффективному лечению АХЗ у пациентов, которым ингибиторы IL-6 назначаются также для лечения основного заболевания. Однако ингибиторы IL-6 обладают плеiotропным действием и, возможно, рядом нежелательных эффектов. Следовательно, более точное вмешательство в функцию ГП25 может дать терапевтические преимущества. Наиболее клинически изученный функциональный антагонист ГП25 NOX-H94 повышал уровень гемоглобина у 43 % пациентов на пилотной фазе клинических исследований 2а. Развитие этого класса препаратов может быть особенно важным для длительного лечения АХЗ. Модуляция ГП25 обещает обнадеживающие клинические перспективы [30]. Различие между системным и опухолевым уровнем железа может также представлять собой проблему для лечения больных раком с АХЗ. Онкологические больные часто страдают от АХЗ в результате воспаления и/или химиотерапии, что выражается в высоком уровне циркулирующего ГП25, и, таким образом, являются потенциальными кандидатами

для терапии антагонистами ГП25. Однако несколько исследований показали, что увеличение уровня железа в опухолях способствует росту опухоли, поэтому необходимо дальнейшее более глубокое изучение данной проблемы [31].

Заключение

С момента открытия ГП25 в 2001 г. активно развивались стратегии, направленные на коррекцию его избытка или дефицита, причем несколько препаратов уже проходят клинические испытания и многие другие находятся на этапе доклинических исследований. Хотя роль ГП25 в стимуляции роста раковых клеток еще изучается, известно, что уровень ГП25 оказывается повышенным при ряде онкологических заболеваний. Использование антагонистов гепсидина для снижения деградации ферропортина в опухолевых клетках увеличивает отток железа и потенциально уменьшает рост опухоли, что, возможно, является новым направлением применения модуляторов ГП25. Однако, как обсуждалось выше, антагонисты ГП25 могут повышать уровень системного железа, возможно, увеличивая доступность железа для роста опухоли и, наоборот, противодействуя эффекту повышенного оттока железа в опухоли, и этот подход нуждается в дополнительных исследованиях. Таким образом, важным аспектом решения проблемы АС при злокачественных новообразованиях является понимание причин дисрегуляции ГП25 в опухолевых клетках.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Knight K., Wade S., Balducci L. Prevalence and outcomes of anemia in cancer: a systematic review of the literature. *Am J Med* 2004;116(Suppl 7A):11S–26S. DOI: 10.1016/j.amjmed.2003.12.008.
2. Aapro M., Beguin Y., Bokemeyer C. et al. Management of anaemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2018;29(Suppl 4):iv96–iv110. DOI: 10.1093/annonc/mdx758.
3. Nicolae C.D., Coman O.A., Ene C. et al. Heparin in neoplastic disease. *J Med Life* 2013;6(3):355–60. PMID: 24146699.
4. Chaparro C.M., Suchdev P.S. Anemia epidemiology, pathophysiology, and etiology in low- and middle-income countries. *Ann N Y Acad Sci* 2019;1450(1):15–31. DOI: 10.1111/nyas.14092.
5. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В. и др. Разработка стратегических подходов к современной диагностике анемического синдрома у больных раком молочной железы. Клиническая лабораторная диагностика 2019;64(4):210–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-4-210-215. [Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V. et al. The development of the strategic approaches to modern diagnosis of anemic syndrome in patients with breast cancer. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* = Russian Clinical Laboratory Diagnostics 2019;64(4):210–5. (In Russ.)].
6. Krause A., Neitz S., Magert H.J. et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480(2–3):147–50. DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01920-7.
7. Park C.H., Valore E.V., Waring A.J. et al. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276(11):7806–10. DOI: 10.1074/jbc.M008922200.
8. Pigeon C., Ilyin G., Courselaud B. et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001;276(11):7811–9. DOI: 10.1074/jbc.M008923200.
9. Haase V.H. Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010;299(1):1–13. DOI: 10.1152/ajprenal.00174.2010.
10. Tesfay L., Clausen K.A., Kim J.W. et al. Heparin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. *Cancer Res* 2015;75:2254–63. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2465.
11. Pippard M.J., Callender S.T., Warner G.T. et al. Iron absorption and loading in beta-thalassaemia intermedia. *Lancet* 1979;2(8147):819–21.
12. Iolascon A., Esposito M.R., Russo R. Clinical aspects and pathogenesis of congenital dyserythropoietic anemias: from morphology to molecular approach. *Haematologica* 2012;97(12):1786–94. DOI: 10.3324/haematol.2012.072207.
13. Pootrakul P., Sirankapracha P., Hemsorach S. et al. A correlation

- of erythrokinetics, ineffective erythropoiesis, and erythroid precursor apoptosis in Thai patients with thalassemia. *Blood* 2000;96(7):2606–12.
14. Tanno T., Bhanu N.V., Oneal P.A. et al. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med* 2007;13(9): 1096–101. DOI: 10.1038/nm1629.
 15. Kautz L., Jung G., Valore E.V. et al. Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat Genet* 2014;46(7):678–84. DOI: 10.1038/ng.2996.
 16. Origa R., Galanello R., Ganz T. et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica* 2007;92(5):583–8. DOI: 10.3324/haematol.10842.
 17. Roy C.N. Anemia of inflammation. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2010;2010:276–80. DOI: 10.1182/asheducation-2010.1.276.
 18. Chung A., Leo K., Wong G. et al. Giant hepatocellular adenoma presenting with chronic iron deficiency anemia. *Am J Gastroenterol* 2006;101(9):2160–2. DOI: 10.1111/j.1572-0241.2006.00607.x.
 19. Finberg K.E., Heeney M.M., Campagna D.R. et al. Mutations in Tmprss6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet* 2008;40(5): 569–71. DOI: 10.1038/ng.130.
 20. Sasu B.J., Cooke K.S., Arvedson T.L. et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010;115(17):3616–24. DOI: 10.1182/blood-2009-09-245977.
 21. Hong D.S., Angelo L.S., Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* 2007;110(9):1911–28. DOI: 10.1002/cncr.22999.
 22. Maccio A., Madeddu C., Massa D. et al. Hemoglobin levels correlate with interleukin-6 levels in patients with advanced untreated epithelial ovarian cancer: role of inflammation in cancer-related anemia. *Blood* 2005;106(1):362–7. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0160.
 23. Nieken J., Mulder N.H., Buter J. et al. Recombinant human interleukin-6 induces a rapid and reversible anemia in cancer patients. *Blood* 1995;86(3):900–5.
 24. Nemeth E., Rivera S., Gabayan V. et al. IL-6 mediates hypo-ferramia inducing synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Inv* 2004;113(9):1271–6. DOI: 10.1172/JCI20945.
 25. Noguchi-Sasaki M., Sasaki Y., Shimonaka Y. et al. Treatment with anti-IL-6 receptor antibody prevented increase in serum hepcidin levels and improved anemia in mice inoculated with IL-6-producing lung carcinoma cells. *BMC Cancer* 2016;16:270. DOI: 10.1186/s12885-016-2305-2.
 26. Coussens L.M., Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860–7. DOI: 10.1038/nature01322.
 27. Sasu B.J., Cooke K.S., Arvedson T.L. et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010;115(17):3616–24. DOI: 10.1182/blood-2009-09-245977.
 28. Vadhan-Raj S., Abonour R., Goldman J.W. et al. A first-in-human phase I study of a hepcidin monoclonal antibody, LY2787106, in cancer-associated anemia. *Journal of Hematology Oncology* 2017;10(73):1–12. DOI: 10.1186/s13045-017-0427-x.
 29. Kurzrock R., Voorhees P.M., Casper C. et al. A phase I, open-label study of siltuximab, an anti-IL-6 monoclonal antibody, in patients with B-cell non-Hodgkin lymphoma, multiple myeloma, or Castleman disease. *Clin Cancer Res* 2013;19(13):3659–70. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3349.
 30. Pinnix Z.K., Miller L.D., Wang W. et al. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. *Sci Transl Med* 2010;2(43):43ra56. DOI: 10.1126/scisignal.3001127.
 31. Zhang S., Chen Y., Guo W. et al. Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cell Signal* 2014;26(11):2539–50. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.029.

Вклад авторов

М.Н. Хагажеева: написание рукописи, обзор публикаций, обобщение материала обзора;

А.В. Снеговой, В.Н. Блиндарь: обобщение материала обзора, анализ рукописи;

Д.А. Рябчиков, М.М. Добровольская, И.Б. Кононенко, А.М. Келеметов, А.М. Казаков, О.В. Пальчинская: обзор публикаций.

Author's contribution

M.N. Khagazheeva: writing the manuscript, review of publications, generalization of the review material;

A.V. Snegovoy, V.N. Blindar: generalization of the review material, analysis of the manuscript;

D.A. Ryabchikov, M.M. Dobrovolskaya, I.B. Kononenko, A.M. Kelemetov, A.M. Kazakov, O.V. Palchinskaya: review of publications.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.Н. Хагажеева/M.N. Khagazheeva: <https://orcid.org/0000-0002-3744-6802>

А.В. Снеговой/A.V. Snegovoy: <https://orcid.org/0000-0002-0170-5681>

В.Н. Блиндарь/V.N. Blindar: <https://orcid.org/0000-0002-4630-4988>

М.М. Добровольская/M.M. Dobrovolskaya: <https://orcid.org/0000-0002-8889-5384>

Д.А. Рябчиков/D.A. Ryabchikov: <https://orcid.org/0000-0003-2670-2361>

И.Б. Кононенко/I.B. Kononenko: <https://orcid.org/0000-0002-7142-2986>

А.М. Келеметов/A.M. Kelemetov: <https://orcid.org/0000-0002-3444-6802>

А.М. Казаков/A.M. Kazakov: <https://orcid.org/0000-0002-9534-2729>

О.В. Пальчинская/O.V. Palchinskaya: <https://orcid.org/0000-0002-7142-2986>

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 study had no sponsor support.

Статья поступила: 05.10.2020. Принята к публикации: 22.10.2020.

Article submitted: 05.10.2020. Accepted for publication: 22.10.2020.

ИЗЫСКАНИЕ ФИТОАДАПТОГЕНОВ И ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФИТОКОМПОЗИЦИЙ

О.А. Бочарова¹, Р.В. Карпова¹, Е.В. Бочаров¹, А.А. Вершинская¹, М.А. Барышникова¹, И.В. Казеев¹,
В.Г. Кучеряну², М.В. Киселевский¹, В.Б. Матвеев¹

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

Классические фитоадаптогены (женьшень настоящий, родиола розовая, аралия маньчжурская, заманиха высокая, элеутерококк колючий, левзея сафлоровидная, лимонник китайский) обладают комплексным защитным действием на организм, в том числе повышают его противоопухолевую устойчивость. Однако к отдельным адаптогенам может развиваться резистентность. Поэтому актуальными и научно значимыми являются исследования многокомпонентных фитоадаптогенных комплексов, основанных на принципе рационального сочетания взаимодополняющих по действию биологически активных веществ. Применение нескольких адаптогенов в составе одной фитоформулы позволяет воздействовать на организм, не вызывая привыкания. В обзоре представлены отечественные и зарубежные исследования, посвященные поиску потенциальных фитоадаптогенов, а также разработке комплексов на их основе. Показана возможность регуляции защитных систем организма компонентами фитоэкстрактов, имеющими разные точки приложения фармакологического действия. Обоснованы преимущества многокомпонентных фармкомпозиций по сравнению с отдельными адаптогенами и индивидуальными веществами. Обобщены результаты многогранного экспериментального изучения на моделях *in vitro* и *in vivo* отечественного комплексного фитоадаптогена. Продemonстрированы результаты его клинического применения в отношении доброкачественной опухоли, предракового заболевания, распространенного опухолевого процесса, нейродегенеративной патологии. Показана перспективность использования комплексных препаратов в составе интегративных методов терапии, в том числе онкологических и возрастных патологий.

Ключевые слова: фитоадаптогены, фитокомпозиция, комплексное действие, противоопухолевая активность, интегративная медицина

Для цитирования: Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитокомпозиций. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):35–44.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-35-44



RESEARCH OF NEW PHYTOADAPTOGENS AND POSSIBILITIES OF HERBAL FORMULAS APPLICATION

O.A. Bocharova¹, R.V. Karpova¹, E.V. Bocharov¹, A.A. Vershinskaya¹, M.A. Baryshnikova¹, I.V. Kazeev¹, V.G. Kucheryanu²,
M.V. Kiselevsky¹, V.B. Matveev¹

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

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

Classic phytoadaptogens (*Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*, *Aralia mandshurica*, *Oplopanax elatus*, *Eleutherococcus senticosus*, *Leuzea carthamoides*, *Schisandra chinensis*) have a complex protective effects, increasing the antitumor control of organisms. However, resistance to some adaptogens can develop. Therefore, the elaboration of multicomponent phytoadaptogen complexes based on the principle of a rational combination of complementary biologically active substances are relevant and scientifically significant. The use of several adaptogens in the herbal formula considers the absence of the organisms resistance. The review presents Russian and foreign studies devoted to the search for potential phytoadaptogens, as well as the development of complexes based on them. The possibility of regulating the protective systems of organism by components of phytoextracts with different points of pharmacological action has been shown. The advantages of multicomponent phytomixtures in comparison with individual adaptogens are substantiated. The many-sided experimental *in vitro* and *in vivo* investigations of Russian herbal formula are colligated. Its clinical application has been demonstrated in relation to a benign tumour, precancerous disease, advanced cancer process, and neurodegenerative pathology. The prospects of using the herbal formula preparations as a part of integrative medicine including oncological and age-related pathologies are shown.

Key words: phytoadaptogens, herbal formula, multi-targeted, anticancer, integrative medicine

For citation: Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Research of new phytoadaptogens and possibilities of herbal formulas application. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):35–44. (In Russ.).

Введение

Тысячелетиями в традиционной восточной медицине элеутерококк, женьшень, заманиху, лимонник и другие растения считали средствами, которые продлевают человеческую жизнь. Частота опухолеобразования и скорость старения популяции, как известно, связаны прямой зависимостью. Наряду с этим онкологическое заболевание можно расценивать как ускоренное старение клеток органа, поскольку главным механизмом развития опухоли и старения считают повреждение адгезионных взаимоотношений (отсюда нарушение дифференцировки тканей и в том и в другом случае) [1]. Поэтому использование геропротекторов в онкологии можно считать актуальным.

В начале 60-х годов XX в. ленинградский фармаколог профессор Н.В. Лазарев ввел в научную литературу понятие растительных адаптогенов, или фитоадаптогенов (ФА). Последние содержат биологически активные вещества (БАВ), которые имеют широкий диапазон фармакологических возможностей и минимальные побочные эффекты. Профессор И.И. Брехман, И.В. Дардымов и другие ученики Н.В. Лазарева одними из первых подвели научную базу под исследования лекарственных эндемичных растений, таких как женьшень настоящий, элеутерококк колючий, родиола розовая и др. [2]. Китайские, японские, корейские, американские, шведские и другие ученые стали последователями этого научного направления. Термин «адаптогены», введенный Н.В. Лазаревым, утвердился и в зарубежной литературе. В работах, появившихся с конца 90-х годов XX в., при использовании современных методических подходов удалось научно обосновать и детализировать исторические знания восточной медицины, расширив представления о фармакологических свойствах ФА [3, 4].

Фитоадаптогены оказывают многогранное протекторное действие на организм, повышая и его противоопухолевую устойчивость. Известны антистрессорные, иммуно- и гормонотропные, нейропротекторные и улучшающие когнитивные функции эффекты адаптогенов; способность синхронизировать биоритмы, улучшать сердечную деятельность. Поэтому ФА могут играть важную роль в профилактике онкологических заболеваний и геронтологии [5, 6].

Следует учесть, что адаптогенные эффекты присущи не только эндемичным (родиола розовая, аралия маньчжурская, женьшень настоящий, лимонник китайский и др.), но и ряду других растений. Ан-

тистрессорные, противоопухолевые и корректорные свойства были выявлены, в частности, у березы повислой (почки), сирени амурской, алоэ, подорожника большого, шлемника байкальского, сосны обыкновенной [7].

Отбор препаратов ФА ведется исходя из способности к подавлению опухолевых клеток напрямую, а также опосредованно, с помощью регуляторных систем организма, в том числе иммунной системы. Исключительно актуальны корректорные свойства ФА – усиление действия и снижение побочных эффектов химиолучевой терапии. Они включают кардио-, нейро-, иммунопротекторное, противорвотное, антиаллергическое, гормонотропное действие, нормализацию показателей периферической крови, ослабление кахексии, алопеции и др.

Учитывая многофункциональность печени, перспективное значение для онкологической профилактики приобретают поиск, изучение и применение растительных гепатопротекторов (в связи с широкими возможностями инициации неспецифических протекторных систем организма). Также актуальны в данном контексте растительные препараты для лечения желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (экстракты сушеницы болотной, девясилы высокого, облепихи и др.). Они используются в качестве защитных и регенерирующих средств при язвенной болезни желудка и кишечника. Применение мочегонных препаратов также является обоснованным в противоопухолевом лечении. Повышенное содержание водной среды, ионов калия и натрия является неотъемлемым свойством усиленно пролиферирующих опухолевых и характеристикой быстрорастущих тканей. Выведение из клеток основных участников биологических реакций снижает качество их существования, подавляет потенциальные возможности размножения клеток [8].

Таким образом, имеющие разные точки приложения фармакологического действия компоненты фитоэкстрактов могут регулировать протекторные системы организма. При этом более выраженными противоопухолевыми, антиметастатическими и корректорными свойствами обладают препараты с более высоким коэффициентом антистрессорной или адаптогенной активности [9].

Однако, как показала практика, некоторые адаптогены, несмотря на свои выдающиеся свойства и эффекты, обнаруженные в экспериментальных исследованиях, не нашли широкого применения

в клинической онкологии. Во-первых, действие отдельных адаптогенов эффективно примерно у 30 % пациентов, остальные пациенты остаются резистентными. Во-вторых, даже у этих 30 % пациентов через 3–4 мес вырабатывается толерантность к препарату, которую необходимо выявлять иммунологическим контролем индивидуальной чувствительности. Кроме того, проблема широкого применения адаптогенов заключается в отсутствии надежных методов стандартизации, что затрудняет их корректное дозирование в клинической практике.

Особенности характера воздействия мультифитоадаптогенов

Для решения задачи преодоления резистентности больного к отдельным ФА, а также с точки зрения перспективности сочетанных воздействий на разные звенья защитных систем организма несомненный интерес представляют многокомпонентные фитомикстуры, которые содержат сбалансированный комплекс БАВ. При составлении фитоформул используют принцип рационального сочетания взаимодополняющих по действию фитокомпонентов. При этом суммируются однонаправленные свойства, компенсируются или нейтрализуются неблагоприятные. Дублирование адаптогенов в составе 1 фитоформулы преследует цель, с одной стороны, воздействия на организм при разной индивидуальной чувствительности, а с другой — применения адаптогенов, обладающих различным сочетанием протекторных, регенерирующих и других регулирующих свойств. В то же время при составлении фитоформул можно добиться увеличения активности препарата. Действительно, применение экстракта элеутерококка в сочетании с желчегонными и гепатопротекторными фитопрепаратами в опытах на крысах, подвергаемых стрессорным воздействиям, приводило к более высокому адаптогенному эффекту, нежели применение одного элеутерококка [8]. Таким образом, составление фитокомплексов является научно обоснованным.

A.S. Chan и соавт. изучали противоопухолевое действие фармкомпозиции на основе 5 растительных компонентов: корня женьшеня обыкновенного (*Panax ginseng*), плодов лимонника китайского (*Schisandra chinensis*), боярышника колючего (*Crataegus oxyacantha* L.), зизифуса настоящего (*Ziziphus jujuba*), травы сои культурной (*Glycine Max*), сброженных пивными дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Применение фармкомпозиции способствовало торможению роста опухоли у иммунодефицитных nude-мышей на модели подкожных ксенографтов рака желудка (РЖ). При этом фитокомплекс активировал моноциты, индуцировал продукцию фактора некроза опухоли α и интерферона γ , блокировал сигнальные пути активации ядерного фактора транскрипции NF- κ B [10].

В составе китайской формулы Liang-Ge-San (LGS) представлены 6 растений, а именно: форзиция пониклая (*Forsythia suspensa*), ревень пальчатый (*Rheum palmatum*), шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis*), гардения жасминовидная (*Gardenia jasminoides*), солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis*), мята перечная (*Mentha haplocalyx*). *In vitro* воздействие LGS ингибировало пролиферацию и индуцировало апоптоз клеток рака носоглотки. Эффект проявлялся в зависимости от дозы и времени экспозиции. *In vivo* LGS препятствовал ангиогенезу опухолей носоглотки, подавляя индуцированную HIF-1 экспрессию VEGF [11–13].

Китайский состав Si-Jun-Zi (SJZ) включает тонизирующие растения, такие как колокольчик мелкоцветковый (*Codonopsis pilosula*), пория кокосовидная (*Poria cocos*), атрактилодес крупноголовый (*Atractylodes macrocephala*), солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.). SJZ в качестве иммуномодулятора применяется у пациентов с хроническими заболеваниями ЖКТ [14]. Вместе с тем SJZ считается в Китае традиционным противоопухолевым средством в отношении опухолей ЖКТ, в том числе колоректального рака, способным подавлять ангиогенез опухоли, ее инвазию и метастазирование [15]. SJZ повышал выживаемость, снижая частоту метастазирования у больных РЖ по сравнению с группой, которая принимала химиотерапию. Применение препарата SJZ восстанавливает клеточный и гуморальный иммунитет [16, 17].

Кроме того, китайские ученые разработали противоопухолевую фитокомпозицию из таких растений, как андрографис метельчатый (*Andrographis paniculata*), элеутерококк колючий (*Eleutherococcus senticosus*), камелия китайская (*Camellia sinensis*) и гедиотис диффузная (*Hedyotis diffusa*). Противоопухолевые эффекты оценивали на экспериментальной модели метастатического рака молочной железы (РМЖ) мышей. Результаты показали уменьшение метастазов в печени и легких после 4-недельного курса применения фитокомплекса, а также купирование опухолеиндуцированного остеолитического процесса. Объем костей леченых мышей был сравним с показателями контрольных здоровых животных без опухолей. При этом уровень интерлейкина 12 повышался, выживаемость мышей с метастатическим РМЖ возрастала. Более того, комбинированное использование фитокомплекса с доксорубицином повышало противоопухолевый эффект и выживаемость животных по сравнению с использованием доксорубицина в монорежиме. На основании физико-химических исследований выявлены основные химические соединения фитокомплекса: сирингин (элеутерозид В), асперулозид, эпигаллокатехин, андрографолид, дегидроандрографолид. Данный фитокомплекс продемонстрировал мультицелевую эффективность: противоопухолевое,

антиметастатическое и остеопротекторное действие в отношении РМЖ с метастазами в печень, легкие и кости на модели экспериментальных животных. Результаты проведенных доклинических исследований могут обеспечить разработку научно обоснованной адъювантной терапии метастатического РМЖ [18].

Китайская фармкомпозиция ZYD88, включающая корневище и корень ревеня лекарственного (*Rheum officinale*), плоды бруцеи яванской (*Brucea javanica*), плоды софоры японской (*Sophora japonica* L.), клубень хохлатки полой (*Corydalis cava*), корень кровохлебки лекарственной (*Sanguisorba officinalis*) и корень солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), снижала жизнеспособность клеток многих опухолевых линий предстательной железы (DU-145, PC-3, MDA-PCa 2b и LNCaP) в зависимости от времени экспозиции и дозы. Также ZYD88 вызывала быстрое и дозозависимое увеличение активности каспазы-3 в клеточных линиях LNCaP и PC-3, индуцируя фрагментацию ДНК, что указывает на клеточный апоптоз. Вместе с тем ZYD88 ингибировала индуцированную андрогеном активность промотора гена простатического специфического антигена и активизировала промотор гена-мишени эстрогена. Исследователи полагают, что ZYD88 может служить потенциальным агентом для лечения метастатического рака предстательной железы [19].

Показаны также безопасность и антиметастатические свойства фитокомпозиции Hang-AmDan, содержащей женьшень ложный (*Panax Notoginseng*), кордицепс военный (*Cordyceps Militaris*), женьшень настоящий (*Panax ginseng* C.A. Mey) и ладанное дерево (*Boswellia Carteri*), в составе адъювантной терапии при РЖ IV стадии и раке легких. При этом препарат снижал побочные реакции, связанные с химиотерапией [20, 21].

Описаны противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства фитоформулы LCS101, включающей 14 компонентов — астрагал перепончатый (*Astragalus membranaceus*), порию кокосовидную (*Poria cocos*), атрактилодес большеголовый (*Atractylodes macrocephala*), дерезу китайскую (*Lycium chinense*), бирючину светлую (*Ligustrum lucidum*), пион молочнокветковый (*Paeonia lactiflora*), пион обратнойщевидный (*Paeonia obovata*), мандарин (*Citrus reticulata*), офиопогон японский (*Ophiopogon japonicus*), миллетию сетчатую (*Milletia reticulata*), гедиотис диффузный (*Oldenlandia diffusa*), шлемник байкальский (*Scutellaria barbata*), черноголовку обыкновенную (*Prunella vulgaris*), глению прибрежную (*Glehnia littoralis*). В изучении препарата LCS101 был применен комплексный подход, включающий доклинические (*in vitro*, *in vivo* и *ex vivo*) и клинические исследования. В селезенке мышей Balb/c, подвергнутых воздействию 5-фторурацила и доксорубина, LCS101 повышал проли-

ферацию Т-клеток. На клеточной линии RAW 264.7 мышинных макрофагов LCS101 способствовал продукции фактора некроза опухолей α . Также LCS101 *in vitro* продемонстрировал избирательное ингибирование роста (при анализе жизнеспособности клеток) на клеточных линиях РМЖ и рака предстательной железы человека без каких-либо вредных воздействий на нормальные эпителиальные клетки. В образцах крови здоровых доноров LCS101 дозозависимо увеличивал активность естественных клеток-киллеров. Применение LCS101 снижало лейкопению/нейтропению и анемию у пациентов с РМЖ на фоне химиотерапии. Цитотоксическое действие доксорубина и 5-фторурацила при РМЖ усиливалось после воздействия LCS101, при этом препарат проявлял защитный эффект в отношении здоровых клеток. У пациентов, принимающих LCS101 во время химиотерапии, улучшалось качество жизни, реже проявлялись побочные эффекты специфического лечения (слабость, боль, тошнота и рвота) [22].

В наших исследованиях была разработана фармацевтическая композиция, на основе которой создан комплексный фитоадаптоген (КФА). В его состав вошли компоненты экстрактов 40 лекарственных растений, включая женьшень настоящий, аралию маньчжурскую, родиолу розовую, элеутерококк колючий, лимонник китайский, заманиху высокую, лапчатку прямостоячую, бессмертник песчаный, толокнянку обыкновенную, эвкалипт прутовидный, можжевельник обыкновенный, валериану лекарственную, горец птичий, пустырник сердечный и др. Большинство из них являются экстрактами официальных растений (за исключением плодов клюквы и черной смородины, которые относятся к пищевым продуктам). Компонентный состав КФА защищен патентом Российской Федерации [23].

При изучении химического состава КФА с использованием современных физико-химических методов выявлено содержание широкого спектра БАВ. Так, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией в КФА определены БАВ женьшеня — гинзенозиды Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rg₂, Re, Rf, Ro [24], и аралии — аралозиды А, В и С [25]. Кроме того, в препарате выявлены эфирные (летучие) компоненты, аминокислоты, витамины [26, 27].

Показано, что КФА обладает более высокой адаптогенной активностью по сравнению с отдельными ФА. Для разработки способа определения адаптогенной активности было проведено исследование на культуре клеток пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Оценку адаптогенной активности проводили на основании изучения функциональной зависимости индекса пролиферации клеток *Saccharomyces cerevisiae* от содержания адаптогена в энергетически

бедной среде на определенный час культивирования. Выявленная зависимость имеет вид обратной параболы, что является специфичным для индивидуальных адаптогенов и комплексных адаптогенных препаратов. Определенный коэффициент при радикале в формуле, описывающей данную обратную параболу, индивидуален и отличает один адаптоген от любого другого. Чем выше коэффициент, тем более выражена адаптогенная активность препарата. Иными словами, адаптогенная активность определяется по ускорению роста культуры клеток пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на энергетически бедной питательной среде в присутствии препарата [28].

На культурах клеток аденокарциномы яичников, гипернефромы и рака шейки матки человека показан антипролиферативный эффект КФА. В то же время препарат не влиял на пролиферацию нормальных клеток почки эмбриона свиньи [9].

Антимутагенный эффект КФА *in vitro* проявлялся в снижении уровня спонтанных и индуцированных мутаций в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Препарат снижал частоту прямых мутаций, индуцированных УФ-излучением и азотистой кислотой в 3,7 и 33 раза соответственно. Частота спонтанных мутаций устойчивости к канаванину уменьшилась в 6,4 раза, а мутаций в генах *ADE4–ADE8* на пути биосинтеза аденина — более чем в 100 раз. Высокий антимутагенный эффект КФА, вероятно, связан с активизацией систем репарации ДНК [29]. Вместе с тем выявлено снижение частоты хромосомных обменов в лимфоцитах крови пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) в результате применения КФА [30].

Пероральное введение КФА мышам-самцам СВА, предрасположенным к развитию спонтанных гепатом (в 100 % случаев в 22 мес), профилактически в течение 1-го месяца онтогенеза, включая завершающий период дифференцировки ткани печени, долговременно повышало экспрессию лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1, обеспечивающих контактные взаимодействия иммунных эффекторов и клеток-мишеней. Последнее сопровождалось выраженной инфильтрацией опухолей CD8⁺ цитотоксическими лимфоцитами, деструкцией опухолевых узлов, снижением сыровоточного уровня интерлейкинов 6 и 10. В результате выявлено уменьшение частоты возникновения (на 31 %), количества и размеров наследственных гепатокарцином. Средняя продолжительность жизни мышей увеличилась на 23 % при сохранении массы тела, двигательной (поведенческой) активности. Животные имели удовлетворительное качество шерстного покрова без признаков алопеции [31–35].

Комплексный фитоадаптоген проявил радиозащитные свойства у мышей в условиях острого

и пролонгированного γ -облучения в дозе, близкой к ЛД_{50/30}. Выживаемость животных увеличилась на 40 %. В исследованиях на собаках в условиях острого и пролонгированного γ -облучения КФА способствовал повышению выживаемости животных в среднем на 26,7 %. Отмечено менее глубокое нарушение показателей периферической крови [36, 37].

В экспериментальных исследованиях у мышей на модели возрастной патологии — болезни Паркинсона — показана антиоксидантная и нейропротекторная активность КФА. Препарат достоверно ослаблял развитие гипокинезии и ригидности животных, препятствовал снижению дофамина, его метаболитов, подавлял содержание серотонина и малонового диальдегида в стриатуме мышей практически до нормы. Выявлено также снижение активности каспазы-3 и уровня фрагментации ДНК в черной субстанции, что подразумевает подавление гибели нейронов по типу апоптоза [38].

Препарат сертифицирован в качестве парафармацевтика. По результатам токсикологических исследований на мышах и крысах КФА отнесен к VI классу токсичности — относительно безвредным веществам [39]. Стандартизован с помощью биологических и химических методов [28, 40, 41].

Клинические исследования КФА проводили у пациентов с ДГПЖ (пример доброкачественного процесса), лейкоплакией слизистой оболочки полости рта (СОПР) (пример предракового заболевания), распространенным РЖ (пример инкурабельного рака IV стадии), болезнью Паркинсона (возрастное нейродегенеративное заболевание). Данные исследования дополнили и подтвердили результаты экспериментальных работ.

У пациентов с изученными патологиями выявлено иммуномодулирующее, в том числе интерферогенное, действие КФА, которое выражалось в нормализации показателей иммунного статуса, а также в индукции выработки интерферона γ лимфоцитами периферической крови [42–44]. Кроме того, определена антистрессорная активность КФА, показателем которой может служить снижение под его влиянием уровня стресс-гормона кортизола в сыворотке крови [42–44].

Применение КФА при вышеперечисленных патологиях приводило к подавлению перекисного окисления липидов, что выражалось в достоверном уменьшении уровня малонового диальдегида до нормальных значений. При этом заметно активизировались каталаза и глутатионовая антипероксидная система. Таким образом, КФА проявил выраженную антиоксидантную активность [42–45].

В результате применения КФА у больных с ДГПЖ было выявлено снижение (практически в 3 раза) возрастного уровня частоты хромосомных aberrаций

в лимфоцитах периферической крови. Этот показатель после проведения курса КФА снизился относительно общепопуляционной величины по России и показателей контрольной группы лиц, не имеющих какого-либо контакта с бытовыми, производственными и экологическими вредностями. КФА проявил себя в отношении хромосомных aberrаций как адаптоген, или геропротектор, обладающий антимутагенным действием, подтверждая исследования *in vitro* [30]. При ДГПЖ КФА также показал гормонотензирующий эффект, повышая уровень тестостерона и снижая содержание эстрадиола в сыворотке крови. Вместе с тем препарат нормализовал уровень простатического специфического антигена. Применение КФА приводило к уменьшению размеров предстательной железы и нормализации уродинамики. Полученные эффекты повышают качество жизни больных, страдающих ДГПЖ, способствуя более мягкому развитию возрастных стрессорных реакций, и демонстрируют геропротекторное действие КФА, что согласуется с результатами, полученными на высококорковых мышах [46].

На примере лейкоплакии СОПР показаны адгезиогенные свойства КФА, что подтверждает результаты экспериментальных исследований на высококорковых мышах. Как результат влияния КФА на клетках эпителия очага лейкоплакии показан рост экспрессии молекул адгезии ICAM-1, лигандов для эффекторов иммунитета, отмечено повышение экспрессии рецепторов, опосредующих апоптоз (Fas APO1), а также снижение экспрессии белка-маркера незрелых эпителиоцитов (кератин 17). Поскольку КФА являются индукторами дифференцировки, вероятно, воздействие КФА связано с восстановлением программы дифференцировки эпителиальных клеток СОПР с вытекающими отсюда последствиями — ослаблением ороговения эпителия СОПР, повышением уровня физиологической клеточной гибели, а также элиминацией иммунными эффекторами патологических клеток в очаге лейкоплакии. Применение КФА в комплексной терапии больных лейкоплакией СОПР повышало эффективность лечения по сравнению с препаратами витамина А практически вдвое. В данном исследовании было показано отсутствие привыкания к препарату [47]. Выявленные свойства и лечебное действие КФА в отношении предрака (лейкоплакии) с учетом превентивного эффекта у высококорковых мышей позволяют отнести КФА к средствам профилактики онкологических заболеваний.

Применение КФА при распространенном РЖ оказалось успешным, подтверждая результаты экспериментов *in vivo* на карциноме Льюис. Сочетание КФА с химиотерапевтическими препаратами позволило повысить продолжительность жизни пациентов с 5,7 до 12,4 мес. У больных, получивших только

хирургическое лечение, на фоне до- и послеоперационного курсового применения КФА продолжительность жизни увеличилась с 5,8 до 15,5 мес. При этом в группах с применением КФА было отмечено снижение концентрации опухолевых маркеров в крови (СА 19—9 и РЭА), которое сохранялось по окончании химиотерапии [45, 48].

Применение КФА у пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, на фоне стандартной антипаркинсонической терапии способствовало снижению тяжести заболевания (уменьшению нарушений повседневной и двигательной активности) и существенному улучшению качества жизни больных. Это позволило снизить дозы леводопасодержащих препаратов, длительное применение которых оказывает тяжелый побочный эффект и усугубляет инвалидность больного. С учетом результатов исследований на животных есть основания полагать, что КФА оказывает нейропротекторное действие, восстанавливая дофаминсинтезирующую функцию обратимо поврежденных нейронов и таким образом повышая эффективность комплексной патогенетической терапии [44].

Профилактический и лечебный эффект КФА в отношении опухолей может быть связан с наличием в составе препарата растительных соединений фенольной природы [24–25]. Учитывая, что в качестве узкобороздочных лигандов такие соединения могут оказывать прямое или опосредованное действие на процессы репарации ДНК, проявляя антиканцерогенные эффекты, их считают эффективными в составе препаратов для профилактики и терапии онкологических заболеваний [49].

Следует принять во внимание, что многие из подобных соединений, в том числе тритерпеновые гликозиды (гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, глицирризиновая кислота и др.), способны атаковать мультирецепторные системы плазматических мембран, так же как и активировать внутриклеточные стероидные рецепторы. Это обусловлено структурной и функциональной связью этих соединений со стероидами. Многие из них принадлежат к семейству стероидных сапонинов [3]. Последние, благодаря своей структуре, обладают широким спектром физиологической активности. В частности, стероидный скелет обеспечивает способность молекулы встраиваться в плазматические мембраны. Стероиды могут связывать ядерные рецепторы, действуя непосредственно на транскрипцию мРНК и, соответственно, на синтез белка. Из литературы известно, что подобные вещества защищают нервные клетки от повреждений, вызывая задержку дегенерации и предупреждая гибель дофаминергических нейронов [3]. Они также являются индукторами дифференцировки, корректорами гомо- и гетеротипических адгезионных

взаимодействий, сочетая противоопухолевые эффекты с усилением резистентности здоровых тканей к повреждению [50]. Обладают антипролиферативной активностью и повышенной индукцией апоптоза в отношении клеток опухоли [51].

Итак, разносторонний характер действия КФА, обеспечивая сочетанное влияние на патогенетические механизмы и коррекцию разных звеньев патологической системы при новообразованиях и процессах старения, вероятно, позволяет потенцировать эффекты, что может соответствовать принципу комплексных патогенетических воздействий.

Таким образом, в результате экспериментальных и клинических исследований было установлено, что КФА обладает свойствами отдельных адаптогенов (при отсутствии эффекта привыкания), в том числе иммуно- и гормонотропными, антимутагенными, радиопротекторными, антиоксидантными, антистрессорными, нейропротекторными; является потенциальным средством онкологической профилактики, противоопухолевым агентом, геропротектором, демонстрируя комплексный характер действия на организм. Вместе с тем препарат стандартизован, что дает возможность корректно его дозировать.

Выявленные эффекты позволяют использовать КФА в условиях техногенных катастроф, в экологически неблагоприятных районах, контингентом с наследственной предрасположенностью к опухолям, а также на предприятиях с вредными условиями труда (атомной, оборонной, химической промышленности и т. п.). Кроме того, представляется перспективным применение КФА для профилактики

инфекционной и общей заболеваемости, в основе которой лежат иммунодефицитные состояния.

Наряду с этим следует отметить, что исследования геропротекторного и противоопухолевого эффектов, модифицирующих защитные реакции организма, в том числе адгезионные взаимодействия в ткани-мишени и реакциях иммунитета, а также уровень биогенных аминов, центральных и периферических, представляются весьма перспективными.

Заключение

Вышеизложенное может служить обоснованием разработки комплексных адаптогенных препаратов-геропротекторов в целях профилактики и биотерапии онкологических заболеваний, что открывает перспективы в онкогеронтологии при создании комбинированных лекарств-регуляторов для использования в онкологии в частности и геронтологии вообще [52].

Вместе с тем анализ данных литературы убедительно показывает перспективы в лечении онкозаболеваний средствами интегративной медицины, объединяющей современные научные технологии создания лекарств, существующие в рамках традиционной медицины, и достижения комплементарной медицины, в частности применение нетоксичных природных средств, обладающих нормализующим влиянием на различные системы организма. Таким образом, интегративная медицина, учитывающая как достижения современной науки, так и тысячелетнюю мудрость и знания древних целителей, значительно расширяет спектр возможностей лечения, реабилитации, повышения качества и продолжительности жизни онкологических больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Давыдов М.И. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии. М.: МИА, 2008. 224 с. [Bocharova O.A., Baryshnikov A.Y., Davydov M.I. Phytoadaptogens in oncology and gerontology. Moscow: MIA, 2008. 224 p. (In Russ.)].
2. Дардымов И.В., Хасина Э.И. Элеутерококк: тайны «панaceи». СПб.: Наука, 1993. 123 с. [Dardymov I.V., Khasina E.I. Eleutherococcus: the secret of the "panacea". Saint-Petersburg: Nauka, 1993. 123 p. (In Russ.)].
3. Panossian A. Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. Ann N Y Acad Sci 2017;1401(1):49–64. DOI: 10.1111/nyas.13399.
4. Liao L.Y., He Y.F., Li L. et al. A preliminary review of studies on adaptogens: comparison of their bioactivity in TCM with that of ginseng-like herbs used worldwide. Chin Med 2018;(13):57–61. DOI: 10.1186/s13020-018-0214-9.
5. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):13–21. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-13-21. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Phytoadaptogens in the tumours bioterapy and geriatrics (Part 1). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Bioterapy 2020;19(2):13–21. (In Russ.)].
6. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.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. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Phytoadaptogens in the tumours bioterapy and geriatrics (Part 2). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Bioterapy 2020;19(3):12–19. (In Russ.)].
7. Гольдберг Е.Д., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растения в комплексной терапии опухолей. М.: Изд-во РАМН, 2008. 432 с. [Goldberg E.D., Razina T.G., Zueva E.P. et al. Plants in complex therapy of tumors. Moscow: RAMN Publ., 2008. 432 p. (In Russ.)].

8. Яременко К.В., Пашинский В.Г. Злокачественные опухоли: лечение и лекарственная профилактика. СПб.: ЭЛБИ-СПб, 2003. 166 с. [Yaremenko K.V., Pashinsky V.G. Malignant tumors: treatment and drug prevention. Saint-Petersburg: ELBI-SPb, 2003. 166 p. (In Russ.)].
9. Бочарова О.А., Барышников А.Ю. Фитоадаптогены в онкологии. М.: ЗооМедВет, 2004. 138 с. [Bocharova O.A., Baryshnikov A.Yu. Phytoadaptogens in oncology. Moscow: ZooMedVet, 2004. 138 p. (In Russ.)].
10. Chan A.S., Yip E.C., Yung L.Y. et al. Immuno-regulatory effects of CKBM on the activities of mitogen-activated protein kinases and the release of cytokines in THP-1 monocytic cells. *Biol Pharm Bull* 2005;28(9):1645–50. DOI: 10.1248/bpb.28.1645.
11. Kim W., Lee W-B., Lee J. et al. Traditional herbal medicine as adjunctive therapy for nasopharyngeal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Integr Cancer Ther* 2015;14(3):212–20. DOI: 10.1177/1534735415572881.
12. Ma W.L., Liu R., Huang L.H. et al. Impact of polymorphisms in angiogenesis-related genes on clinical outcomes of radiotherapy in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2017;44(5):539–48. DOI: 10.1111/1440-1681.12738.
13. Fu W.M., Lu Y.F., Hu B.G. et al. Long noncoding RNA hotair mediated angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma by direct and indirect signaling pathways. *Oncotarget* 2016;7(4):4712–23. DOI: 10.18632/oncotarget.6731.
14. Cai J., Wang H., Zhou S. et al. Effect of Sijunzi decoction and enteral nutrition on T-cell subsets and nutritional status in patients with gastric cancer after operation: a randomized controlled trial. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao* 2008;6(1):37–40. DOI: 10.3736/jcim20080108.
15. Liang L., Gao C., Li Y. et al. MiR-125a-3p/FUT5-FUT6 axis mediates colorectal cancer cell proliferation, migration, invasion and pathological angiogenesis via PI3K-Akt pathway. *Cell Death & Disease* 2017;8(8):e2968. DOI: 10.1038/cddis.2017.352.
16. Xiao H., Yang J. Immune enhancing effect of modified sijunzi decoction on patients with colorectal cancer undergoing chemotherapy. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2011;31(2):164–7. PMID: 21425566.
17. Wu B., Xuan Z.R. Progress in research on applying Sijunzi decoction in treating digestive malignant tumor. *Chin J Integr Med* 2007;13(2):156–9. DOI: 10.1007/s11655-007-0156-z.
18. Yue G.G., Lee J.L., Chan B.C. et al. An innovative anti-cancer Chinese herbal formula exhibited multi-targeted efficacies in metastatic breast cancer mouse model. *Chin Med* 2018;13:64. DOI: 10.1186/s13020-018-0222-9.
19. Zhu Y.S., Huang Y., Cai L.Q. et al. The Chinese medicinal herbal formula ZYD88 inhibits cell growth and promotes cell apoptosis in prostatic tumor cells. *Oncol Rep* 2003;10(5):1633–9. PMID: 12883751.
20. Park J.W., Yoon J., Cho C.K. et al. Survival analysis of stage IV metastatic gastric cancer patients treated with HangAm-Plus. *Chin J Integr Med* 2014;20(1):49–55. DOI: 10.1007/s11655-012-1084-0.
21. Bae K., Kim E., Kong J.S. et al. Integrative cancer treatment may have a survival benefit in patients with lung cancer: A retrospective cohort study from an integrative cancer center in Korea. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(26):e16048. DOI: 10.1097/MD.00000000000016048.
22. Maimon Y., Samuels N., Cohen Z. et al. Botanical Formula LCS101: A Multi-Targeted Approach to Cancer Care. *Integr Cancer Ther* 2018;17(4):1020–26. DOI: 10.1177/1534735418801528.
23. Бочарова О.А. Фармацевтическая композиция, проявляющая антимутагенное действие. Патент РФ № 2477142. 2013. [Bocharova O.A. Pharmaceutical composition exhibiting an antimutagenic effect. Patent RU №2477142. 2013 (In Russ.)].
24. Карпова Р.В., Шевченко В.Е., Бочаров Е.В. и др. Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с tandemной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):36–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-36-46. [Karpova R.V., Shevchenko V.E., Bocharov E.V. et al. Ginsenosides definition in plant extracts by means of high through liquid chromatography with tandem mass-spectrometry. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = *Russian Journal of Biotherapy* 2016;15(2):36–46. (In Russ.)].
25. Казеев И.В., Бочарова О.А., Шевченко В.Е. и др. ТанDEMная масс-спектрометрия в технологии определения аралозидов композиции фитоадаптогенов. *Теоретические основы химической технологии* 2020;54(6):733–7. [Kazeev I.V., Bocharova O.A., Shevchenko V.E. et al. Tandem mass spectrometry in the technology of aralosides determination in phytoadaptogens composition. *Teoreticheskie osnovi himicheskoi tehnologii* = *Theoretical foundations of chemical technology* 2020;54(6):733–7. (In Russ.)].
26. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Определение химического состава летучих соединений фитоадаптогена Фитомикс-40 методом хромато-масс-спектрометрии. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2008;6(5):18–28. [Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Determination of the phytoadaptogen Phytomix-40 volatile compounds chemical composition by chromatography-mass spectrometry. *Voprosi biologicheskoi, medicinskoj i farmaceuticheskoi himii* = *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry* 2008;6(5):18–28. (In Russ.)].
27. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2012;10(10):52–9. [Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Study of complex phytoadaptogen by HPLC. *Voprosi biologicheskoi, medicinskoj i farmaceuticheskoi himii* = *Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry* 2012;10(10):52–9. (In Russ.)].
28. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Куренная О.Н., Княжев В.А. Способ биологического контроля комплексного фитоадаптогена. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2003;136(12):694–9. [Bocharova O.A., Lyzhenkova M.A., Kurenayaya O.N., Knyazhev V.A. Method of a complex phytoadaptogen biological control. *Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny* = *Bull Exp Biol Med* 2003;136(12):694–9. (In Russ.)].
29. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. *Генетика* 2013;49(12):1364–9. [Kurenayaya 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.)].
30. Бочков Н.П., Бочарова О.А., Аксенов А.А. и др. Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы. *Медицинская генетика* 2005;4(1):15–9. [Bochkov N.P., Bocharova O.A., Aksyonov A.A.

- et al. The frequency of chromosomal aberrations in lymphocytes of patients with benign prostatic hyperplasia. *Meditsinskaya genetika* = Medical Genetics 2005;4(1):15–9. (In Russ.).
31. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатоканцерогенезе мышей высокоракковой линии СВА. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(3):53–6. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Ilyenko V.A. et al. Leukocyte integrins at hepato carcinogenesis in high-cancer CBA strain of mice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2013;12(3):53–6. (In Russ.).]
 32. Бочарова О.А., Бочаров Е.В., Карпова Р.В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракковых мышей СВА. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(2):73–6. [Bocharova O.A., Bocharov E.V., Karpova R.V. et al. Reduced occurrence of hepatomas in phytoadaptogen exposed high-cancer CBA strain of mice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(2):73–6. (In Russ.).]
 33. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Вершинская А.А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатоканцином мышей высокоракковой линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):85–90. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Vershinskaya A.A. et al. Hepatocarcinomas infiltration lymphocytes in high-cancer CBA mice when multiphytoadaptogen exposed in early postnatal ontogenesis. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2015;14(2):85–90. (In Russ.).]
 34. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Воздействие мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе, улучшающее выживаемость и соматическое состояние мышей высокоракковой линии. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(1):76–81. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Multiphytoadaptogen effect in early postnatal ontogenesis improves survival and mice somatic condition of high-cancer CBA strain of mice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(1):76–81. (In Russ.).]
 35. Бочаров Е.В., Бочарова О.А., Карпова Р.В. и др. Регуляция иммуноадгезивных взаимодействий мультифитоадаптогеном в профилактике спонтанных гепатокарцином. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(2):69–78. [Bocharov E.V., Bocharova O.A., Karpova R.V. et al. Immuno-adhesive regulation using multiphytoadaptogens for spontaneous hepatocarcinomas prevention. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2):69–78. (In Russ.).]
 36. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В. и др. Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена в эксперименте на мышах. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013;57(3):55–8. [Bocharov E.V., Karpova R.V., Kazeev I.V. et al. Investigation of multiphytoadaptogen anti-radiation activity in mice. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya* = Pathological physiology and experimental therapy 2013;57(3):55–8. (In Russ.).]
 37. Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Казеев И.В. и др. Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия* 2013;57(4):51–4. [Karpova R.V., Bocharov E.V., Kazeev I.V. et al. Investigation of multiphytoadaptogen anti-radiation activity in dogs experiments. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya* = Pathological physiology and experimental therapy 2013;57(4):51–4. (In Russ.).]
 38. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. и др. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2006;141(5):495–8. [Bocharov E.V., Kucheryanu V.G., Kryzhanovsky G.N. et al. The effect of phytoadaptogen on MPTP-induced parkinson's syndrome in mice. *Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny* = Bull Exp Biol Med 2006;141(5):495–8. (In Russ.).]
 39. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Голубева В.А. и др. Токсикологическое изучение препарата Фитомикс-40. *Гигиена и санитария* 1999;5(5):60–1. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Golubeva V.A. et al. Toxicological investigation of Phytomix-40. *Gigiena i sanitariya* = Hygiene and Sanitation 1999;5(5):60–1. (In Russ.).]
 40. Бочарова О.А., Куренная О.Н., Серебрякова Р.В. и др. Новый способ биологического тестирования препаратов адаптогенов. *Биотехнология* 1993;8(8):28–34. [Bocharova O.A., Kurenaya O.N., Serebryakova R.V. et al. A new biological method of adaptogen preparations testing. *Biotechnologiya* = Biotechnology 1993;8(8):28–34. (In Russ.).]
 41. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Мезенцева М.В. и др. Фитоадаптоген для профилактической онкологии: иммунобиологические критерии состава. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2003;136(12):670–3. [Bocharova O.A., Lyzhenkova M.A., Mezentseva M.V. et al. Phytoadaptogen for preventive oncology: immunobiological measure of composition. *Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny* = Bull Exp Biol Med 2003;136(12):670–3. (In Russ.).]
 42. Пожарицкая М.М., Бочарова О.А., Чекалина Т.Л., Воронин В.Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. *Методическое пособие для врачей*. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2004. 46 с. [Pozharitskaya M.M., Bocharova O.A., Chekalina T.L., Voronin V.F. Modern aspects of pathogenesis and treatment of the oral mucosa leukoplakia. *Methodological manual for physicians*. Moscow: GOU VUNMTs, 2004. 46 p. (In Russ.).]
 43. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Матвеев В.Б. и др. Иммуномодулирующий и интерферогенный эффекты комплексного фитоадаптогена при доброкачественной гиперплазии предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(1):90–5. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Matveev V.B. et al. Immunomodulating and interferogenic effects of multiphytoadaptogen in benign prostatic hyperplasia. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2004;3(1):90–5. (In Russ.).]
 44. Бочаров Е.В., Иванова-Смоленская И.А., Полещук В.В. и др. Возможности фитоадаптогена-нейропротектора при лечении нейродегенеративного заболевания (на примере болезни Паркинсона). *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2010;149(6):619–21. [Bocharov E.V., Ivanova-Smolenskaya I.A., Poleschuk V.V. et al. Phytoadaptogen-neuroprotector in the treatment of a neurodegenerative disease (Parkinson's disease). *Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny* = Bull Exp Biol Med 2010;149(6):619–21. (In Russ.).]
 45. Чулкова С.В., Бочарова О.А., Клименков А.А. и др. Возможности повышения эффективности комплексного лечения распространенного рака же-

- лудка фитоадаптогеном. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(2):85–92. [Chulkova S.V., Bocharova O.A., Klimenkov A.A. et al. Possibilities of increasing the effectiveness of integrated treatment of advanced gastric cancer by phytoadaptogen. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2006;5(2):85–92. (In Russ.)].
46. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Карпова Р.В. и др. Коррекция клинических и иммунологических показателей у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы фитоадаптогеном 2006;141(5):555–9. [Bocharova O.A., Matveev V.B., Karpova R.V. et al. Correction of immunological and clinical parameters in men with benign prostatic hyperplasia by phytoadaptogen. Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny = Bull Exp Biol Med 2006;141(5):555–9. (In Russ.)].
47. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л. и др. Лейкоплакия слизистой оболочки полости рта: патогенез и возможности коррекции фитоадаптогеном. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2004;138(12):652–7. [Bocharova O.A., Pozharitskaya M.M., Chekalina T.L. et al. Leukoplakia of the oral mucosa: pathogenesis and possibilities of phytoadaptogen correcting. Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny = Bull Exp Biol Med 2004;138(12):652–7. (In Russ.)].
48. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А. и др. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2009;148(7):96–9. [Bocharova O.A., Davydov M.I., Klimenkov A.A. et al. Prospects for phytoadaptogen using in advanced gastric cancer treatment. Byulleten eksperimentalnoi biologii i mediciny = Bull Exp Biol Med 2009;148(7):96–9. (In Russ.)].
49. 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.
50. Wang C., He H., Dou G. et al. Ginsenoside 20(S)-Rh2 Induces Apoptosis and Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells: Role of Orphan Nuclear Receptor Nur77. J Agric Food Chem 2017;65(35):7687–97. DOI: 10.1021/acs.jafc.7b02299.
51. 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):3591–98. DOI: 10.3892/mmr.2017.6459.
52. Онкогеронтология: Руководство для врачей / под ред. Анисимова В.Н., Беляева А.М. СПб.: Издательство АННМО «Вопросы онкологии», 2017. 512 с. [Oncogerontology: A Guide for Physicians / Ed. Anisimov V.N., Belyaev A.M. Saint-Petersburg: ANNMO Publ. "Oncology Issues", 2017. 512 p. (In Russ.)].

Вклад авторов

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

Authors' contributions

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

ORCID авторов/ORCID of authors

О.А. Бочарова/O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>
Р.В. Карпова/R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>
Е.В. Бочаров/E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>
В.Г. Кучеряну/V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>
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 study had no sponsor support.

Статья поступила: 08.06.2020. Принята к публикации: 02.10.2020.

Article submitted: 08.06.2020. Accepted for publication: 02.10.2020.

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИММУНОФЕНОТИПИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ БЛАСТНЫХ КЛЕТОК С ДОСТИЖЕНИЕМ РЕМИССИИ ПРИ ОСТРОМ МИЕЛОИДНОМ ЛЕЙКОЗЕ У ДЕТЕЙ

А.Д. Палладина¹, А.В. Попа², В.Г. Никитаев³, К.Л. Кондратчик⁴, Н.А. Купрышина¹, И.Н. Серебрякова¹, Т.В. Шведова¹, О.А. Чернышева¹, М.А. Шервашидзе¹, Н.Н. Тупицын¹

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

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

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

⁴ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 119049 Москва, 4-й Добрынинский пер., 1/9

Контакты: Александра Дмитриевна Палладина palladinaa@gmail.com

Введение. Острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) — клональное заболевание системы крови, которое возникает вследствие мутаций генетического аппарата гемопоэтических клеток-предшественников. В результате мутаций линейная дифференцировка клеток гемопоэза сменяется пролиферацией злокачественных миелоидных предшественников. В настоящее время группа риска при ОМЛ у детей определяется главным образом наличием специфических генных и хромосомных поломок и повышенным уровнем лейкоцитов периферической крови. Особенности иммунофенотипа бластных клеток могут также оказывать влияние на течение заболевания.

Цель исследования — оценить взаимосвязь иммунофенотипических параметров бластных клеток с вероятностью достижения ремиссии при ОМЛ у детей.

Материалы и методы. В исследование включены 109 пациентов в возрасте от 3 мес до 17 лет, которые получали лечение по протоколам AML BFM 87, AML BFM 2004, НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012 в период с 1991 по 2020 г.

Результаты. В ходе исследования была показана взаимосвязь между вероятностью достижения ремиссии и наличием на опухолевых клетках маркеров CD33, CD19 и CD14. Экспрессия на бластах лимфоидного антигена CD19 ассоциировалась с большей частотой достижения ремиссий (73,0 % vs 95,5 %, $p = 0,027$). Отсутствие линейно-ассоциированного миелоидного маркера CD33 негативно коррелировало с частотой ремиссий (61,1 % vs 87,7 %, $p = 0,007$). При наличии на бластах моноцитарного антигена CD14 вероятность достижения ремиссии была низкой (95 % vs 50 %, $p = 0,013$).

Заключение. Особенности иммунофенотипа опухолевых клеток при ОМЛ у детей взаимосвязаны с вероятностью достижения ремиссии.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, CD33, CD19, CD14, ремиссия

Для цитирования: Палладина А.Д., Попа А.В., Никитаев В.Г. и др. Взаимосвязь иммунофенотипических особенностей бластных клеток с достижением ремиссии при остром миелоидном лейкозе у детей. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):45–53.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-45-53



RELATIONSHIP OF BLAST CELL IMMUNOPHENOTYPE WITH REMISSION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN CHILDREN

A.D. Palladina¹, A.V. Popa², V.G. Nikitaev³, K.L. Kondratchik⁴, N.A. Kupryshina¹, I.N. Serebryakova¹, T.V. Shvedova¹, O.A. Chernysheva¹, M.A. Shervashidze¹, N.N. Tupitsyn¹

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; 1a Ostrovitianov St., Moscow 117997, Russia;

³National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe Shosse, Moscow 115409, Russia;

⁴Moscow state budgetary healthcare institution “Morozov Children’s City Clinical Hospital of the Moscow City Healthcare Department”; 1/9 4th Dobryninsky lane, Moscow 119049, Russia

Introduction. Acute myeloid leukemia (AML) is a clonal disease of the blood system that occurs as a result of mutations in the genome of hematopoietic progenitor cells. As a result of mutations, the linear differentiation of hematopoietic cells is replaced by the proliferation of malignant myeloid progenitors. Currently, the risk group for AML in children is determined mainly by the presence of specific gene and chromosomal abnormalities and an increased level of peripheral blood leukocytes. The features of the immunophenotype of blast cells can also influence the course of the disease.

The aim of the work is to assess the relationship between the immunophenotypic parameters of blast cells and the probability of achieving remission in children with AML.

Materials and methods. The study included 109 patients aged 3 months to 17 years who received treatment according to the AML BFM 87, AML BFM 2004, NII DOG AML 2007 и NII DOG AML 2012 protocol in the period from 1991 to 2020.

Results. The study showed the relationship between the probability of achieving remission and the presence of markers CD33, CD19 and CD14 on tumor cells. Expression of lymphoid antigen CD19 on blasts was associated with a higher rate of remission (73.0 % vs 95.5 %, $p = 0.027$). The absence of the linearly associated myeloid marker CD33 negatively correlated with the remission rate (61.1 % vs 87.7 %, $p = 0.007$). In the presence of monocyte antigen CD14 on blasts, the probability of achieving remission was low (95 % vs 50 %, $p = 0.013$).

Conclusion. Characteristics of the immunophenotype of tumor cells in AML in children are associated with the probability of achieving remission.

Keywords: Acute myeloid leukemia, CD33, CD19, CD14, remission

For citation: A.D. Palladina, A.V. Popa, V.G. Nikitaev et al. Relationship of blast cell immunophenotype with remission in acute myeloid leukemia in children. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4):45–53. (In Russ.).

Введение

Иммунофенотипирование бластной популяции при диагностике острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) является рутинным исследованием и дополняет данные, получаемые при морфологическом, цитохимическом и цитогенетическом исследованиях опухолевых клеток. Иммунофенотипирование — единственный способ, который позволяет дифференцировать ОМЛ с минимальной дифференцировкой (M0), эритробластный (M6) и мегакариоцитарный (M7) варианты от лимфобластного лейкоза, выявить смешанно-линейный острый лейкоз и определиться с линейностью заболевания в случаях, когда анализируемый материал беден клеточными элементами. Подробное иммунофенотипирование бластных клеток в дебюте заболевания позволяет выявить aberrантность экспрессии иммунологических маркеров, на основании которой возможна количественная оценка остаточной опухоли в костном мозге после лечения. Особенности иммунофенотипа опухолевых клеток по-разному отражаются на прогнозе ОМЛ. В данной статье проанализировано значение отдельных поверхностных маркеров бластных клеток при ОМЛ для достижения полной клинко-гематологической ремиссии (ПР) при ОМЛ у детей.

Существуют противоречивые данные о значении иммунологических факторов для прогноза при ОМЛ. Большинство из них получены в результате анализа ОМЛ взрослых. Представляет интерес оценка взаимосвязи иммунофенотипического «портрета» бластных клеток и течения болезни.

Цель исследования — оценить взаимосвязь иммунофенотипических параметров бластных клеток с вероятностью достижения ПР при ОМЛ у детей.

Материалы и методы

Проанализированы данные 109 детей, больных ОМЛ, получавших лечение в период с 1991 по 2020 г. в НИИ ДОГ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (по протоколам AML BFM 87, AML BFM 2004, НИИ ДОГ ОМЛ 2007 и НИИ ДОГ ОМЛ 2012) и ГБУЗ «Морозовская детская городская клиническая больница Департамента здравоохранения города Москвы» (по протоколу AML BFM 2004). Возраст детей на момент постановки диагноза составлял от 3 мес до 17 лет.

Протоколы НИИ ДОГ ОМЛ 2012 и AML BFM 2004 состояли из 4–5 курсов химиотерапии. Для больных со стандартным риском лечение включало 4 курса: AIE (цитозинарабинозид (Ara-C), идарубицин (IDA), этопозид), AI (Ara-C, IDA), hAM (Ara-C 1000 мг/м² № 6, митоксантрон) и HAE (Ara-C 3000 мг/м² № 6, этопозид). У пациентов, включенных в группы промежуточного и высокого рисков, химиотерапия состояла из 5 курсов: AIE (Ara-C, IDA, этопозид), HAM (Ara-C 3000 мг/м² № 6, митоксантрон), AI (Ara-C 500 мг/м² 1–5-й дни и IDA), hAM (Ara-C 1000 мг/м² и митоксантрон) и HAE (Ara-C 3000 мг/м² № 6 и этопозид). Поддерживающая терапия состояла из постоянного приема 6-меркаптопурина (6-МП), 4-дневных курсов Ara-C 1 раз в 28 дней и длилась до 73-й недели от начала индуктивного курса.

Протокол AML BFM 87 состоял из индукции ремиссии длительностью 8 дней, включавшей Ara-C 100 мг/м²/сут внутривенно (в/в) капельно 24 ч 1–2-й дни, 100 мг/м² в/в капельно в течение 1 ч каждые 12 ч 3–8-й дни, даунорубицин 60 мг/м²/сут в/в капельно 1 ч 3–5-й дни и вепезид (VP-16) 150 мг/м²/сут в/в капельно 2 ч 6–8-й дни; консолидации ремиссии —

Ara-C 75 мг/м²/сут в/в струйно 3–6-й, 10–13-й, 17–20-й и 24–27-й дни, даунорубин 30 мг/м²/сут в/в капельно в течение 2 ч 1, 8, 15 и 22-й дни, 6-МП 60 мг/м²/сут внутрь ежедневно 1–27-й дни; 2 курсов ранней интенсификации — Ara-C 1000 мг/м² в/в капельно каждые 12 ч 1–3-й дни и VP-16 125 мг/м²/сут в/в капельно 2–5-й дни.

Пациентам стандартной группы риска в протоколе ОМЛ НИИ ДОГ 2007 эпигенетические препараты были включены только в поддерживающую терапию. Индукция ремиссии состояла из Ara-C 100 мг/м²/сут в/в капельно 24 ч 1–2-й дни и 100 мг/м² в/в капельно каждые 12 ч 3–8-й дни, VP-16 150 мг/м²/сут в/в капельно 2 ч 6–8-й дни, IDA 12 мг/м²/сут в/в капельно 1 ч 3–5-й дни. С целью профилактики поражения ЦНС вводился Ara-C интратекально в дозах в зависимости от возраста в 1-й день химиотерапии. При лейкоэмическом поражении ЦНС, которое подтверждалось клинически и/или морфологически, а также с помощью компьютерной томографии, вводились интратекально 3 препарата. В терапию консолидации ремиссии были включены следующие химиопрепараты: Ara-C 75 мг/м²/сут в/в струйно 3–6-й, 10–13-й, 17–20-й и 24–27-й дни, рубомицин/даунорубин 30 мг/м²/сут в/в капельно в течение 2 ч 1, 8, 15 и 22-й дни, 6-МП 60 мг/м²/сут внутрь ежедневно 1–27-й дни. Два курса интенсификации с интервалом в 2 нед, состоящие из высоких доз Ara-C 1000 мг/м² в/в капельно каждые 12 ч 1–3-й дни и VP-16 125 мг/м²/сут в/в капельно в течение 2 ч 2–5-й дни. После окончания интенсификации II при инициальном лейкоэмическом поражении ЦНС проводилось облучение головного мозга в суммарной очаговой дозе 18 Гр. Облучение ЦНС проводилось больным с t(16;16) или inv(16) без инициального поражения ЦНС в суммарной лучевой дозе 12 Гр, разовой очаговой дозе 2 Гр. Далее больные получали поддерживающую терапию, включающую 6-МП 40 мг/м²/сут ежедневно до 78-й недели, Ara-C 40 мг/м²/сут 1 раз в день 4-дневным курсом каждые 28 дней, депакин 25 мг/кг ежедневно до 78-й недели, весаноид 25 мг/м² ежедневно сразу после окончания интенсификации II в течение 43 дней.

Пациенты со средним и высоким риском ОМЛ с 1-го дня получали эпигенетическое лечение (депакин 25 мг/кг/сут внутрь ежедневно в течение всего курса терапии и весаноид 25 мг/м²/день внутрь 1–45-й дни) вместе с химиотерапией. Индукция ремиссии включала 2 курса химиотерапии — AIE и HAM. Курс AIE (Ara-C 100 мг/м²/сут в/в капельно 24 ч 1–2-й дни и 100 мг/м² в/в капельно каждые 12 ч 3–8-й дни, IDA 12 мг/м²/сут в/в капельно 3–5-й дни, VP-16 150 мг/м²/сут в/в капельно 6–8-й дни). С целью профилактики поражения ЦНС вводился Ara-C интратекально в дозах в зависимости от возраста

в 1-й день химиотерапии. Консолидация ремиссии проводилась больным, у которых по окончании индукции ремиссии в костном мозге было менее 15 % бластных клеток. Она включала введение гранулоцитарного колониестимулирующего фактора 5 мкг/кг в день подкожно 1–7-й дни, Ara-C 2000 мг/м²/сут в/в капельно 2–6-й дни, флударабина 30 мг/м² в/в капельно 2–6-й дни, депакина 25 мг/кг внутрь ежедневно, весаноида 25 мг/м² ежедневно 1–14-й дни. Курс ранней интенсификации проводился больным, достигшим ремиссии к 21-му дню от окончания блока индукции, и состоял из Ara-C 3000 мг/м² в/в капельно каждые 12 ч 1–3-й дни, VP-16 125 мг/м²/сут в/в капельно 3–5-й дни, депакина 25 мг/кг ежедневно без перерывов внутрь, весаноида 25 мг/м²/день внутрь ежедневно 1–14-й дни.

С профилактической и лечебной целью эндолумбально химиопрепараты вводились на 5-й день курса в ранее указанных дозировках. По окончании основного лечения проводилась поддерживающая терапия, включающая прием 6-МП 40 мг/м²/сут ежедневно до 78-й недели от начала терапии индукции ремиссии, Ara-C 40 мг/м²/сут 1 раз в день подкожно 4-дневным курсом каждые 28 дней, депакина 25 мг/кг ежедневно внутрь до 78-й недели от начала терапии индукции ремиссии, весаноида 25 мг/м² ежедневно внутрь сразу после окончания интенсификации II 14-дневными курсами в течение 43 дней. Поддерживающую терапию не получали больные, которым была проведена аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток.

Диагноз ОМЛ устанавливался на основании клинико-гематологических показателей, морфологического, цитохимического и иммунофенотипического исследований костного мозга.

Результаты

Полная клинико-гематологическая ремиссия является ключевым понятием в лечении ОМЛ у детей,

Таблица 1. Показатели достижения полной клинико-гематологической ремиссии (ПР) в анализируемой группе детей, больных острым миелоидным лейкозом

Table 1. The frequency of achieving complete remission (CR) in the analyzed group of children with acute myeloid leukemia

Факт наличия ПР Presence of CR	Число больных Number of patients	%
Достигнута Achieved	88	80,7
Не достигнута Not achieved	21	19,3
Всего Total	109	100

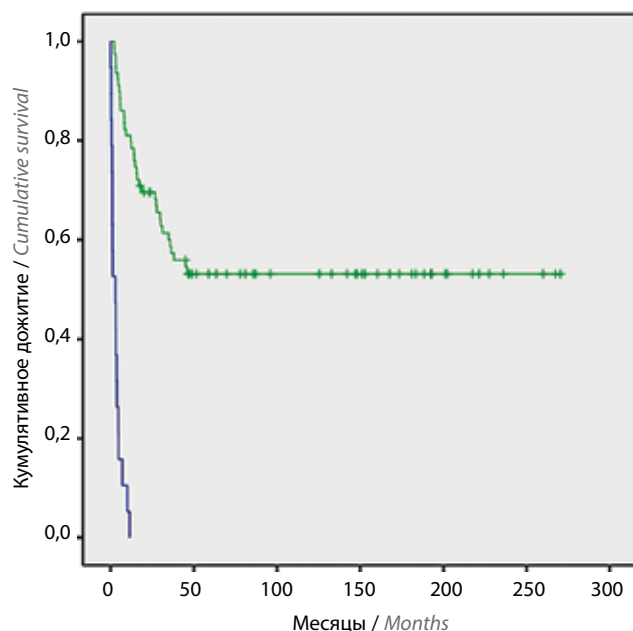


Рис. 1. Кривые общей выживаемости детей, больных острым миелоидным лейкозом, в зависимости от достижения полной клинико-гематологической ремиссии (ПР). Кривая зеленого цвета — выживаемость больных, у которых достигнута ПР ($n = 79$), кривая синего цвета — выживаемость больных, у которых ПР не достигнута ($n = 19$), где n — число оцениваемых больных. Различия по каждому из 3 тестов (Лог-ранк, Тарон-Уорре, Бреслоу) высокостатистически значимы, $p = 0,000$

Fig. 1. Curves of overall survival of children with acute myeloid leukemia, depending on the achievement of complete remission (CR). The green curve — survival rate of patients who achieved CR ($n = 79$), the blue curve — survival rate of patients in whom CR has not been achieved ($n = 19$), n — number of patients. Differences for each of the three tests (Log-rank, Taron-Ware, Breslow) are highly significant, $p = 0.000$

ее достижение — главный прогностический фактор при острых лейкозах. В нашем исследовании ПР была достигнута у 88 из 109 детей, больных ОМЛ (80,7 %) (табл. 1).

Прогностическая значимость достижения ПР при ОМЛ у детей

У 98 детей из исследуемой группы была оценена общая выживаемость. Достижение ПР оказалось очень значимым фактором прогноза при оценке общей выживаемости (рис. 1).

Взаимосвязь клинико-гематологических и морфоцитохимических факторов с частотой достижения ПР

Проведена оценка взаимосвязи возраста и пола пациентов с фактом достижения ПР при ОМЛ. В анализируемой группе (106 больных) было 96 детей старше 1 года и 10 детей младше года. Частота ПР в этих возрастных группах составила 81,2 и 80,0 % соответственно, достоверной взаимосвязи с возрастом не обнаружено: Хи-квадрат 0,009; $p = 0,92$.

Аналогично не отмечено связи и с полом пациентов. В анализируемой группе было 68 мальчиков и 41 девочка. Среди мальчиков ПР достигнута в 52 случаях (76,5 %), среди девочек — в 36 (87,8 %). Взаимосвязь недостоверна, Хи-квадрат 2,1; $p = 0,14$.

Сопоставление частоты ПР с вариантом ОМЛ по Франко-Американо-Британской (ФАБ) классификации проведено среди 84 больных. Распределение ФАБ-вариантов ОМЛ в анализируемой группе отражено в табл. 2, из которой видно, что наиболее частыми были варианты М2 (26,2 %) и М4 (20,2 %).

Таблица 2. Распределение ФАБ-вариантов острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) в анализируемой группе

Table 2. Frequency of FAB-variants of acute myeloid leukemia (AML) in the analyzed group

ФАБ-вариант ОМЛ FAB-variant of AML	Число больных Number of patients	%
M0	7	8,3
M1	9	10,7
M2	22	26,2
M3	7	8,3
M4	17	20,2
M5	10	11,9
M6	2	2,4
M7	10	11,9
Итого Total	84	100,0

Примечание. Здесь и в табл. 3, 8: ФАБ-вариант — вариант острого миелоидного лейкоза по Франко-Американо-Британской классификации.

Note. Here and in table 3, 8: FAB-variant — French-American-British classification' variant of acute myeloid leukemia.

При сопоставлении ФАБ-вариантов ОМЛ с частотой достижения ПР получены результаты, представленные в табл. 3.

Достоверной связи варианта ОМЛ с частотой достижения ПР нами не установлено, Хи-квадрат 7,0; $p = 0,42$.

Таким образом, ни один из проанализированных клинических факторов, а также морфоцитохимических показателей (вариант ОМЛ) не был достоверно взаимосвязан с частотой достижения ПР у детей, больных ОМЛ.

Прогностическая значимость иммунофенотипа бластных клеток при ОМЛ

При диагностике ОМЛ у детей использована широкая панель иммунологических маркеров, в последние годы в значительной степени соответствующая предложенным ЕвроФлоу панелям 8-цветного окрашивания

Таблица 3. Взаимосвязь ФАБ-варианта острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с достижением полной клинико-гематологической ремиссии (ПР)

Table 3. Relationship between the FAB-variant of acute myeloid leukemia (AML) and the achievement of complete remission (CR)

ФАБ-вариант ОМЛ FAB-variant of AML	ПР не достигнута, n (%) CR not reached, n (%)	ПР достигнута, n (%) CR achieved, n (%)	Всего, n (%) Total, n (%)
M0	1 (14,3)	6 (85,7)	7 (100,0)
M1	0 (0,0)	9 (100,0)	9 (100,0)
M2	3 (13,6)	19 (86,4)	22 (100,0)
M3	1 (14,3)	6 (85,7)	7 (100,0)
M4	4 (23,5)	13 (76,5)	17 (100,0)
M5	4 (40,0)	6 (60,0)	10 (100,0)
M6	0 (0,0)	2 (100,0)	2 (100,0)
M7	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)

Примечание. Здесь и в табл. 5–8: n – число больных.
Note. Here and in table 5–8: n – number of patients.

Таблица 4. Частота использования маркеров при постановке диагноза острого миелоидного лейкоза (ОМЛ)

Table 4. Frequency of the markers' usage in the diagnosis of acute myeloid leukemia (AML)

Маркер Marker	Число случаев ОМЛ с экспрессией маркера/общее число случаев оценки маркера AML with marker expression/total number of marker evaluations	% ОМЛ с наличием маркера % of AML with marker expression
CD7	17/72	23,6
CD34	54/96	49,5
CD117	33/40	82,5
CD13	77/100	77,0
CD33	81/99	81,8
CD19	22/85	25,9
CD38	40/52	76,9
HLA-DR	70/87	80,5
CD64	23/63	36,5
CD14	4/24	16,7
CD56	21/55	38,2
CD10	3/71	4,2

при проточно-цитометрической диагностике. Частота использования различных маркеров в группе больных, у которых факт достижения или отсутствия ПР был подтвержден, приведена в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что с наибольшей частотой на клетках ОМЛ у детей экспрессировались общемиелоидные маркеры (CD33, CD13), а также антигены HLA-DR, CD117, CD38. Антиген стволовых клеток CD34 обнаруживался в половине случаев. Следует отметить и достаточно высокую частоту экспрессии лимфоидно-ассоциированных антигенов (CD7, CD19), а также CD56 в анализируемой группе больных.

Среди проанализированных иммунологических маркеров только 3 (CD33, CD19 и CD14) имели достоверную связь с достижением ПР. Приводим эти данные.

CD33

Антиген CD33, или Siglec-3, – трансмембранный гликопротеин, расположенный на поверхности миелоидных клеток. CD33 является молекулой адгезии, связывается с сиаловой кислотой, поэтому относится к семейству белков SIGLEC группы лектинов. Экспрессируется на миелобластах, промиелоцитах, миелоцитах, моноцитах и, менее ярко, – на гранулоцитах. Присутствует на поверхности бластных клеток в 80–90 % случаев ОМЛ.

Взаимосвязь между достижением ПР при ОМЛ у детей и экспрессией антигена CD33 была высокодостоверной ($p = 0,007$) (табл. 5).

Таблица 5. Взаимосвязь достижения полной клинико-гематологической ремиссии (ПР) при остром миелоидном лейкозе у детей с экспрессией Siglec-3 (CD33) на бластных клетках

Table 5. Relationship between achieving complete remission (CR) in acute myeloid leukemia in children with expression of Siglec-3 (CD33) on blast cells

Экспрессия CD33 CD33 expression	ПР не достигнута, n (%) CR not reached, n (%)	ПР достигнута, n (%) CR achieved, n (%)	Всего, n (%) Total, n (%)
Отсутствует Absence	7 (38,9)	11 (61,1)	18 (100)
Присутствует Presence	10 (12,3)	71 (87,7)	81 (100)

Частота ПР в CD33-позитивных случаях составила 87,7 %, а в CD33-негативных – на 26 % меньше (61,1 %), различия высокодостоверны: $p = 0,007$.

Несмотря на высокую ассоциацию CD33 с достижением ПР, связи с общей выживаемостью этот антиген не имел ($p = 0,104–0,139$), хотя различия были близки к достоверным (рис. 2).

При рассмотрении кривых выживаемости в зависимости от экспрессии CD33 на бластных клетках ОМЛ обращает на себя внимание тот факт, что кривые выживаемости расходятся после 4 лет наблюдения.

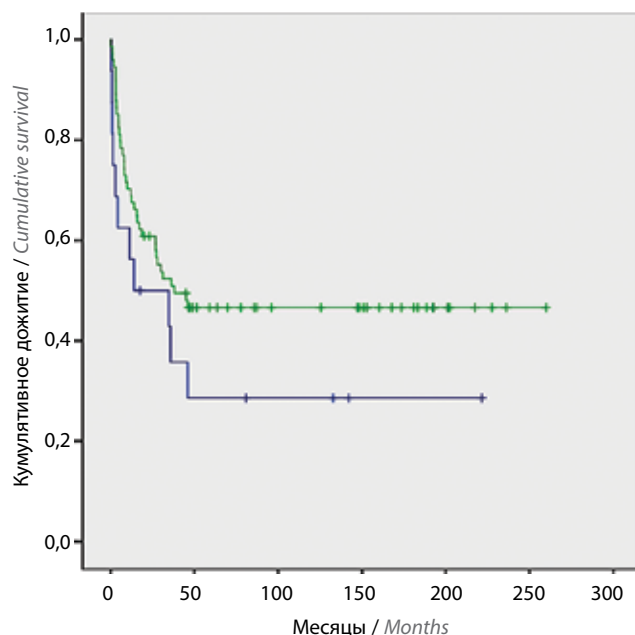


Рис. 2. Кривые общей выживаемости детей, больных острым миелоидным лейкозом, в зависимости от наличия антигена CD33 на бластных клетках. Кривая зеленого цвета — выживаемость больных, у которых CD33 присутствовал на бластных клетках ($n = 81$), кривая синего цвета — выживаемость больных с отсутствием CD33 на бластах ($n = 18$), где n — оцениваемое число больных. Различия незначительны (Лог-ранк: $p = 0,39$; Бреслоу: $p = 0,104$; Тарон-Уор: $p = 0,121$)

Fig. 2. Curves of overall survival of children with acute myeloid leukemia, depending on the presence of the CD33 antigen on blast cells. The green curve — survival rate of patients in whom CD33 was present on blast cells ($n = 81$), the blue curve — survival rate of patients in whom CD33 was absent on blasts ($n = 18$), n — number of patients. The differences are insignificant, Log-rank: $p = 0.39$; Breslow: $p = 0.104$; Taron-Ware: $p = 0.121$)

CD14

Антиген CD14 представляет собой одноцепочечный мембранный гликозилфосфатидилинозитол-связанный гликопротеин, входит в состав рецепторного комплекса, распознающего липополисахарид. Выраженная экспрессия антигена CD14 наблюдается на поверхности моноцитов, макрофагов, слабая экспрессия — на поверхности гранулоцитов. Анализ частоты ПР в зависимости от экспрессии CD14 представлен в табл. 6.

Частота ПР в CD14-негативных случаях была на 45 % выше, чем при наличии на бластах CD14, $p = 0,013$.

Лишь в соответствии с тестом Бреслоу различия в выживаемости в зависимости от экспрессии CD14 были достоверны, $p = 0,032$ (рис. 3). Экспрессия CD14 была ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Следует отметить, что количество больных в CD14-положительной группе было крайне мало (4 ребенка).

CD19

Антиген CD19 представляет собой мембранный гликопротеин I типа. CD19 — это молекула сигналь-

Таблица 6. Взаимосвязь достижения полной клинико-гематологической ремиссии (ПР) при остром миелоидном лейкозе у детей с экспрессией CD14 на бластных клетках

Table 6. Relationship between achieving complete remission (CR) in acute myeloid leukemia in children with CD14-expression on blast cells

Экспрессия CD14 CD14-expression	ПР не достигнута, n (%) CR not reached, n (%)	ПР достигнута, n (%) CR achieved, n (%)	Всего, n (%) Total, n (%)
Отсутствует Absence	1 (5,0)	19 (95,0)	20 (100)
Присутствует Presence	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (100)

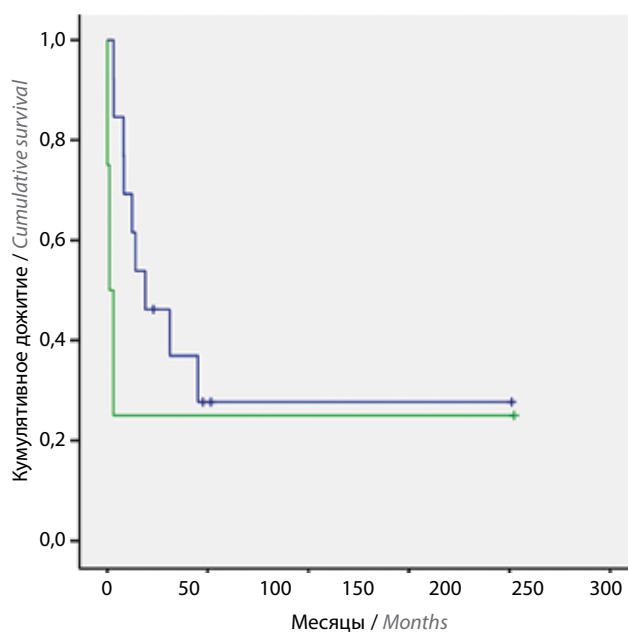


Рис. 3. Кривые общей выживаемости детей, больных острым миелоидным лейкозом, в зависимости от наличия антигена CD14 на бластных клетках. Кривая синего цвета — выживаемость больных, у которых CD14 отсутствовал на бластных клетках ($n = 20$), кривая зеленого цвета — выживаемость больных с наличием CD14 на мембране бластов ($n = 4$), где n — оцениваемое число больных. Различия достоверны только по данным теста Бреслоу (Лог-ранк: $p = 0,221$; Бреслоу: $p = 0,032$; Тарон-Уор: $p = 0,083$)

Fig. 3. Curves of overall survival of children with acute myeloid leukemia, depending on the presence of CD14 antigen on blast cells. The blue curve — the survival rate of patients in whom CD14 was absent on blast cells ($n = 20$), the green curve corresponds to patients who did not have CD14 on their blasts ($n = 4$), n — number of patients. The differences are significant only according to the Breslow test (Log-rank: $p = 0.221$; Breslow: $p = 0.032$; Taron-Ware: $p = 0.083$)

ной трансдукции, которая в составе В-клеточного рецептора регулирует процесс развития, активации и дифференцировки лимфоцитов; экспрессируется на поверхности всех нормальных В-лимфоцитов, как предшественников, так и зрелых клеток, а также

Таблица 7. Взаимосвязь достижения полной клинико-гематологической ремиссии (ПР) при остром миелоидном лейкозе у детей с экспрессией CD19 на бластных клетках

Table 7. Relationship between achieving complete remission (CR) in acute myeloid leukemia in children with CD19-expression on blast cells

Экспрессия CD19 CD19 expression	ПР не достигнута, n (%) CR not reached, n (%)	ПР достигнута, n (%) CR achieved, n (%)	Всего, n (%) Total, n (%)
Отсутствует Absence	17 (27,0)	46 (73,0)	63 (100)
Присутствует Presence	1 (4,5)	21 (95,5)	22 (100)

на нормальных плазматических клетках. Антиген может присутствовать на поверхности фолликулярных дендритических клеток и ранних клеток миело-моноцитарной линии. Он отсутствует на поверхности Т-лимфоцитов, НК-клеток, моноцитов и гранулоцитов. Это обще-В-клеточный антиген, который в ряде случаев экспрессируется на клетках ОМЛ. Анализ частоты ПР в зависимости от экспрессии CD19 проведен среди 85 больных (табл. 7).

В данной когорте больных коэкспрессия на бластных клетках лимфоидного антигена CD19 была ассоциирована с достоверно более вероятным достижением ПР: из 22 случаев коэкспрессии лишь 1 был рефрактерным, $p = 0,027$.

Важно подчеркнуть, что в анализируемой группе больных экспрессия CD19 не имела достоверной ассоциации с морфо-цитохимическим вариантом ОМЛ (табл. 8).

Таблица 8. Сопоставление ФАБ-варианта острого миелоидного лейкоза (ОМЛ) с коэкспрессией на бластах CD19

Table 8. Matching of the FAB-variant of acute myeloid leukemia (AML) with co-expression of CD19 on the blasts

ФАБ-вариант ОМЛ FAB-variant of AML	ОМЛ с коэкспрессией CD19, n (%) AML with co-expression CD19, n (%)		Всего, n (%) Total, n (%)
	CD19 ⁻	CD19 ⁺	
M0	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
M1	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (100,0)
M2	12 (63,2)	7 (36,8)	19 (100,0)
M3	4 (80,0)	1 (20,0)	5 (100,0)
M4	15 (93,8)	1 (6,2)	16 (100,0)
M5	7 (77,8)	2 (22,2)	9 (100,0)
M6	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)
M7	5 (71,4)	2 (28,6)	7 (100,0)
Итого Total	52 (77,6)	15 (22,4)	67 (100,0)

Обсуждение

Иммунофенотипирование бластных клеток при первичной диагностике острых лейкозов в настоящее время стало рутинным и обязательным исследованием. Влияние отдельных маркеров и их сочетаний на прогноз носит противоречивый характер. Исследований, посвященных прогностическому влиянию иммунофенотипа бластов при ОМЛ у детей, мало, что объясняется главным образом редкостью этого заболевания для детского возраста — его частота составляет примерно 0,7–1,2 случая на 100 тыс. детей в год, или около 20 % от общего числа детских лейкозов [1]. В настоящее время риск-стратификация детей с ОМЛ производится на основании инициального лейкоцитоза и генетических аномалий. Однако генетические aberrации с известным в настоящее время влиянием на прогноз ОМЛ детского возраста обнаруживаются лишь в 35–52 % случаев [2–6]. Поиск надежных факторов, позволяющих уточнить стратификацию пациентов на группы риска, продолжается, и, наряду с хромосомными и генными аномалиями, интерес представляют aberrации иммунофенотипа опухолевых бластов.

Известно, что некоторые из антигенов на поверхности бластных клеток имели значение для течения ОМЛ, вероятности достижения ПР и выживаемости. Однако исследования в основном включают данные взрослых пациентов с ОМЛ, описания влияния иммунофенотипических маркеров на течение и прогноз ОМЛ детского возраста — единичны [7].

Коэкспрессия на миелобластах лимфоидных маркеров в различных исследованиях ассоциировалась как с лучшими, так и с худшими показателями прогноза. Так, в исследовании R.O. Casasnovas и соавт. наличие CD19 ухудшало прогноз, а в работе E.D. Ball и соавт. при коэкспрессии CD19 наблюдались более частое достижение ПР и более длительная общая выживаемость [8, 9]. Также в недавней работе японских исследователей коэкспрессия CD19 оказала позитивное влияние на частоту достижения ПР [10]. При этом известно, что антиген CD19 достоверно ассоциирован с благоприятной хромосомной аномалией t(8;21) [11]. По нашим данным, коэкспрессия

CD19 на бластных клетках при ОМЛ у детей явилась фактором благоприятного прогноза — при ее наличии частота достижения ПР была выше, чем при ее отсутствии. Поскольку CD19 является лимфоидно-ассоциированным антигеном, мониторинг минимальной остаточной болезни в случаях CD19⁺ ОМЛ может осуществляться на основании экспрессии данного антигена.

В нашей работе отсутствие CD33 было связано с более низкой вероятностью достижения ПР. В целом в большинстве исследований наличие CD33 либо не имело значения для прогноза, либо улучшало его [12, 13].

CD14 чаще всего бывает коэкспрессирован на бластах при миеломоно- и монобластном вариантах ОМЛ (M4, M5 согласно ФАБ-классификации). В исследуемой нами когорте больных CD14 достоверно ($p = 0,037$) ассоциирован с вариантом M4 по ФАБ-классификации, ассоциации с вариантом M5 не обнаружено. В большинстве работ CD14 показал негативное значение для достижения ПР и выживаемости

[14, 15]. Наши данные подтверждают неблагоприятную роль экспрессии CD14 и при ОМЛ у детей.

В целом можно отметить, что ОМЛ является чрезвычайно гетерогенным заболеванием, и оценка ряда новых подходов, в частности, компьютерного моделирования с использованием баз знаний и экспертных систем искусственного интеллекта, основанных на морфологических и иммунофенотипических признаках клеток, может способствовать дальнейшему уточнению критериев минимальной остаточной болезни [16, 17].

Заключение

Полученные данные достоверно подтверждают значимость особенностей иммунофенотипа бластных клеток при ОМЛ у детей для достижения ПР. Это указывает на необходимость дальнейшего анализа клинических и иммунофенотипических данных детей с ОМЛ для поиска новых факторов риска и определения значимости отдельных маркеров и их сочетаний при обнаружении их в ходе измерения минимальной остаточной болезни.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Масчан А.А., Масчан М.А., Новичкова Г.А. и др. Клинические рекомендации. Острые миелоидные лейкозы. Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2020. С. 12–13. [Maschan A.A., Maschan M.A., Novichkova G.A. et al. Clinical recommendations. Acute myeloid leukemia. Ministry of Health of Russia, 2020. Pp. 12–13. (In Russ.)]
2. Coustan-Smith E., Song G., Shurtlef S. et al. Universal monitoring of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. JCI Insight 2018;3(9):e98561. DOI: 10.1172/jci.insight.98561
3. Papaemmanuil E., Gerstung M., Bullinger L. et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2016;374:2209–21. DOI: 10.1056/NEJMoa1516192.
4. Schuurhuis G.J., Heuser M., Freeman S. et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. Blood 2018;131(12):1275–91. DOI: 10.1182/blood-2017-09-801498.
5. Döhner H., Estey E., Grimwade D. et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood 2017;129(4):424–47. DOI: 10.1182/blood-2016-08-733196.
6. Jongen-Lavrencic M., Grob T., Hanekamp D. et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med 2018;378(13):1189–99. DOI: 10.1056/NEJMoa1716863.
7. Creutzig U., Harbott J., Sperling C. et al. Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. Blood 1995;86(8):3097–3108. PMID: 7579404.
8. Casasnovas R.O., Solary E., Campos L. et al. Prognostic Relevance of Surface Markers in Adult de novo Acute Myeloblasts Leukemias: A Prospective Study of the Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (G.E.I.L.). Leukemia & Lymphoma 1994;13:7–10. DOI: 10.3109/10428199409052665.
9. Ball E.D., Davis R.B., Griffin J.D. et al. Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. Blood 1991;77(10):2242–50. PMID: 1709379.
10. Noriyoshi Iriyama, Yoshihiro Hatta, Jin Takeuchi et al. CD56 expression is an independent prognostic factor for relapse in acute myeloid leukemia with t(8;21). Leukemia Research 2013;37(9):1021–26. DOI: 10.1016/j.leukres.2013.05.002.
11. Kita K., Nakase K., Miwa H. et al. Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality: frequent expression of immature B-cell antigen CD19 together with stem cell antigen CD34. Blood 1992;80:470–7. PMID: 1378322.
12. de Nully Brown P., Jurlander J., Pedersen-Bjergaard J. et al. The prognostic significance of chromosomal analysis and immunophenotyping in 117 patients with de novo acute myeloid leukemia. Leuk Res 1997;21(10):985–95. DOI: 10.1016/s0145-2126(97)00079-9.
13. Campos L., Guyotat D., Archimbaud E. et al. Surface marker expression in adult acute myeloid leukaemia: correlations with initial characteristics, morphology and response to therapy. Br J Haematol 1989;72(2):161–6. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1989.tb07677.x.
14. Bradstock K., Matthews J., Benson E. et al. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. Blood 1994;84(4):1220–5. PMID: 8049437.
15. San Miguel J.F., Ojeda E., Gonzalez M. et al. Prognostic value of immunological markers in acute myeloblastic leukemia. Leukemia 1989;3(2):108–11. PMID: 2911203.
16. Nikitaev V.G., Pronichev A.N., Polyakov E.V. et al. Bone marrow cells recognition methods in the diagnosis

of minimal residual disease. Procedia
Computer Science
2020;169:353–58.
DOI: 10.1016/j.procs.2020.02.229.

17. Buldini B., Rizzati F., Masetti R. et al.
Prognostic significance of flow-
cytometry evaluation of minimal residual
disease in children with acute myeloid

leukaemia treated according to the
AIEOP-AML 2002/01 study protocol.
Br J Haematol 2017;177(1):116–26.
DOI: 10.1111/bjh.14523.

Вклад авторов

А.Д. Палладина: получение и анализ иммунологических данных, обзор публикаций, написание текста рукописи, перевод;
А.В. Попа: получение и анализ клинических данных, анализ рукописи;
В.Г. Никитаев: анализ рукописи;
К.Л. Кондратчик: получение и анализ клинических данных;
Н.А. Купрышина, О.А. Чернышева: получение и анализ иммунологических данных;
И.Н. Серебрякова, Т.В. Шведова: получение и анализ морфоцитохимических данных;
М.А. Шервашидзе: получение и анализ клинических данных;
Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, анализ данных, анализ и подготовка рукописи.

Authors' contributions

A.D. Palladina: obtaining and analysis of immunological data, review of publications, writing the text of the manuscript, translation;
A.V. Popa: obtaining and analysis of clinical data, analysis of the manuscript;
V.G. Nikitaev: analysis of the manuscript;
K.L. Kondratchik: obtaining and analysis of clinical data;
N.A. Kupryshina, O.A. Chernysheva: obtaining and analysis of immunological data;
I.N. Serebryakova, T.V. Shvedova: obtaining and analysis of morphocytochemical data;
M.A. Shervashidze: obtaining and analysis of clinical data;
N.N. Tupitsyn: research design development, data analysis, analysis and preparation of the manuscript.

ORCID авторов/ORCID of authors

А.Д. Палладина/A.D. Palladina: <https://orcid.org/0000-0002-9400-7347>
А.В. Попа/A.V. Popa: <https://orcid.org/0000-0001-5318-8033>
В.Г. Никитаев/V.G. Nikitaev: <https://orcid.org/0000-0002-4349-3023>
Н.А. Купрышина/N.A. Kupryshina: <https://orcid.org/0000-0001-8509-0954>
И.Н. Серебрякова/I.N. Serebryakova: <https://orcid.org/0000-0002-8389-4737>
О.А. Чернышева/O.A. Chernysheva: <https://orcid.org/0000-0002-9630-5591>
М.А. Шервашидзе/M.A. Shervashidze: <https://orcid.org/0000-0002-8350-4153>
Н.Н. Тупицын/N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 18-29-09115.

Financing. This work was carried out with the financial support of the RFBR grant № 18-29-09115.

Статья поступила: 30.07.2020. Принята к публикации: 02.10.2020.

Article submitted: 30.07.2020. Accepted for publication: 02.10.2020.

СУБПОПУЛЯЦИОННАЯ СТРУКТУРА ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДОНОРОВ

А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, Э.К. Шоуа, Г.З. Чкадуа, А.И. Черткова, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова, Е.В. Огородникова, З.Г. Кадагидзе

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

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

Введение. Длительный мониторинг показателей иммунной системы у онкологических больных в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также отсутствие алгоритма иммунологического исследования и спектра значимых маркеров послужили основой проведения данного исследования.

Цель исследования — представить референсные значения и определить границы нормы для субпопуляций лимфоцитов системного иммунитета.

Материалы и методы. Исследован фенотип лимфоцитов периферической крови 186 здоровых доноров (86 мужчин и 100 женщин), средний возраст $41,9 \pm 12,5$ года. Для оценки многопараметрового фенотипа методом проточной цитометрии применяли моноклональные антитела к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD28, CD11b, CD127, HLA-Dr, TCR- γ/δ , Perforin и Granzyme B, меченные различными флуорохромами.

Результаты. Разработана панель маркеров иммунокомпетентных клеток системного иммунитета как основа оценки состояния иммунной системы онкологических больных. Даны референсные значения и границы нормы для характеристики линейной принадлежности клеток с детализацией фенотипической и функциональной неоднородности популяции CD8⁺-лимфоцитов, маркеров активации и пула наивных клеток; характеристики различных типов регуляторных клеток, функциональной активности клеток эффекторного звена иммунитета. Проведен сравнительный анализ иммунорегуляторных индексов и доказана уязвимость формулы CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ перед CD4⁺/CD8⁺ индексом.

Заключение. Спектр предложенных показателей является продуктом многолетних исследований, проводимых в лаборатории клинической иммунологии НИИ КО им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с целью поиска значимых критериев для оценки состояния иммунной системы при онкологических заболеваниях.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, эффекторные лимфоциты, системный иммунитет, границы нормы

Для цитирования: Борунова А.А., Заботина Т.Н., Шоуа Э.К. и др. Субпопуляционная структура лимфоцитов периферической крови доноров. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):54–64.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-54-64



SUBPOPULATION STRUCTURE OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF DONORS

A.A. Borunova, T.N. Zabolina, E.K. Shoua, G.Z. Chkadua, A.I. Chertkova, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova, E.V. Ogorodnikova, Z.G. Kadagidze

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

Introduction. Long-term monitoring of immune system parameters in cancer patient in FSBI “N.N. Blokhin Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of Russia, as well as the absence of an immunological research algorithm and a spectrum of significant markers, served as the basis for this study.

Purpose. To present reference values and determine the normal range for subpopulations of systemic immunity lymphocytes.

Materials and methods. The phenotype of peripheral blood lymphocytes was studied in 186 healthy donors (86 men and 100 women), mean age $41,9 \pm 12,5$ years. To assess the multivariate phenotype by flow cytometry, monoclonal antibodies to CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD28, CD11b, CD127, HLA-Dr, TCR- γ/δ , Perforin and Granzyme B labeled various fluorochromes.

Results. A panel of markers of immunocompetent cells of systemic immunity was developed as a basis for assessing the state of the immune system of cancer patients. Reference values and normal boundaries are given for characterizing the linearity of cells with detailing of the phenotypic and functional heterogeneity of the population of CD8⁺-lymphocytes, activation markers and the pool of naive cells; characteristics of various types of regulatory cells, functional activity of cells of the effector link of immunity. A comparative analysis of immunoregulatory indices was carried out and the vulnerability of the formula CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ to the CD4⁺/CD8⁺ index was proved.

Conclusion. The spectrum of the proposed indicators is the product of many years of research carried out in the laboratory of clinical immunology of the Federal State Budgetary Institution “N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, in order to search for significant criteria for assessing the state of the immune system in cancer.

Key words: T-regulatory cells, effector lymphocytes, systemic immunity, limits of the norm

For citation: Borunova A.A., Zabolotina T.N., Shoua E.K. et al. Subpopulation structure of peripheral blood lymphocytes of donors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):54–64. (In Russ.).

Введение

Нарушения иммунной системы могут привести к патологии — от аутоиммунных заболеваний (при повышенной активности) до опухолевого процесса (при ее снижении). Возможность диагностики этих нарушений ограничена не только нашим пониманием происходящих в иммунной системе процессов, но и имеющимися средствами их оценки, визуализации. Фенотипирование субпопуляций лимфоцитов, циркулирующих в периферической крови, — один из основных методов оценки состояния системного иммунитета. Современный спектр маркеров и их комбинаций раскрывает сложносоставные субпопуляции с уникальными свойствами. Но публикации, посвященные норме, носят мозаичный характер и либо отражают специфику активированных клеток, либо посвящены субпопуляциям регуляторных лимфоцитов, либо только линейным субпопуляциям клеток [1–3].

Длительный мониторинг показателей иммунной системы у онкологических больных, а также отсутствие алгоритма иммунологического исследования и спектра значимых маркеров послужили основой проведения данной работы. Исследуемая панель маркеров была обогащена показателями, характеризующими эффекторное и регуляторное звенья иммунитета. Особое внимание было уделено гетерогенности популяции CD8⁺ клеток и, как следствие, иммунорегуляторным индексам CD4⁺/CD8⁺ и CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺. Проведен анализ изменения показателей в зависимости от возраста.

Цель исследования — представить референсные значения и определить границы нормы для субпопуляций лимфоцитов.

Материалы и методы

В работе для анализа была использована периферическая кровь, полученная от здоровых доноров (отделение переливания крови ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), а также практически здоровых лиц — сотрудников центра, в рамках ежегодного профилактического осмотра в период с 2005 по 2020 г.

Проведена статистическая обработка показателей иммунной системы в группе практически здоровых людей ($n = 213$), выявлены выбросы по каждому по-

казателю ($n = 27$), которые были исключены из группы. Таким образом, в исследовании принимало участие 186 человек (86 мужчин и 100 женщин), что соответствует требованиям Международной федерации клинической химии (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC), которая рекомендует для расчета референсных интервалов использовать выборку $n \geq 120$.

Исследование субпопуляций клеточного иммунитета проводили методом проточной цитометрии с использованием цитометра FACSCalibur (BD, США). Фенотипирование лимфоцитов включало в себя 3–4-цветное окрашивание поверхностных и внутриклеточных структур с использованием различных стратегий каскадного гейтирования клеток. Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения CELLQuest, количество событий в гейте $\geq 10\,000$. Для оценки фенотипа применяли моноклональные антитела к CD45, CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD19, CD25, CD28, CD11b, CD127, HLA-Dr, TCR γ/δ , Perforin и Granzyme B, меченные различными флуорохромами (Beckman Coulter, США). Сумма Т-, В-лимфоцитов и NK-клеток составляла $100 \pm 5\%$, что соответствует требованиям системы внешней оценки качества лабораторных исследований, как отечественной (ФСВОК), так и зарубежной (CEQUAL).

Описательная статистика показателей системного иммунитета включала в себя расчет среднего значения, стандартного отклонения, 95 % доверительного интервала, минимального и максимального значения, медианы и квартилей. Для определения нижней и верхней границ показателей использовали референтные пределы 2,5 и 97,5 % для каждого показателя в соответствии с рекомендациями IFCC и ГОСТ Р 53022.3–2008.

Описательная статистика представлена для всей выборки, деление на группы по возрасту проведено в соответствии с градацией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (молодой: 18–44 года; средний: 45–59 лет; пожилой: 60–74 года). К молодому возрасту относилась половина выборки — 53,8 % (100/186), к среднему — 36,6 % (68/186), и менее 10 % — к пожилому (18/186). Средний возраст составил 41,9 года. Соотношение мужчин и женщин во всех возрастных группах было одинаковым (45 и 55 % соответственно).

Статистическую значимость различий показателей у мужчин и женщин оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента, при нормальном распределении в 2 группах, или критерия Манна–Уитни, если нормального распределения не было хотя бы в 1 из групп. Для оценки возрастных особенностей популяций применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующей попарной оценкой критерия Манна–Уитни и анализ парной корреляции по Спирмену, так как в данной выборке не было нормального распределения по возрасту ($K-S = 1,525$; $p = 0,019$). Для выявления взаимосвязи между показателями применяли анализ парной корреляции по Пирсону (при нормальном распределении признаков) или по Спирмену (при отсутствии нормального распределения). Уровень статистической значимости был определен как $p < 0,05$. Статистическую обработку проводили с помощью пакета статистических программ SPSS 17.0.

Результаты

Описательная статистика показателей субпопуляций лимфоцитов донорской группы приведена в табл. 1

Популяция CD8⁺-лимфоцитов, в отличие от CD4⁺-клеток, неоднородна. В ней были выявлены субпо-

пуляции с высокой и низкой плотностью экспрессии CD8-антигена (CD8^{hi}- и CD8^{low}-клетки). Одновременный анализ экспрессии CD3- и CD8-антигенов показал, что субпопуляция CD8^{hi}-клеток всегда является CD3-позитивной. Субпопуляция CD8^{low}-лимфоцитов может полностью отсутствовать, а ее максимальное значение не превышает 10 %. На большей части CD8^{low}-клеток отмечается отсутствие Т-клеточного антигена CD3 и наличие белков NK-клеток – CD3⁺CD16⁺CD56⁺ (рис. 1).

Анализ парной корреляции популяций CD4⁺- и CD8⁺-лимфоцитов выявил обратную зависимость этих показателей ($r = -0,453$; $p < 0,000$), при этом статистически значимой была обратная связь CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-клеток ($r = -0,376$; $p < 0,000$), тогда как корреляция между CD4⁺- и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитами была выражена слабее ($r = -0,242$; $p < 0,001$).

Сравнение 2 иммунорегуляторных индексов показало, что у соотношения CD4⁺/CD8⁺ более сильная прямая связь с показателем CD3⁺CD4⁺ ($r = 0,843$; $p < 0,000$), чем у CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ ($r = 0,733$; $p < 0,000$). Обратная зависимость CD4⁺/CD8⁺ и CD8⁺-клеток была так же более выражена ($r = -0,804$; $p < 0,000$), чем у соотношения CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD8⁺-лимфоцитов ($r = -0,790$; $p < 0,000$).

Таблица 1. Описательная статистика показателей субпопуляций лимфоцитов донорской группы ($n = 186$)

Table 1. Descriptive statistics of donor group lymphocyte subpopulation indicators ($n = 186$)

Фенотип клеток Cells phenotype	$\bar{X}$	(S)	95 % ДИ 95 % CI		Min	Max	Процентили Percentiles				
			н/г l/b	в/г u/b			2,5	25	50	75	97,5
Характеристика линейной принадлежности клеток Characterization of linear cell accessory											
CD3 ⁺	72,7	5,7	71,7	73,6	57,0	84,4	59,3	68,8	72,9	76,7	81,1
CD3 ⁺ CD4 ⁺	43,1	5,8	42,3	44,3	28,9	52,6	30,3	39,1	42,9	48,4	50,6
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,0	4,6	25,3	26,7	17,2	35,9	17,4	22,1	26,6	28,6	30,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺	7,7	2,7	7,2	8,1	1,2	12,9	2,9	5,5	7,9	8,8	10,6
CD8 ⁺	33,7	4,7	32,9	34,5	20,0	43,9	25,4	30,3	33,4	38,0	41,4
CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,7	1,0	1,7	2,0	0,1	4,8	0,1	0,9	1,9	2,3	3,7
Индекс CD4 ⁺ /CD8 ⁺ Index CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,3	0,3	1,2	1,3	0,7	2,0	0,8	1,1	1,3	1,5	2,0
Индекс CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺ Index CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺	1,7	0,5	1,6	1,8	0,8	3,3	0,9	1,3	1,6	2,1	2,8
CD3 ⁺ TCRγ/δ ⁺	3,8	1,2	3,4	4,3	0,9	7,6	1,0	2,6	3,5	5,2	7,0
CD3—CD16 ⁺ CD56 ⁺	16,1	4,7	14,9	16,5	4,8	25,0	6,4	12,6	15,6	19,0	22,8
CD8 ⁺ CD16 ⁺	7,3	3,4	6,7	7,8	0,7	16,1	1,5	5,2	6,8	9,1	12,9
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	6,2	2,8	5,8	6,8	1,0	12,8	1,4	4,2	5,8	8,2	10,1
CD3—CD19 ⁺	9,8	3,4	8,9	10,0	3,9	22,0	4,9	6,9	9,5	12,2	17,5

Окончание табл. 1

End of table 1

Фенотип клеток Cells phenotype	$\bar{X}$	(S)	95 % ДИ 95 % CI		Min	Max	Процентили Percentiles				
			н/г l/b	в/г u/b			2,5	25	50	75	97,5
Функциональная и активационная характеристика клеток Functional and activation characteristics of cells											
HLA ⁺ DR ⁺	16,4	4,7	15,5	17,2	6,6	27,0	7,0	13,5	16,4	19,8	25,0
CD3 ⁺ HLA ⁻ DR ⁺	7,3	3,4	7,0	8,2	1,7	17,7	1,9	4,3	6,9	9,9	15,2
CD25 ⁺	12,9	5,0	13,3	15,5	1,8	22,6	3,0	9,3	13,2	16,2	22,2
CD4 ⁺ CD25 ⁺	8,8	5,2	9,0	11,4	1,7	18,6	2,1	5,9	7,6	11,1	15,4
CD25 ⁺ CD127 ^{-*}	4,7	1,9	4,5	5,2	1,0	12,4	1,5	3,4	4,6	5,7	9,2
CD28 ⁺	61,3	10,2	59,9	63,1	29,6	85,9	36,9	56,1	61,6	67,1	82,3
CD4 ⁺ CD28 ⁺	42,6	5,7	41,0	44,5	28,2	52,5	30,1	38,3	43,7	47,5	50,7
CD4 ⁺ CD28 ⁻	3,4	1,2	2,9	3,8	0,5	6,2	0,5	2,1	3,3	4,8	6,1
CD4 ⁺ CD28 ^{-*}	7,5	1,2	6,5	8,5	1,1	10,1	1,5	4,4	7,7	8,6	10,1
CD8 ⁺ CD28 ⁺	17,1	5,6	16,3	17,8	5,6	29,1	6,8	14,9	17,3	20,	26,6
CD8 ⁺ CD28 ⁺	16,3	4,7	15,3	17,6	4,5	28,1	5,8	11,8	15,5	20,6	25,4
Индекс CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻ Index CD8 ⁺ CD28 ⁺ /CD8 ⁺ CD28 ⁻	1,7	0,9	1,4	1,9	0,2	4,1	0,4	0,9	1,5	2,4	3,5
CD11b ⁺	37,7	10,9	35,1	39,1	16,9	82,2	18,3	30,0	36,9	42,9	65,7
CD8 ⁺ CD11b ⁺	19,0	6,9	17,6	20,2	6,3	45,4	7,6	14,1	18,4	22,7	41,2
CD8 ⁺ CD11b ⁻	14,6	5,6	13,1	15,3	1,4	29,0	1,5	11,2	14,1	18,9	25,9
CD11b ⁺ CD28 ^{-**}	45,0	13,8	42,1	47,0	20,0	79,0	20,7	35,1	43,5	54,1	69,1
CD11b ⁺ CD28 ^{***}	9,1	6,1	7,1	9,2	1,7	35,0	1,9	4,6	7,1	13,0	26,4
CD11b ⁻ CD28 ^{-**}	5,5	4,1	5,0	7,1	0,3	19,1	0,4	2,2	5,0	8,1	15,6
CD11b ⁻ CD28 ^{***}	40,5	13,3	38,3	43,3	15,3	66,5	21,2	31,1	42,0	49,5	63,8
Оценка эффекторных клеток Evaluation of effector cells											
CD16 ⁺ Perforin ⁺	17,9	5,7	16,7	18,6	5,6	28,7	8,3	12,9	18,0	22,2	25,2
active CD16	87,2	11,7	86,4	90,2	58,4	99,6	68,0	83,3	90,5	96,0	99,6
CD8 ⁺ Perforin ⁺	12,4	3,7	11,9	13,3	2,1	20,0	4,2	9,9	12,9	15,0	18,7
active CD8	38,3	8,3	37,3	41,0	8,4	57,8	14,3	30,8	36,0	44,9	48,4
CD4 ⁺ Gr ⁺	3,2	1,1	2,7	3,7	0,1	6,9	0,1	2,0	3,1	5,0	6,7
active CD4	7,0	2,7	5,9	8,2	0,2	10,1	0,2	4,3	6,6	8,8	10,1

Примечание. Min, Max, $\bar{X}$ – минимальное, максимальное, среднее значения относительного количества лимфоцитов; (S) – стандартное отклонение; 95 % ДИ: н/г и в/г – нижняя и верхняя граница 95 % доверительного интервала среднего значения; active – доля клеток, содержащих цитолитические гранулы перфорины или гранзима в структуре CD16⁺-, CD8⁺-, CD4⁺-лимфоцитов; *доля CD25⁺CD127⁻-, Gr⁺-, CD28⁻-клеток в структуре CD4⁺-лимфоцитов; **доля клеток в структуре CD8⁺-лимфоцитов.

Note. Min, Max, $\bar{X}$ – minimum, maximum, average value of the relative number of lymphocytes; (S) – standard deviation; 95 % CI l/b and u/b the lower and upper boundary of the 95 % confidence interval of the average value; active – proportion of cells containing cytolytic granules of perforin or granzyme in the structure of CD16⁺-, CD8⁺-, CD4⁺-lymphocytes; *the proportion of CD25⁺CD127⁻-, Gr⁺-, CD28⁻-cells in the structure of CD4⁺-lymphocytes; **the proportion of cells in the structure of CD8⁺-lymphocytes.

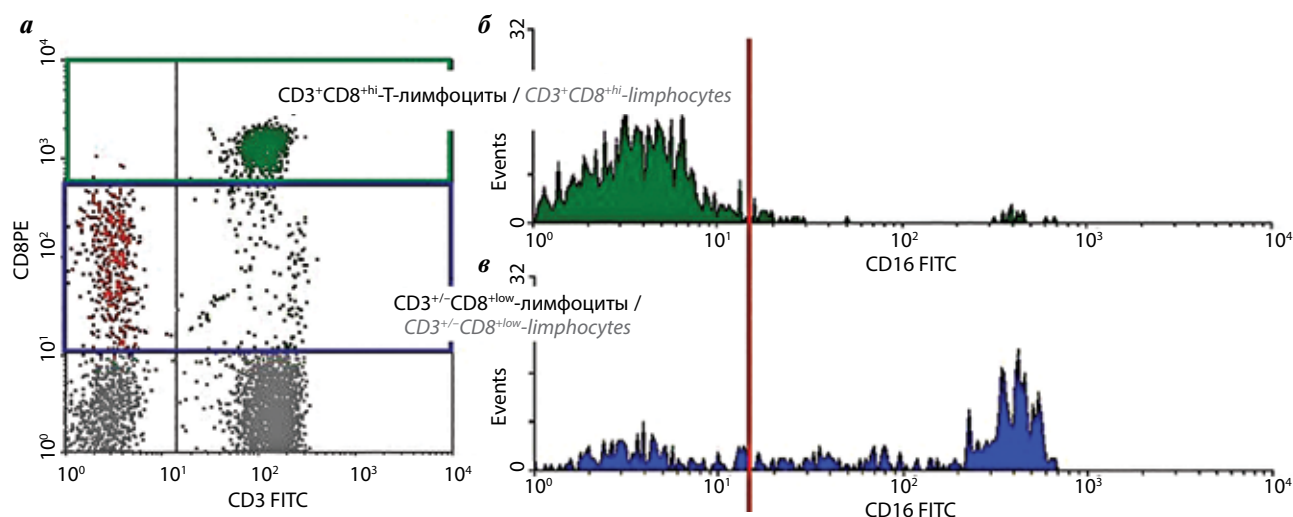


Рис. 1. Гетерогенность $CD8^+$ -лимфоцитов. На цитограмме (а) приведен DotPlot CD3 vs CD8, где красным цветом выделена популяция $CD8^{+low}$ -клеток, не несущих на своей поверхности CD3-антиген; зеленым цветом — $CD3^{+}$ -лимфоциты с высокой и низкой плотностью CD8-антигена. На гистограмме (б) показано отсутствие экспрессии CD16-антигена на поверхности $CD8^{+hi}$ -клеток; на гистограмме (в) — положительная экспрессия CD16-антигена на поверхности $CD8^{+low}$ -клеток

Fig. 1. Heterogeneity of $CD8^+$ -lymphocytes. Cytogram (a) shows DotPlot CD3 vs CD8, where the population of $CD8^{+low}$ -cells that do not expression the CD3-antigen on their surface is highlighted in red; highlighted in green are $CD3^{+}$ -lymphocytes with high and low density of CD8-antigen. The histogram (б) shows the absence of expression of the CD16-antigen on the surface of $CD8^{+hi}$ -cells; histogram (в) shows positive expression of the CD16 antigen on the surface of $CD8^{+low}$ -cells

Отмечена фенотипическая особенность Т-клеток, несущих на своей поверхности TCR- γ/δ , — высокая плотность экспрессии CD3-антигена (рис. 2). Эта популяция эффекторных лимфоцитов имеет обратную слабую связь с NK-клетками, как с $CD3^{-}CD16^{+}CD56^{+}$ ($r = -0,218$; $p < 0,045$), так и с $CD3^{-}CD8^{+}$ ($r = -0,216$; $p < 0,047$) лимфоцитами, а также с популяцией $CD8^{+}$ ($r = -0,242$; $p < 0,026$), но не с $CD3^{+}$ -клетками (в том числе $CD3^{+}CD4^{+}$, $CD3^{+}CD8^{+}$).

При анализе $CD8^{+}$ -лимфоцитов отмечено, что половина популяции имеет на своей поверхности CD28-антиген и для этих клеток характерна высокая плотность экспрессии CD8-антигена, а в $CD8^{+}CD28^{-}$ -лимфоцитах выявлялись клетки и с высокой, и с низкой плотностью. Обратная картина наблюдалась в отношении CD11b-антигена: для $CD8^{+}CD11b^{+}$ -клеток была характерна гетерогенность по плотности экспрессии CD8-антигена, тогда как клетки, лишенные CD11b-белка, были исключительно $CD8^{+hi}$ (см. рис. 2). Для определения регуляторных и эффекторных клеток в структуре $CD8^{+}$ -клеток использован многоцветный анализ с каскадным гейтированием. Одновременное исследование экспрессии CD28 и CD11b-антигенов на поверхности $CD8^{+}$ -клеток позволило оценить количество эффекторных ($CD28^{-}CD11b^{+}$), регуляторных ($CD28^{-}CD11b^{-}$), наивных ($CD28^{+}CD11b^{-}$) $CD8^{+}$ -лимфоцитов и пул эффекторных клеток ранней активации и памяти ($CD28^{+}CD11b^{+}$). Эффекторные $CD8^{+}CD28^{-}CD11b^{+}$ -лимфоциты имеют обратную слабую связь с $CD4^{+}$ -лимфоцитами ($r = -0,278$; $p < 0,000$). А субпопуляции наивных клеток и ранней активации/памя-

ти, наоборот, были прямо зависимы от Т-хелперных клеток ($r = 0,186$; $p < 0,020$ и $r = 0,177$; $p < 0,027$ соответственно).

Практически вся популяция НК-клеток у здоровых доноров содержит перфорин. А в популяции $CD8^{+}$ -лимфоцитов цитотоксическим потенциалом обладает около 40 % клеток, и между ними и количеством $CD28^{-}CD11b^{+}$ -активированных лимфоцитов отмечается заметная прямая достоверная корреляционная зависимость ($r = 0,5698$; $p < 0,000$). Обращает на себя внимание то, что перфорин содержится преимущественно в субпопуляции клеток с низкой плотностью экспрессии CD8-антигена.

Субпопуляции регуляторных $CD4^{+}$ -Т-клеток имели обратную слабую или умеренную связь с основной популяцией $CD3^{+}CD4^{+}$ -клеток: $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ ($r = -0,241$; $p < 0,001$), $CD4^{+}CD28^{-}$ ($r = -0,399$; $p < 0,006$), active CD4 ($r = -0,309$; $p < 0,037$). Между субпопуляциями $CD45^{+}CD4^{+}CD28^{-}$ и $CD45^{+}CD4^{+}Gr^{+}$ регуляторных клеток существует прямая высокая достоверная зависимость ($r = 0,887$; $p < 0,000$). Для субпопуляции $CD4^{+}CD25^{+}CD127^{-}$ -лимфоцитов была характерна прямая слабая связь с эффекторными клетками ($CD16^{+}Perforin^{+}$: $r = 0,165$; $p < 0,027$; active CD8: $r = 0,168$; $p < 0,025$) и обратная — с наивными лимфоцитами ($CD8^{+}CD28^{+}CD11b^{+}$: $r = -0,251$; $p < 0,002$).

Сравнительный анализ субпопуляций лимфоцитов у мужчин и женщин не выявил статистически значимых различий.

Чтобы изучить изменение количества субпопуляций лимфоцитов в зависимости от возраста,

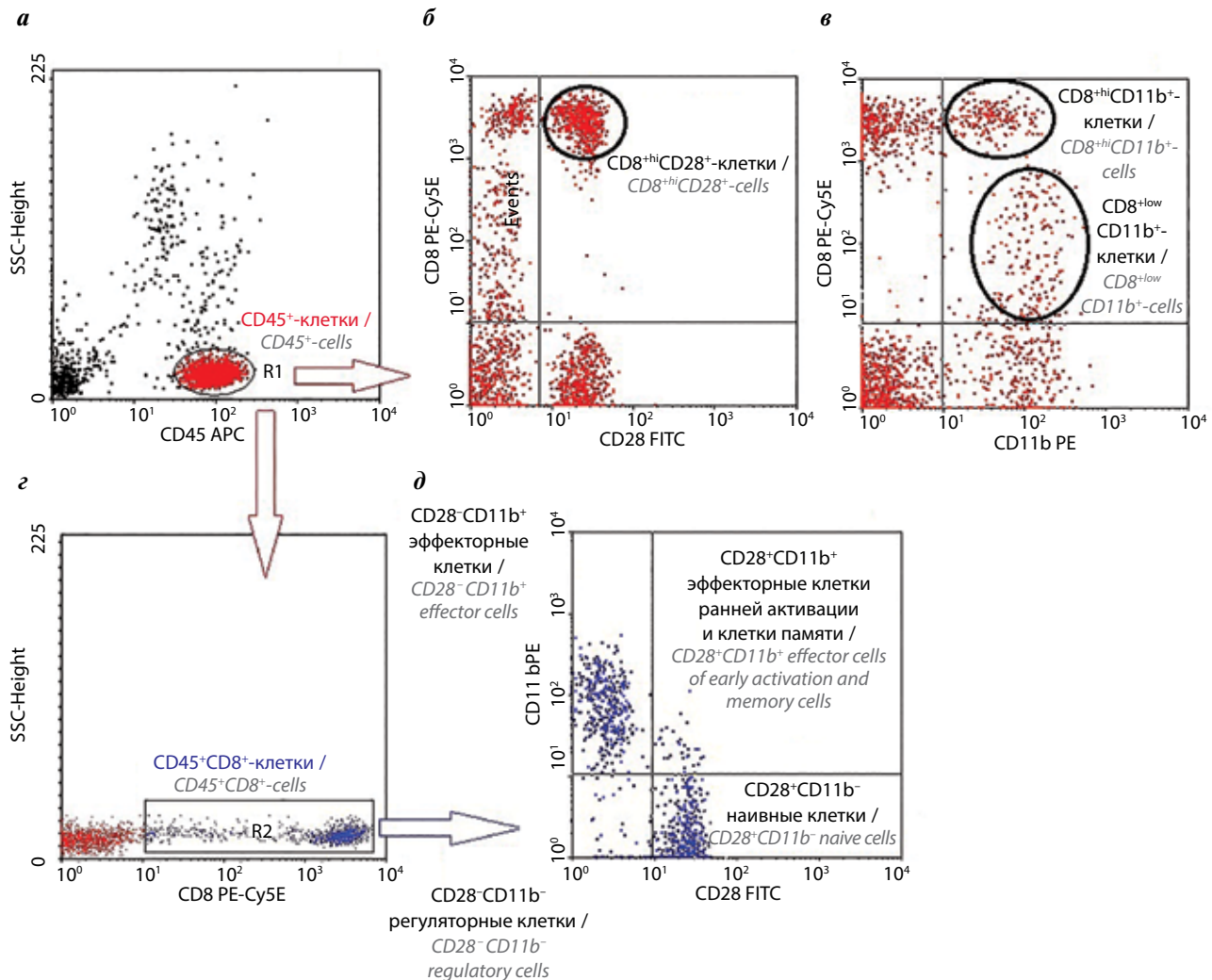


Рис. 2. Экспрессия CD28- и CD11b-антигенов на поверхности CD8⁺-клеток. На цитограмме (а) приведен пример гейтирования лимфоцитов (CD45⁺-клеток) для последующего анализа; б – в DotPlot CD28 FITC vs CD8 PE-Cy5 определяются CD8⁺CD28⁺ только с высокой экспрессией CD8-антигена; в – в DotPlot CD11b PE vs CD8 PE-Cy5 показана гетерогенность CD8⁺CD11b⁺ популяции по экспрессии CD8-антигена; г – гейтирование CD8⁺-лимфоцитов в структуре CD45⁺-клеток для последующего анализа в DotPlot CD28 FITC vs CD11b PE (д) с целью выделения субпопуляций эффекторных лимфоцитов, наивных клеток, эффекторных клеток ранней активации/клеток памяти и регуляторных лимфоцитов

Fig. 2. Expression of CD28- and CD11b-antigens on the surface of CD8⁺-cells. Cytogram (a) shows an example of gating lymphocytes (CD45⁺-cells) for subsequent analysis; б – in DotPlot CD28 FITC vs CD8 PE-Cy5, CD8⁺CD28⁺ are detected only with high expression of the CD8-antigen; в – DotPlot CD11b PE vs CD8 PE-Cy5 shows the heterogeneity of the CD8⁺CD11b⁺ population in heterogeneity of the expression of the CD8 antigen; г – gating of CD8⁺-lymphocytes in the structure of CD45⁺-cells for subsequent analysis in DotPlot CD28 FITC vs CD11b PE (д) in order to isolate subpopulations of effector lymphocytes, naive cells, early activation effector cells/memory cells and regulatory lymphocytes

здоровые доноры были разделены на 3 группы в соответствии с градацией, регламентированной ВОЗ. Между группами были выявлены статистически значимые различия в субпопуляциях, преимущественно характеризующих функциональную активность клеток иммунной системы (табл. 2). Анализ показателей линейной принадлежности клеток не выявил достоверных различий между группами. Эти наблюдения были дополнительно подтверждены методом корреляционного анализа с использованием коэффициента Спирмена.

Обсуждение

Современная иммунологическая лаборатория, осуществляющая оценку фенотипа лимфоцитов, ведет анализ своих норм – исследование практически здоровых лиц с учетом региональных особенностей населения и климатических, а где-то и экологических, аспектов. Цель нашей работы заключалась в определении референсных значений и границ нормы для субпопуляций лимфоцитов на основе разработанной в лаборатории клинической иммунологии панели маркеров иммунокомпетентных клеток

Таблица 2. Сравнительная характеристика показателей субпопуляций лимфоцитов периферической крови доноров в зависимости от возраста (n = 186)

Table 2. Comparative characteristics of peripheral blood lymphocyte subpopulation indices of donors according to age (n = 186)

Фенотип клеток Cells phenotype	Молодой возраст (18–44 года) n = 100 Young age (18–44 years) n = 100			Средний возраст (45–59 лет) n = 68 Middle age (45–59 years) n = 68			Пожилый возраст (60–74 года) n = 18 Elderly age (60–74 years) n = 18			H	U			r	p
	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3	Me	Q1	Q3		Молодой / средний возраст Young/middle age	Молодой / пожил возраст Young/elderly age	Средний / пожил возраст Middle/elderly age		
CD4 ⁺ CD8 ⁺	1,4	0,9	2,3	2,2	2,1	2,6	3,2	1,3	3,4	0,001	0,001	0,026	—	0,356	0,000
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	5,2	3,2	7,9	6,8	5,3	8,6	7,0	4,1	8,8	0,013	0,003	—	—	0,168	0,022
CD25 ⁺	12,8	9,8	15,3	15,0	12,2	16,8	16,9	13,5	20,7	0,001	0,003	0,003	—	0,269	0,000
CD4 ⁺ CD25 ⁺	7,3	5,0	9,9	8,8	7,0	11,9	12,2	6,8	17,0	0,000	0,005	0,00	0,019	0,268	0,000
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 [−]	4,1	3,0	5,0	4,6	3,4	5,9	5,8	4,2	8,0	0,000	0,009	0,001	0,029	0,321	0,000
CD8 ⁺ CD28 ⁺	18,3	16,3	20,4	16,7	11,8	19,7	11,2	5,9	16,2	0,001	0,007	0,004	0,057	−0,212	0,008
CD8 ⁺ CD28 [−]	13,8	11,3	17,2	18,4	13,6	22,2	22,2	19,5	24,6	0,000	0,000	0,001	—	0,392	0,000
Индекс CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺ CD28 [−] Index CD8 ⁺ CD28 ⁺ / CD8 ⁺ CD28 [−]	1,1	0,7	1,6	0,7	0,5	1,1	0,6	0,4	0,9	0,002	0,004	0,000	—	−0,219	0,003
CD11b ⁺ CD28 [−]	37,5	32,5	44,7	45,9	36,5	56,0	60,3	52,4	69,7	0,000	0,000	0,000	0,009	0,364	0,000
CD11b [−] CD28 [−]	3,5	1,5	6,9	5,3	3,3	9,8	8,5	4,3	8,9	0,001	0,000	—	—	−0,291	0,000
CD11b [−] CD28 ⁺	45,3	39,4	55,5	40,4	29,8	48,78	25,4	16,8	35,9	0,030	0,024	—	—	−0,269	0,001
CD8 ⁺ Perforin ⁺	12,9	9,2	14,9	13,6	11,0	16,3	17,9	14,2	20,3	0,000	0,054	0,000	0,000	0,331	0,000
active CD8	37,9	30,3	44,9	42,7	36,4	47,9	55,1	44,4	61,3	0,000	0,014	0,000	0,000	0,364	0,000

Примечание. H – критерий Краскела–Уоллеса; U – критерий Манна–Уитни; r – коэффициент корреляции Спирмена; p – статистическая значимость коэффициента корреляции Спирмена; n – количество наблюдений в группе; Me – медиана; Q1 – значение 25 перцентиля или квартиль 1; Q3 – значение 75 перцентиля или квартиль 3; active – доля клеток, содержащих цитолитические гранулы перфорина в популяции CD8⁺-лимфоцитов.

Note. H – Kruskal–Wallace test; U – Mann–Whitney criterion; r – Spearman correlation coefficient; p – statistical significance of Spearman's correlation coefficient; n – number of observations in the group; Me – median; Q1 – the value of the 25 percentile or quartile 1; Q3 – the value of the 75 percentile or quartile 3; active – proportion of cells containing cytolytic granules of CD8⁺-lymphocytes subpopulation.

системного иммунитета как основы оценки состояния иммунной системы онкологических больных.

Границы нормальных показателей для лимфоцитов в линейных популяциях (Т-клеток, в том числе $CD3^+CD4^+$ - и $CD3^+CD8^+$ -лимфоцитов, В- и NK-клеток), полученные в нашем исследовании, были сопоставимы с данными исследований как российских авторов, так и зарубежных [4–7]. Однако такие субпопуляции клеток, как NKT- или $CD3^-CD8^+$ -лимфоциты, отсутствуют в сравнительной характеристике линейных популяций у этих авторов. Следует отметить, что перераспределение в структуре линейных популяций лимфоцитов, характеризующееся снижением количества Т-клеток и увеличением NK-клеток, встречается в норме у практически здоровых лиц, проживающих в экстремальных условиях — в высокогорье или за полярным кругом [8–10]. Это может объяснять значительные отличия показателей нормы в работах китайских авторов [11].

Одной из задач нашего исследования было показать неоднородность популяции $CD8^+$ -клеток, подразделяющихся: по экспрессии CD8-антигена — на клетки с высокой и низкой плотностью; по экспрессии CD3-антигена — на $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоциты и $CD3^-CD8^+$ -NK-клетки. В большинстве отечественных публикаций под популяцией $CD8^+$ -лимфоцитов подразумевают исключительно $CD3^+CD8^+$ -клетки. И даже иммунорегуляторный индекс $CD4^+/CD8^+$ претерпел изменения, став соотношением $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ -Т-лимфоцитов [12, 13]. На наш взгляд, это 2 разных критерия. Индекс $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ характеризует состояние Т-клеток, а $CD4^+/CD8^+$ отражает баланс системного иммунитета. Как показало наше исследование, иммунорегуляторный индекс системный обладает большей силой связи с формирующими его популяциями, чем индекс Т-клеток. Разница между этими критериями состоит в наличии или отсутствии при расчете субпопуляции $CD3^-CD8^+$ -лимфоцитов. И хотя в норме эта субпопуляция может вообще не определяться, обратная зависимость между $CD3^-CD8^+$ -клетками и $CD4^+$ -лимфоцитами сильнее выражена, чем между $CD3^+CD8^+$ - и $CD4^+$ -клетками. Учитывая, что субпопуляция $CD8^+$ -NK-клеток при онкологических заболеваниях может увеличиваться до 20–30 %, приоритетным в онкоиммунологии становится $CD4^+/CD8^+$ индекс [14].

Продолжая тему гетерогенности $CD8^+$ -клеток, следует внести ясность и в вопрос выделения в их структуре субпопуляции регуляторных лимфоцитов. Существует подход, основанный на оценке экспрессии костимуляторной молекулы CD28 на их поверхности. Клетки с фенотипом $CD8^+CD28^+$ являются наивными, наличие этого белка позволяет $CD8^+$ -лимфоцитам взаимодействовать с антиген-презентирующими клетками и приобретать свою

антигенспецифичную активацию. Все $CD8^+CD28^-$ -лимфоциты принято считать регуляторными, и для упрощения даже введен индекс $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ для оценки степени иммуносупрессии [15, 16]. На наш взгляд, это некорректно, так как в этой формуле не учитываются цитотоксические Т-лимфоциты, а все клетки, не являющиеся наивными, т. е. прошедшие антигенспецифическую активацию, приравниваются к регуляторным. Тем не менее этот индекс может быть критерием, отражающим соотношение пула наивных и активированных клеток. Его снижение, имеющее неблагоприятный прогноз при онкологических заболеваниях, отражает не степень иммуносупрессии, а иммунологическую истощенность, уменьшение резерва. В свою очередь, для разделения активированных $CD8^+CD28^-$ -клеток на цитотоксические и регуляторные лимфоциты мы предлагаем использовать CD11b-антиген (молекула адгезии, необходимая для функционирования эффекторных клеток) [17]. Соответственно, $CD28^-CD11b^+$ -фенотип характерен для цитотоксических лимфоцитов, а $CD28^-CD11b^-$ -фенотип характеризует активированные лимфоциты, не ставшие киллерами, т. е. регуляторные клетки. Помимо наивных $CD28^+CD11b^-$ -лимфоцитов, в структуре $CD28^+$ -клеток можно выделить переходную субпопуляцию ранней активации, когда на поверхности клеток появляется CD11b-антиген и еще сохраняется молекула CD28. Таким же фенотипом обладают клетки памяти, когда, в обратном порядке, на фоне экспрессии CD11b молекулы адгезии появляется CD28-антиген, необходимый для взаимодействия с иммунокомпетентными клетками. Таким образом, анализ одновременной экспрессии CD28- и CD11b-антигенов на поверхности $CD8^+$ -лимфоцитов позволяет оценить эффекторные клетки, резерв наивных лимфоцитов, степень активации эффекторных механизмов и непосредственно регуляторные клетки.

CD28-антиген конститутивно представлен на всех $CD4^+$ -лимфоцитах и обеспечивает их функционирование. Его потеря переводит Т-хелперы в разряд клеток с противоречивой физиологической ролью. С одной стороны, их описывают как провоспалительные клетки с цитотоксической активностью, содержащие цитолитические гранулы перфорин и гранзим, а с другой — называют регуляторными, способными инактивировать клетки эффекторного звена иммунитета. Отличительной чертой $CD4^+CD28^-$ -лимфоцитов является аутоагрессивность, будь то эндотелий сосудов при системной красной волчанке, или вирус-инфицированные клетки, или опухолевые клетки, или же антигенспецифические эффекторные лимфоциты [18, 19]. Цитотоксические $CD4^+$ -клетки, содержащие гранзим, входят в структуру $CD4^+CD28^-$, но не все $CD4^+$ -клетки, лишенные костимуляторной

молекулы CD28, являются цитотоксическими и содержат гранзим. В рамках нашей работы эти субпопуляции рассматривались по-отдельности, однако была выявлена высокая зависимость показателей друг от друга. Правильнее было бы анализировать CD4, CD28 и Granzyme в сочетании, так как эти субпопуляции не являются равными.

Регуляторные лимфоциты и эффекторны клетки по своему действию противоположны и при патологических процессах, таких как онкологические или аутоиммунные заболевания, преобладание одних популяций сопровождается дефицитом других [20]. В нашем исследовании конкурентности обратной зависимости между регуляторными и эффекторными лимфоцитами не было выявлено. Даже наоборот, отмечалась прямая слабая связь $CD4^+CD25^+CD127^-$ -лимфоцитов с эффекторными клетками.

Основными критериями оценки функциональной активности эффекторных лимфоцитов стали: внутриклеточная экспрессия перфорина (порообразующего белка цитолитических гранул) в $CD8^+$ - и $CD16^+$ -клетках и показатель цитотоксического потенциала, вычисленный как доля перфорин-содержащих лимфоцитов в структуре $CD8^+$ - и $CD16^+$ -клеток. При онкологических заболеваниях часто встречается нормальное количество клеток эффекторов с выраженной функциональной анергией (уменьшением доли перфорин-позитивных клеток), что является неблагоприятным фактором [21, 22].

Следует обратить внимание на Т-регуляторные лимфоциты, в нашем исследовании это $CD8^+$ - или $CD4^+$ -клетки. Для их определения используется каскадное гейтирование с последующим анализом фенотипа, так значение количества $CD25^+CD127^-$ -клеток приводится из расчета на субпопуляцию $CD4^+$ -лимфоцитов, а не на весь пул $CD45^+$ -клеток периферической крови. Либо проводится выделение $CD8^+$ -лимфоцитов и в их структуре оценивается количество $CD28^-CD11b^-$ регуляторных клеток (или $CD28^+CD11b^-$, или $CD28^-CD11b^+$, или $CD28^+CD11b^+$). Однако для показателей $CD4^+CD28^-$ и $CD4^+Gr^+$ -клеток необходим дополнительный пересчет, как для оценки цитотоксического потенциала, т.е. определение доли гранзим-позитивных или $CD28^-$ -негативных клеток в структуре $CD4^+$ -лимфоцитов.

Перед нами не стояло задачи оценить зависимость иммунных показателей от возраста, поэтому изучаемая выборка доноров имеет асимметрию и представлена в основном людьми молодого и среднего возраста. Группа практически здоровых лиц пожилого возраста составляла менее 10 %. Это не по-

мешало провести исследование зависимости иммунных показателей от возраста, но отразилось на силе выявленных взаимосвязей (слабые или умеренные). Выявленные нами закономерности касались только функциональных характеристик и никак не отражались на линейных популяциях (Т-, В-, NK-клеток), что может быть следствием возрастной асимметрии исследуемой выборки. Статистически значимыми изменениями были: уменьшение с возрастом количества наивных $CD8^+$ -клеток и индекса $CD8^+CD28^+/CD8^+CD28^-$ и, наоборот, увеличение количества активированных клеток, регуляторных лимфоцитов, эффекторных клеток и их цитотоксической активности, что согласуется с данными других авторов [23].

Несмотря на уравновешенное деление исследуемой выборки по полу (в том числе в возрастных подгруппах), значимых различий между мужчинами и женщинами не выявлено.

Заключение

На основе разработанной в лаборатории клинической иммунологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России панели маркеров иммунокомпетентных клеток системного иммунитета были определены референсные значения и границы нормы субпопуляций для оценки состояния клеточного иммунитета. Использование этой панели позволит в пределах 3–4-цветного окрашивания дать комплексную характеристику субпопуляционной структуры лимфоцитов периферической крови, включая характеристики и оценку:

- линейной принадлежности клеток с детализацией неоднородности популяции $CD8^+$ -лимфоцитов;
- маркеров активации и пула наивных клеток;
- различных типов регуляторных клеток;
- функциональной неоднородности $CD8^+$ -лимфоцитов;
- функциональной активности клеток эффекторного звена иммунитета.

Был проведен сравнительный анализ иммунорегуляторных индексов и доказана уязвимость формулы $CD3^+CD4^+/CD3^+CD8^+$ перед $CD4^+/CD8^+$ индексом.

Спектр предложенных показателей является продуктом многолетних исследований, проводимых в лаборатории клинической иммунологии НИИ КО им. Н.Н. Трапезникова ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России с целью поиска значимых критериев для оценки состояния иммунной системы при онкологических заболеваниях.

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

1. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В. и др. Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста. Медицинская иммунология 2017;19(4):409–20. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V. et al. Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2017;19(4):409–20. (In Russ.)].
2. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Васильева Е.В. и др. Фенотипическая характеристика цитотоксических Т-лимфоцитов: регуляторные и эффекторные молекулы. Медицинская иммунология 2018;20(2):227–40. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-2-227-240. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Vasilyeva E.V. et al. Phenotypic characterisation of peripheral blood cytotoxic T lymphocytes: regulatory and effectormolecules. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2018;20(2):227–40. (In Russ.)].
3. Селимова Л.М., Серебровская Л.В., Калнина Л.Б. и др. Показатели иммунного статуса периферической крови доноров. Клиническая лабораторная диагностика 2014;6:40–3. [Selimova L.M., Serebrovskaya L.V., Kalnina L.B. et al. The indicators of immune status of peripheral blood of donors. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian clinical laboratory diagnostics 2014;6:40–3. (In Russ.)].
4. Савлевич Е.Л., Хайдуков С.В., Курбачева О.М. и др. Показатели клеточного иммунитета пациентов с хроническим полипозным риносинуситом. Медицинская иммунология 2017;19(6):731–8. DOI: 10.15789/1563-0625-2017-6-731-738. [Savlevich E.L., Khaidukov S.V., Kurbacheva O.M. et al. Characteristics of cellular immune status in the patients with chronic rhinosinusitis with nasal polyps. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2017;19(6):731–8. (In Russ.)].
5. Ветлугина Т.П., Лобачева О.А., Альперина Е.Л. и др. Клинико-экспериментальные исследования иммуномодулирующего эффекта амисульприда. Вестник РАМН 2012;12:13–7. [Vetlugina T.P., Lobacheva O.A., Alperina E.L. et al. Clinical and experimental research of immunomodulatory effect of amisulpride. Vestnik RAMN = Annals of the RAMS 2012;12:13–7. (In Russ.)].
6. Yi J.S., Rosa-Bray M., Staats J. et al. Establishment of normative ranges of the healthy human immune system with comprehensive polychromatic flow cytometry profiling. PLoS ONE 2019;14(12):1–18. DOI.org/10.1371/journal.pone.0225512.
7. Kokuina E., Breff-Fonseca M.C., Villegas-Valverde C.A., Mora-Díaz I. Normal Values of T, B and NK Lymphocyte Subpopulations in Peripheral Blood of Healthy Cuban Adults. MEDICC Review 2019; 21(2–3):16–21. PMID: 31373580.
8. Пашина Н.А., Романова Ю.В., Половодова Н.С. Иммунный статус коренного и пришлого населения ямало-ненецкого автономного округа. Экология человека 2007;8:19–23. [Pashina N.A., Romanova Yu.V., Polovodova N.S. Immune status of native and alien population in yamal-nenets autonomous area. Ekologiya cheloveka = Human ecology 2007;8:19–23. (In Russ.)].
9. Евсеева И.В. Показатели иммунного статуса в двух коренных этнических группах севера. Экология человека 2010;10:37–41. [Evseeva I.V. Indicator of two radical ethnic group immune status in the far north. Ekologiya cheloveka = Human ecology 2010;10:37–41. (In Russ.)].
10. Собуров К.А. Особенности иммунной реактивности у постоянных жителей горных регионов. Ульяновский медико-биологический журнал 2011;4:69–76e. [Soburov K.A. Peculiarities of immune reactivity of permanent residents of mountain regions. Ulyanovskiy mediko-biologicheskii zhurnal = Ulyanovsk medical and biological journal 2011;4:69–76e. (In Russ.)].
11. Zhang K., Wang F., Zhang M. et al. Reference Ranges of Lymphocyte Subsets Balanced for Age and Gender from a Population of Healthy Adults in Chongqing District of China. Cytometry Part B (Clinical Cytometry) 2016;90B:538–42. DOI: 10.1002/cyto.b.21323.
12. Маннанова И.В., Хохлова О.Н., Понезева Ж.Б. Клинико-иммунологические особенности хронического гепатита С в зависимости от степени фиброза печени. Практическая медицина 2018;16(9):180–2. DOI: 10.32000/2072-1757-2018-9-180-182. [Mannanova I.V., Khokhlova O.N., Ponezhova Zh.B. Clinical-immunological features of chronic hepatitis type C depending on the degree of liver fibrosis. Prakticheskaya Meditsina = Practical Medicine 2018;16(9):180–2. DOI: 10.32000/2072-1757-2018-9-180-182. (In Russ.)].
13. Саакян С.В., Балацкая Н.В., Катаргина Л.А. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови при увеальной меланоме. Медицинская иммунология 2019;21(4):765–72. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-4-765-772. [Saakyan S.V., Balatskaya N.V., Katargina L.A. et al. Subpopulation profile of peripheral blood lymphocytes in uveal melanoma. Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology 2019;21(4):765–72. (In Russ.)].
14. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Короткова О.В. и др. Связь основных показателей иммунитета с возрастом и экспрессией гормональных рецепторов у больных первично операбельным раком молочной железы. Онкогинекология 2018;4(28):21–30. [Zabotina T.N., Chertkova A.I., Korotkova O.V. et al. The relationship between immune parameters and age and expression of hormone receptors in patients with primary operable breast cancer. Onkoginekologiya = Gynecologic Oncology 2018;4(28):21–30. (In Russ.)].
15. Dai S.X., Zhang Q.F., Zheng Z.W. et al. Decreased CD8⁺CD28⁺/CD8⁺CD28[−] T cell ratio can sensitively predict poor outcome for patients with complicated Crohn disease. Medicine (Baltimore) 2017;96(26):e7247. DOI: 10.1097/md.00000000000007247.
16. Song Q., Ren J., Zhou X. et al. Circulating CD8⁺CD28[−] suppressor T cells tied to poorer prognosis among metastatic breast cancer patients receiving adoptive T-cell therapy: A cohort study. Clinical Immunotherapy 2018;20(1):126–33. PMID: 28988693. DOI: 10.1016/j.jcmt.2017.08.018.
17. Fiorentini S., Licenziati S., Alessandri G. et al. CD11b Expression Identifies CD8⁺CD28[−] T Lymphocytes with Phenotype and Function of Both Naive/Memory and Effector Cells. The Journal of Immunology 2001;166(2):900–7. DOI: https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.2.900.
18. Duftner C., Dejaco C., Hengster P. et al. Apoptotic Effects of Antilymphocyte Globulins on Human Pro-inflammatory CD4⁺CD28[−] T-cells. PLoS ONE 2012;7(3):1–10. DOI: 10.1371/journal.pone.0033939.

19. Yadav A.K. and Jha V. CD4⁺CD28null cells are expanded and exhibit a cytolytic profile in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:1689–94. DOI: 10.1093/ndt/gfr010.
20. Emoto T., Sasaki Na., Yamashita T. et al. Regulatory/Effector T-Cell Ratio Is Reduced in Coronary Artery Disease. *Circ J* 2014;78:2935–41. DOI: 10.1253/circj.CJ-14-0644.
21. Табаков Д.В., Заботина Т.Н., Захарова Е.Н. и др. Субпопуляционный баланс эффекторных клеток периферической крови онкологических больных. *Иммунология* 2019;40(3): 20–7. DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13003. [Tabakov D.V., Zabolina T.N., Zakharova E.N. et al. The subpopulation balance of effector cells in the peripheral blood of cancer patients. *Immunologiya = Immunology* 2019;40(3):20–7. (In Russ.)].
22. Чертова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К. и др. Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом. Связь с эффективностью химиотерапии. *Медицинская иммунология* 2018;20(5): 667–80. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5-667-680. [Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua E.K. et al. The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer. Relationship with efficiency of chemotherapy. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology* 2018;20(5):667–80. (In Russ.)].
23. Qin L., Jing X., Qiu Z. et al. Aging of immune system: Immune signature from peripheral blood lymphocyte subsets in 1068 healthy adults. *AGING* 2016;8(5):848–59. DOI: 10.18632/aging.100894.

ORCID авторов/ ORCID of authors

A.A. Борунова / A.A. Borunova: <https://orcid.org/0000-0002-1854-3455>
 Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <https://orcid.org/0000-0001-7631-5699>
 Э.К. Шоуа / E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>
 Г.З. Чкадуа / G.Z. Chkadua: <https://orcid.org/0000-0002-1416-0545>
 А.И. Чертова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>
 Д.В. Табаков / D.V. Tabakov: <https://orcid.org/0000-0002-1509-2206>
 Е.Н. Захарова / E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>
 Е.В. Огородникова / E.V. Ogorodnikova: <https://orcid.org/0000-0003-0644-4537>
 З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

Вклад авторов

A.A. Борунова: разработка плана исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
 Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, обсуждение и научное редактирование рукописи;
 Э.К. Шоуа, Д.В. Табаков, Е.Н. Захарова: получение данных для анализа;
 Г.З. Чкадуа, А.И. Чертова: обзор публикаций по теме статьи;
 Е.В. Огородникова: предоставление материала для исследования;
 З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Author's contributions

A.A. Borunova: developing the research design, reviewing of publications of the article's theme, data analysis and interpretation, article writing;
 T.N. Zabolina: developing the research design, manuscript discussing and assembling;
 E.K. Shoua, D.V. Tabakov, E.N. Zakharova: data collection and processing;
 G.Z. Chkadua, A.I. Chertkova: reviewing of publications of the article's theme;
 E.V. Ogorodnikova: provision of study materials;
 Z.G. Kadagidze: reviewing of publications of the article's theme, manuscript discussing and assembling.

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Минздрава России в рамках темы НИР № ААА-А-19-119022090028-6.

Financing. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of research № ААА-А-19-119022090028-6.

Статья поступила: 14.10.2020. Принята к публикации: 22.10.2020.

Article submitted: 14.10.2020. Accepted for publication: 22.10.2020.

О ВЗАИМОСВЯЗИ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В ГИБЕЛИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО A549, ИНДУЦИРОВАННОЙ CD437

А.А. Вартамян, Д.А. Хоченков, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

Введение. Синтетический ретиноид CD437, агонист γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ), не только останавливает клеточный цикл, но и, в отличие от ретиноевой кислоты, индуцирует в опухолевых клетках RAR γ -независимый апоптоз посредством уникального механизма, не зависящего от пути, опосредованного рецепторами ретиноевой кислоты.

Цель исследования — изучение взаимосвязи между апоптозом и аутофагией в CD437-индуцированной гибели клетки.

Материалы и методы. В работе были использованы: 2D-культивирование клеток карциномы легкого A549, иммуноцитохимия, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

Результаты. CD437 в диапазоне концентраций от 0,2 до 5,0 мкМ увеличивал количество PI-положительных клеток в культуре карциномы легкого A549. При концентрациях, близких к IC₅₀, ретиноид снижал популяцию клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и останавливал клеточный цикл в S-фазе. CD437 дозозависимо увеличивал количество апоптотических клеток в присутствии нецитотоксических концентраций вортманнина, необратимого ингибитора антистрессовой киназы PI-3K, и LY 294002, обратимого ингибитора. CD437 также активировал формирование аутофагосом, наблюдалось дозозависимое повышение интенсивности флуоресценции монодансилкадаверина, маркера аутофагии. Однако избирательного накопления LC-3B с возрастанием концентрации CD437 (0,1–5,0 мкМ) в клетках не наблюдалось, что позволяет сделать предположение об ингибировании слияния аутофагических вакуолей и лизосом. zVAD-fmk, необратимый ингибитор каспаз, не восстанавливал аутофагию в клетках A549, и уровень LC-3B существенно не менялся при увеличении концентрации CD437, что указывало на участие CD437 в слиянии аутофагосомы с лизосомой. При инкубировании клеток с нецитотоксическими концентрациями хлорокина, ингибитора терминальной стадии аутофагии, при концентрациях CD437, близких к IC₅₀, живых клеток практически не оставалось. Аддитивный эффект CD437 и хлорокина в индукции гибели клеток A549 предполагает, что CD437 участвует в слиянии аутофагосомы и лизосом, необходимом для завершения катаболизма аутофагического материала.

Заключение. Полученные нами данные указывают на отмену CD437 цитопротекторной функции аутофагии и запуск апоптоза, что позволяет поднять вопрос о комбинированной терапии CD437 с цитотоксическими препаратами в лечении карциномы легкого.

Ключевые слова: CD437, апоптоз, аутофагия, PI-3K-киназа, zVAD-fmk

Для цитирования: Вартамян А.А., Хоченков Д.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. О взаимосвязи аутофагии и апоптоза в гибели клеток карциномы легкого A549, индуцированной CD437. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):65–73.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-65-73



CROSSTALK BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN CD437-INDUCED A549 LUNG CARCINOMA CELL DEATH

A.A. Vartanian, D.A. Khochenkov, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov

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

Introduction. Synthetic retinoids CD437, an agonist of the gamma retinoic acid receptor (RAR γ), not only induces growth arrest, but in contrast to retinoid acid, it also induces RAR γ -independent apoptosis in many tumor cells through a unique mechanism that is independent of the retinoic acid receptor-mediated pathway.

The aim of the study was to study the relationship between apoptosis and autophagy in CD437-induced cell death.

Materials and methods. In this study we used 2D-culturing of lung carcinoma cells A549, immunocytochemistry, flow cytometry and fluorescence microscopy.

Results. CD437 at concentrations between 0.2 and 5.0 μ M increased the number of PI-positive cells in A549 lung cancer cells. The retinoid at concentrations close to IC₅₀ reduced the cell population in the G2/M-phase and arrest cell cycle in the S-phase. CD437 dose-dependent

increased the number of apoptotic cells in the presence of non-cytotoxic concentrations of wortmanin, an irreversible inhibitor of anti-stress kinase PI-3K, and LY 200192, a reversible inhibitor. CD437 also activated the biogenesis of autophagosomes, and there was a dose-dependent increase in the fluorescence intensity of monodansilkadaverine, a marker of autophagy. However, accumulation of LC-3B was not observed with an increase of CD437 concentration from 0.1 to 5.0 μM suggesting that the fusion between autophagic vacuoles and lysosomes was inhibited. zVAD-fmk, an irreversible caspase inhibitor, did not restore autophagy in A549 cells, and LC-3B levels did not change significantly with the increasing of CD437 concentration, indicating that CD437 was involved in autophagosome-lysosome fusion. When cells grew with non-cytotoxic concentrations of chlorokine, a late stage autophagy inhibitor, there were virtually no living cells at CD437 concentrations close to IC_{50} . The additive effect of CD437 and chlorokine in inducing A549 cell death confirms that CD437 involved in fusion between autophagosomes and lysosomes required for final catabolism of autophagic material.

Conclusions. The data obtained indicate that CD437 induced a failure of cytoprotective function of autophagy and apoptosis, that raise the question of combined therapy of CD437 with cytotoxic drugs in the treatment of lung carcinoma

Key words: CD437, apoptosis, autophagy, PI-3K-kinase, zVAD-fmk

For citation: Vartanian A.A., Khochenkov D.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Crosstalk between autophagy and apoptosis in CD437-induced A549 lung carcinoma cell death. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4): 65–73. (In Russ.).

Введение

Термин «ретиноиды», обозначающий семейство природных и синтетических аналогов витамина А, был введен в практику в середине 1970-х годов [1]. Фактически это была 1-я фармакологическая группа, которая обратила на себя внимание в качестве средства профилактики рака [2]. Основанием послужили наблюдения, указывающие на то, что дефицит витамина А индуцирует развитие эпителиальных дисплазий, и что здоровые ткани, предраковые состояния эпителия и эпителиальные опухоли по-разному реагируют на производные витамина А [3]. Начался поиск наиболее эффективной модификации витамина А, способной показать наилучший клинический ответ. В последние годы внимание исследователей все больше привлекает ретиноид CD437, который избирательно связывается с γ -рецептором ретиноевой кислоты (RAR γ) и трансактивирует рецептор, запускающая дифференцировку клеток [4]. Этот ретиноид также индуцирует апоптоз в различных типах опухолевых клеток с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR γ [5]. Его противоопухолевая активность была подтверждена на моделях ксенотрансплантатов животных, демонстрируя высокий потенциал для профилактики и/или лечения рака [6].

Современная цитотоксическая терапия опухоли направлена на уничтожение опухолевых клеток путем индукции в них программированной клеточной гибели 1-го типа — апоптоза. Однако атака на геном опухолевой клетки часто не дает нужной эффективности. Наиболее серьезным препятствием к повышению эффективности химиотерапии опухолей остается лекарственная устойчивость. Одной из широко обсуждаемых в последние годы причин резистентности к апоптозу является активация аутофагии — процесса, при котором эндогенные макромолекулы клетки доставляются внутрь ее лизосом и подвергаются

в них деградации [7]. Опухолевая клетка использует аутофагию для преодоления неблагоприятных условий или нехватки питательных веществ и энергии. Аутофагия в таких условиях становится альтернативным источником субстратов и энергии в опухолевой клетке. На ранних стадиях опухолевой трансформации клетки аутофагия проявляет цитопротекторный эффект, способствуя утилизации опухолеассоциированных сигнальных белков для поддержания внутриклеточного гомеостаза. На поздних стадиях заболевания, при гипоксии, лучевой терапии или действии цитотоксических противоопухолевых препаратов аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли [8].

Существование нескольких типов гибели в одной клетке позволяет допустить, что метаболические пути различных форм клеточной гибели могут встречаться, и конечная судьба клетки будет зависеть от уровня неблагоприятного воздействия. **Цель** настоящего исследования — изучение функциональных связей между апоптозом и аутофагией в гибели клетки, индуцированной CD437. Полученный нами экспериментальный материал позволяет предположить, что CD437, блокируя слияние аутофагосомы с лизосомой, отменяет цитопротекторную функцию аутофагии и запускает апоптоз.

Материалы и методы

Материалы

Набор для флуоресцентной окраски клеток Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (№ 88-8005-72) был приобретен у ThermoFisher Scientific (США). Ретиноид CD437 и монодансилкадаверин (MDC) (#D4008) приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к LC-3B (ab51520) получены от Abcam (США). Вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцеина

изотиоцианатом (goat anti-rabbit IgG — козы анти-кроличьи иммуноглобулины класса G, № STAT121F), получены от AbD Serotec (Великобритания). zVAD-fmk приобретен у BD Pharmingen (Bedford, Massachusetts, США). Вортманнин (WM), LY 200192 (LY) и хлорокин (CQ) любезно предоставлены Рябой О.О. (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Культивирование клеток

В работе были использованы клетки аденокарциномы легкого A549 (ATCC® CCL-185™). Клетки культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США); 2 мМ/мл глутамин (ПанЭко, Россия), 10 ед/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры каждые 2–3 сут с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия).

Определение апоптоза методом проточной цитометрии

Клеточные линии высаживали по 2×10^5 клеток в дуплетах на 6-луночные планшеты в полной питательной среде. Через 24 ч к клеткам добавляли WM (1,0 мкМ), CQ (20 мкМ) или LY (5 мкМ), инкубировали в течение 1 ч при 37 °С, затем вносили CD437 (0,1–5,0 мкМ) и оставляли клетки на 24 ч.

Для окрашивания клеток на ранний и поздний апоптоз использовали коммерческий набор Annexin-V FITC Apoptosis Kit. После инкубации клеток с препаратами их центрифугировали, осадок ресуспендировали в 100 мкл аннексинсвязывающего буфера, добавляли раствор, содержащий пропидий йодид и аннексин V. Клетки инкубировали при комнатной температуре, в темноте, в течение 15 мин, далее добавляли 400 мкл аннексин-связывающего буфера для остановки реакции. Анализ данных (не менее 10 тыс. событий) проводили на проточном цитофлуориметре ACEA NovoCyte (США) с использованием программного обеспечения NovoExpress. Длина волны для зеленой флуоресценции (FITC) устанавливалась в канале FL1 (515–545 нм), для красной (PE) флуоресценции — в канале FL2 (563–607 нм). Данные получали в логарифмическом измерении для обоих каналов FL1 и FL2 (FITC и PE соответственно).

Анализ клеточного цикла

После инкубации с препаратами клетки промывали и снимали с чашек Петри раствором Версена. Осадок клеток ресуспендировали в 400 мкл буфера, содержащего 50 мкг/мл пропидия йодида (Vecton

Dickinson, США), инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Флуоресценцию пропидия йодида измеряли на проточном цитометре ACEA NovoCyte, а распределение клеток по G1/G0-, S- и G2/M-фазам клеточного цикла анализировали путем определения относительного содержания ДНК в клетках с использованием программного обеспечения ModFit 3.2 software.

Анализ течения аутофагии

Клетки карциномы легкого A549 (3×10^4 клеток/лунока) высаживали на 24-луночные планшеты. После адгезии к клеткам добавляли 20 мкМ CQ, или 5 мкМ LY, или 1 мкМ WM, или ДМСО как контроль в эквиволярном количестве и инкубировали в течение 24 ч. Утром среду замещали на свежую и добавляли 0,05 ммоль MDC в RPMI-1640 без сыворотки, инкубировали 20–30 мин при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Далее клетки 3 раза промывали ледяным натрий-фосфатным буфером и немедленно определяли флуоресценцию на клеточном анализаторе In Cell Analyzer 6000 с использованием программного обеспечения In Cell Investigator (GE Healthcare, США).

Определение экспрессии LC-3B

Клетки A549 (3×10^5 клеток/лунока) высаживали на 8-луночный планшет. После адгезии к клеткам добавляли 0,2 или 3 мкМ CD437 или ДМСО как контроль в эквиволярном количестве и инкубировали клетки в течение следующих 24 ч. Далее после фиксации клеток в системе этанол–ацетон ингибировали неспецифическое связывание в 5 % растворе бычьего сывороточного альбумина и инкубировали клетки в течение 18 ч при 4 °С с поликлональными кроличьими антителами LC-3B (1 : 2000) (Abcam, США). Затем клетки промывали дважды в фосфатно-солевом буфере по 5 мин и инкубировали со вторичными антикроличьими антителами, меченными флуорохромом AlexaFluor® 488 нм (Life Technologies, США), а затем с Хекстом 33258 (ПанЭко, Россия). Клетки заключали под покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Колокализацию пунктат белка LC-3B на мембранах лизосом и интенсивность флуоресценции LC-3B анализировали на In Cell Analyzer 6000 при помощи программного обеспечения In Cell Investigator.

Статистический анализ

Все эксперименты выполняли 3 раза независимо друг от друга. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все статистические анализы проведены с использованием программного обеспечения GraphPad 5.0.

Результаты и обсуждение

Синтетический ретиноид 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталинкарбоновая кислота (CD437) является агонистом RAR γ . Многочисленные эффекты этого соединения и очевидные специфические реакции клеток на этот ретиноид затрудняют выявление общей биохимической основы механизма его действия. Одним из первых был описан эффект этого ретиноида в качестве RAR γ -агониста, приводящий к остановке клеточного цикла и дифференцировке клеток, не вызывая гибели клетки [9]. Недавно в опухолевых клетках был обнаружен другой эффект CD437 – p53-независимое повреждение ДНК [10]. CD437-опосредованное повреждение ДНК объясняет, почему большинство клеток, независимо от их чувствительности к ретиноевой кислоте, отвечают на CD437. Это также объясняет дивергентный генетический ответ на CD437. С другой стороны, p53-независимое повреждение ДНК сочетает несколько путей гибели клетки. Полученный нами экспериментальный материал указывает на то, что CD437 способствует накоплению аутофагических вакуолей, нагруженных для утилизации эндогенных компонентов клетки, однако слияния их с лизосомой не происходит: отменяется цитопротекторная функция аутофагии и активируется апоптотическая гибель клетки.

Цитотоксичность CD437 на клетках A549 была изучена в МТТ-тесте. Антипролиферативная активность препарата оценивалась по величине IC₅₀. При инкубировании клеток A549 в диапазоне концентраций CD437 от 0,1 до 10 мкМ в течение 24 ч наблюдалось ингибирование роста клеток на 30–80 %, IC₅₀

равнялась 3 мкМ. Дозозависимое снижение количества живых клеток можно объяснить как гибелью клеток (например, апоптозом), так и арестом клеточного цикла. При инкубировании клеток с 0,1–3 мкМ CD437 в течение 24 ч наблюдалось снижение популяции клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и накопление их в G1/S-фазе. На рис. 1 представлены результаты исследований концентрации 2 мкМ CD437. Наблюдается накопление клеток в S-фазе клеточного цикла (от 20 % в контроле до 42 %). Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о способности CD437 останавливать пролиферацию опухолевых клеток в S-фазе [11]. Мы также отметили, что после воздействия CD437 опухолевые клетки претерпевали морфологические изменения, характерные для апоптоза, такие как сморщивание клеток в объеме из-за потери воды, выраженная конденсация хроматина и округление ядер, ошаривание и открепление от пластика (данные не приводятся). Метод проточной цитофлуориметрии позволил дать количественную характеристику этому процессу. Доля клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК, являющаяся критерием интенсивности апоптоза, увеличивалась с повышением концентрации CD437 и достигала 42 ± 2 % к 24 ч инкубирования с 5 мкМ CD437 (рис. 2). Количество апоптотических клеток в контроле не превышало 6–8 %, что соответствовало уровню спонтанного апоптоза. Полученные нами данные о способности CD437 индуцировать апоптоз в опухолевых клетках согласуются с литературными [12].

Любое неблагоприятное воздействие воспринимается клеткой как стресс. Ответом является активация антистрессовой программы клетки, которая

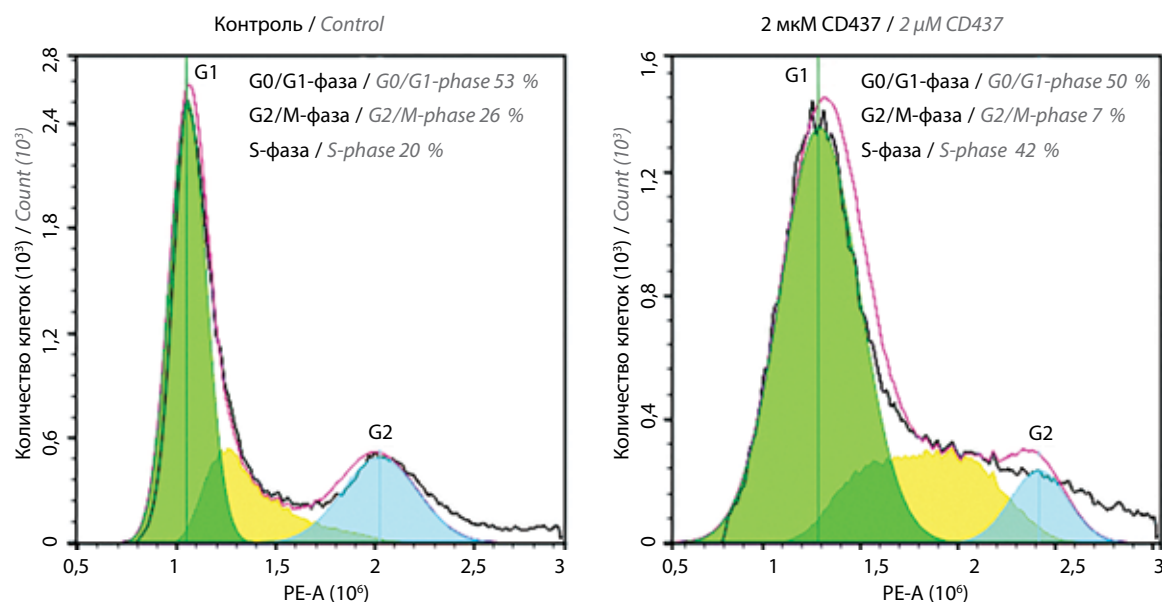


Рис. 1. Влияние CD437 на арест клеточного цикла клеток линии A549. Под воздействием CD437 наблюдается накопление клеток в S-фазе
Fig. 1. The involvement of CD437 in cell cycle arrest. Under the condition of CD437 treatment accumulation of cells in S-phase is visible

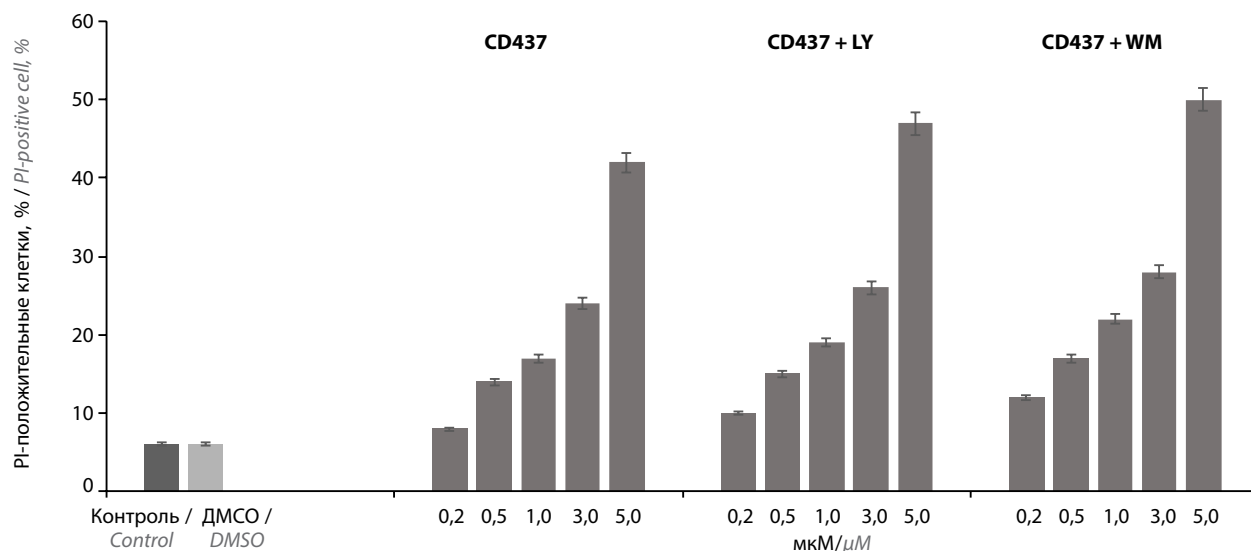


Рис. 2. Влияние CD437 (0,2–5 мкМ) на пролиферацию клеток A549

Fig. 2. The influence of CD437 (0.2–5 μM) on A549 cells proliferation

находится под контролем фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI-3K). PI-3K-сигнальный путь сегодня рассматривается как один из универсальных сигнальных путей, контролирующих ключевые функции клеток. Этот белок получает и интегрирует сигналы от факторов роста и многочисленных биомолекул, определяющих доступность аминокислот, уровень энергии и гипоксии в клетке [13]. Активация PI-3K сопровождается повышением экспрессии мезенхимальных белков, репрессии E-кадгерина и усиленной миграцией опухолевых клеток [14]. Под контролем PI-3K также находятся: передача антиапоптотического сигнала в клетке, метаболизм глюкозы, устойчивость к повреждающим воздействиям, блокада TGF-β-сигнального пути, что определяет ведущую роль этого фермента в регуляции роста и выживаемости злокачественной опухоли [15]. Разумным было бы предположить участие PI-3K-сигнального пути в CD437-индуцированной гибели клетки. В предварительных экспериментах при инкубировании клеток A549 с препаратами в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мМ были определены нецитотоксические концентрации необратимого (WM) и обратимого (LY294002) ингибиторов PI-3K. Влияние ингибиторов антистрессовой киназы на цитотоксичность CD437 исследовали предварительной инкубацией клеток в течение 1 ч с нецитотоксическими концентрациями LY294002 (5 мкМ) или WM (1 мкМ), после чего добавляли CD437 (0,1–5 мкМ), культивировали клетки в течение 24 ч и определяли количество PI-положительных клеток. Такая схема эксперимента позволяла исключить влияние токсичности ингибиторов на гибель клетки, индуцированной CD437. Оба ингибитора усиливали цитотоксический эффект

CD437 (см. рис. 2), приводя к увеличению гибели клеток A549 в среднем на 14–16 %. Необратимый ингибитор киназы усиливал цитотоксический эффект CD437 в большей степени. Полученные результаты подтвердили нашу гипотезу: антистрессовая программа клетки вносит свой вклад в гибель клеток, индуцированную CD437.

В нескольких независимых исследованиях последних лет было показано, что ингибиторы PI-3K блокируют аутофагию на стадии инициации, препятствуя образованию аутофагосом, двумембранных липидных образований, которые изолируют подлежащий уничтожению материал и расщепляют его в аутолизосоме [16]. Целью следующей части работы было подтверждение или опровержение вовлечения аутофагии в цитотоксический эффект CD437. В качестве индикатора формирования аутофагосом мы использовали окрашивание клеток MDC, флуоресцентным агентом, который избирательно взаимодействует с липидами мембран аутофагосом [17]. Как следует из рис. 3, CD437 дозозависимо повышал биогенез аутофагосом.

Конечным пунктом утилизируемого материала при процессе аутофагии является лизосома, и ингибирование функций лизосом (например, ацидификация или ферментативная деградация) способствует блокированию аутолизосом. Маркером активной аутофагии является экспрессия LC-3B. Активация аутофагии сопровождается протеолитическим расщеплением белка LC-3 (Atg8) в изоформу LC-3A. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC-3B-изоформы, которая и встраивается в мембрану аутофагосомы. В процессе формирования аутофагосомы участвует только LC-3B-изоформа

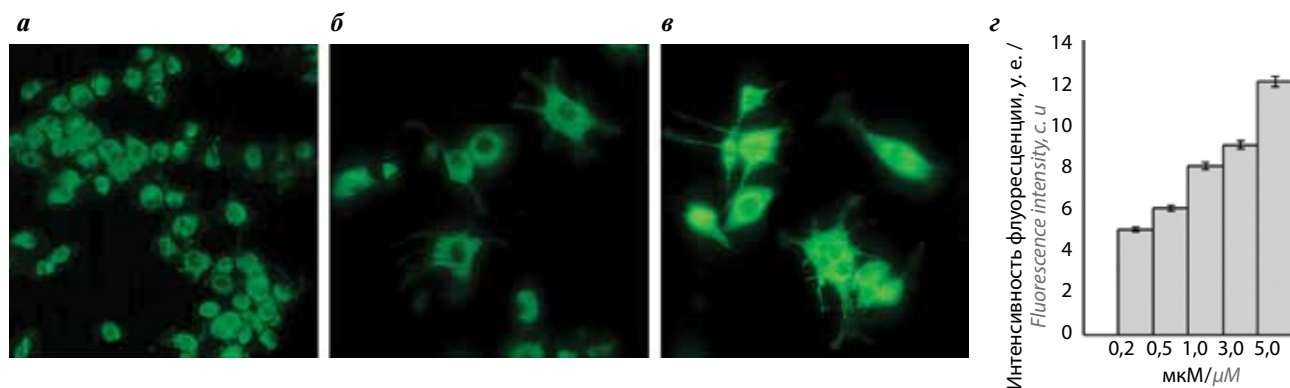


Рис. 3. Влияние CD437 на активацию аутофагии в клетках A549 (иммунофлуоресцентное окрашивание клеток монодансилкадаверином): а – контроль; б – 0,2 мкМ CD437; в – 3 мкМ CD437. ×200. Количественная характеристика процесса ($p < 0,05$) (д)

Fig. 3. CD437 activated autophagy in A549 cells (immunofluorescent staining for monodansylcadaverine): а – control; б – 0.2 μM CD437; в – 3 μM CD437. ×200. Quantitative characteristics of the process ($p < 0.05$) (d)

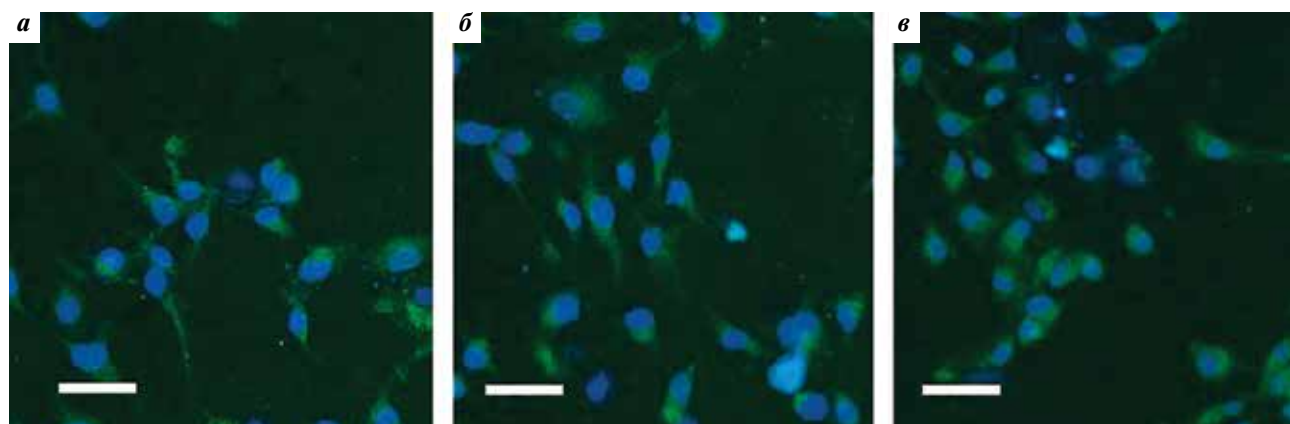


Рис. 4. Влияние CD437 на активацию аутофагии в клетках A549 (экспрессия LC-3B): а – контроль; б – 0,2 мкМ CD437; в – 3 мкМ CD437. × 200

Fig. 4. CD437 activated autophagy in A549 cells (LC-3B expression): а – control; б – 0.2 μM CD437; в – 3 μM CD437. × 200

белка [18]. Согласно литературным данным, клетки карциномы легкого A549 имеют низкий базальный уровень экспрессии данного белка, но инкубирование клеток с цитотоксическим агентом в концентрациях, приближающихся к IC_{50} , приводит к заметному повышению экспрессии белка LC-3B в опухолевой клетке [19]. На рис. 4а, б, в представлено иммуноцитохимическое окрашивание клеток A549 на экспрессию LC-3B. Можно видеть, что стимуляция аутофагии 3 мкМ CD437 существенно не влияет на экспрессию LC-3B.

Полученные нами результаты указывают на то, что CD437, по всей видимости, вовлекается в слияние аутофагосомы с лизосомой. Для подтверждения участия CD437 в активации аутофагии мы ингибировали апоптоз в клетках A549, ожидая активации аутофагии: каспазо-зависимое расщепление Beclin 1 и Atg3 было показано несколько лет назад [20]. В качестве ингибитора апоптоза мы выбрали панкаспазный ингибитор, zVAD-fmk, который не влияет на изменение трансмембранного потенциала митохондрий

и высвобождение цитохрома с, инициирующего формирование апоптосомы и активацию каспазы-3. zVAD-fmk необратимо связывается с активным центром каспаз, блокируя расщепление таргетных белков. В условиях ингибирования апоптоза 50 мкМ zVAD-fmk 3,0 мкМ CD437 не влияли на накопление аутофагосом (рис. 5а, б, в), это указывало на то, что аутофагическая вакуолизация происходит раньше и не зависит от апоптотического процесса. В условиях блокирования апоптоза уровень LC-3B при стимуляции аутофагии 1–3 мкМ CD437 практически не отличался от его экспрессии в контрольных клетках (рис. 5г, д, е), что подтверждало участие CD437 в блокировании формирования аутолизосом. Таким образом, блокирование апоптоза в клетках, которые росли с CD437, не активирует аутофагию.

Другим подтверждением участия CD437 в биогенезе аутолизосом явился аддитивный эффект CD437 и антималярийного препарата CQ – ингибитора терминальной стадии аутофагии [21]. Известно, что CQ накапливается в эндолизосомном компартменте,

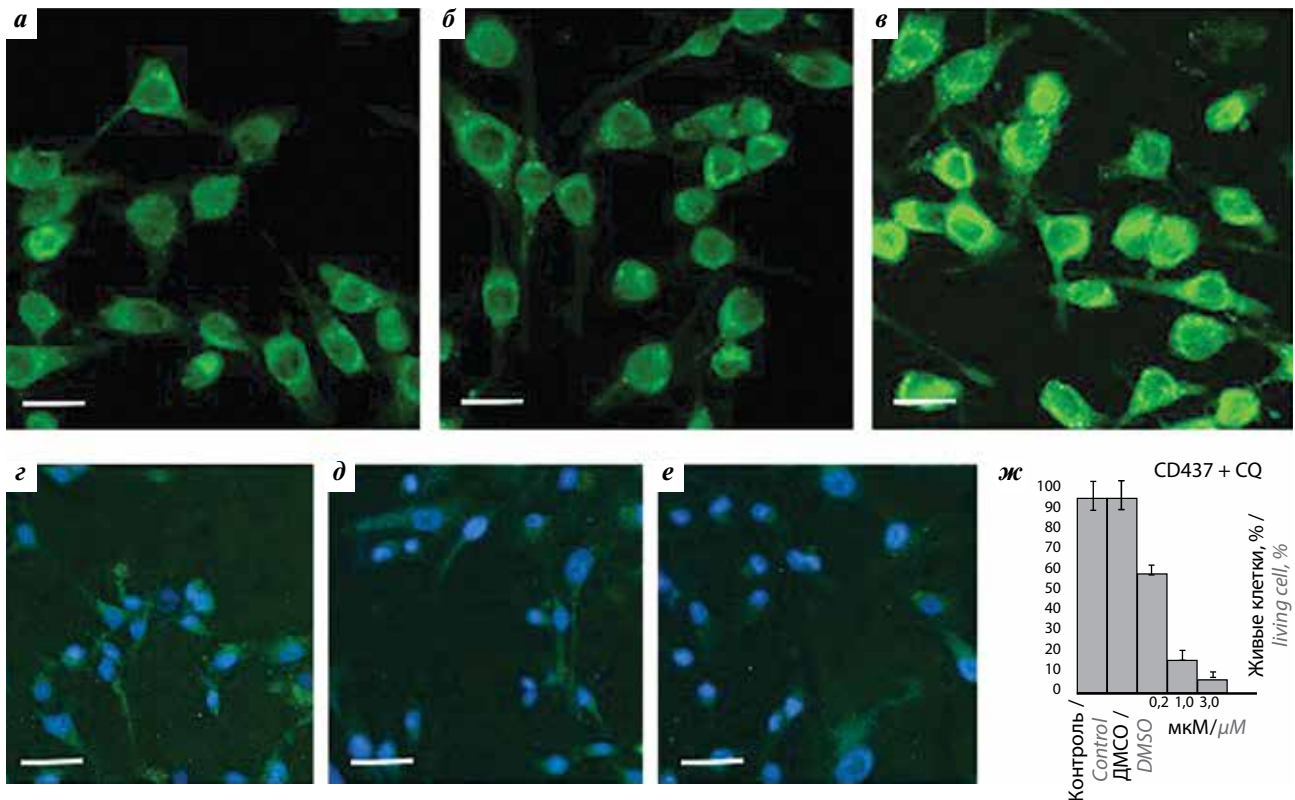


Рис. 5. CD437 блокирует слияние аутофagosомы с лизосомой: а – интенсивность флуоресценции монодансилкадаверина (MDC) в контрольных клетках; б – интенсивность флуоресценции MDC в присутствии 50 μM zVAD-fmk; в – интенсивность флуоресценции MDC в присутствии 50 μM zVAD-fmk и 3 μM CD437; г – экспрессия LC-3B в контрольных клетках; д, е – экспрессия LC-3B в присутствии 1 и 3 μM CD437 в условиях блокирования апоптоза 50 μM zVAD-fmk; ж – влияние 20 μM хлорокина (CQ), ингибитора терминальной фазы аутофагии, на гибель клеток A549, индуцированную CD437 (0,2–3,0 μM). $\times 200$

Fig. 5. CD437 disrupted autophagosome-lysosome fusion: а – immunofluorescent staining for monodansilkadaverine (MDC) of control cells; б – Immunofluorescent staining for MDC cells grown in the presence of 50 μM zVAD-fmk; в – immunofluorescent staining for MDC cells grown in the presence of 50 μM zVAD-fmk and 3 μM CD437; г – LC-3B expression in control cells; д, е – LC-3B expression in cells grown in the presence of 1 and 3 μM CD437 under conditions of apoptosis inhibition by 50 μM zVAD-fmk; ж – effect of 20 μM chloroquine (CQ), inhibitor of terminal phase of autophagy, on CD437-induced A549 cell death. $\times 200$

способствуя деацидификации лизосом и нарушая ферментативные лизосомальные функции. При воздействии на клетки 3 μM CD437 в присутствии нецитотоксических концентраций CQ (20 μM) живых клеток практически не оставалось (рис. 5ж). По всей видимости, CD437 и CQ действуют на разные мишени в слиянии аутофagosомы с лизосомой или CD437 является ингибитором других лизосомо-опосредованных функций. Таким образом, получено экспериментальное подтверждение блокирования CD437 цитопротекторной функции аутофагии.

Заключение

В России рак легкого является наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью и наиболее распространенной причиной смерти от онкологии. В случае нелеченого рака легкого 87 % больных умирают в течение 2 лет с момента установления диагноза [22]. Совместное проведение хирургического, лучевого и медикаментозного лечения позволяет повысить выживаемость больных, однако на поздних

стадиях заболевания выживаемость остается по-прежнему низкой и за последние десятилетия существенно не улучшилась.

Несмотря на то что нарушение процессов апоптоза является лишь одним из признаков инициации злокачественного новообразования, современная противоопухолевая терапия направлена, в основном, на активацию апоптоза в опухолевых клетках. Хотя существуют успехи в лечении злокачественных новообразований, проблема возникновения резистентности остается актуальной. В последние годы в качестве мишени для преодоления лекарственной резистентности активно изучается процесс аутофагии. В настоящее время достоверно известно, что нелетальный уровень стресса обычно активирует антистрессовую киназу (PI-3K) с последующей активацией аутофагии по mTOR-сигнальному пути [23]. Такой путь сегодня рассматривается как цитопротекторная функция аутофагии, когда расщепление эндогенных макромолекул в аутолизосомах обеспечивает клетку строительным материалом и энергией,

или когда поврежденные органеллы клетки должны быть удалены. Если стрессовое воздействие на клетку превышает критические значения по длительности или интенсивности, в клетках включается каспаза-зависимое расщепление белков Atg3 и Beclin 1, отменяется аутофагия и наблюдается апоптотическая гибель клетки [19]. В недавних исследованиях было показано, что ингибиторы аутофагии на основе хинолина в сочетании с традиционной химиотерапией значительно увеличивают выживаемость и улучшают качество жизни пациентов с мультицент-

ральной глиобластомой и другими солидными опухолями [24].

Ингибирование слияния аутофагосомы с лизосомой CD437, обнаруженное нами в ходе исследования, вместе с данными литературы о том, что CD437 практически не проявляет цитотоксического эффекта на нормальных бронхиальных эпителиальных клетках легкого [25, 26], позволяют поднять вопрос о возможности нового режима лечения рака легкого на основе комбинирования CD437 с цитотоксическими препаратами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wolf G. A history of vitamin A and retinoids. *FASEB J* 1996;10:1102–1107. DOI: 10.1096/fasebj.10.9.8801174.
2. Goodman G.E., Alberts D.S., Meyskens F.L. Retinol, vitamins, and cancer prevention: 25 Years of learning and relearning. *J Clin Oncol* 2008;26:5495–6. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.0884.
3. Smith W.E., Yazdi E., Miller L. Carcinogenesis in pulmonary epithelia in mice on different levels of vitamin A. *Environ Res* 1972;5:152–63. DOI: 10.1016/0013-9351(72)90030-8.
4. Zhao X., Spanjaard R.A. The apoptotic action of the retinoid CD437/AHPN: diverse effects, common basis. *J Biomed Sci* 2003;10(1):44–9. DOI: 10.1007/BF02255996.
5. Chen J.Y., Clifford J., Zusi C. Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature* 1996;382(6594):819–22. DOI: 10.1038/382819a0.
6. Garattini E., Gianni M., Terao M. Retinoid related molecules an emerging class of apoptotic agents with promising therapeutic potential in oncology: pharmacological activity and mechanisms of action. *Curr Pharm Des* 2004;10(4):433–48. DOI: 10.2174/1381612043453351.
7. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* 2015;125(1):42–6. DOI: 10.1172/JCI73941.
8. Levy J.M., Towers C.G., Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2017;17(9):528–42. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.
9. Bollag W., Isnardi L., Jablonska S. Links between pharmacological properties of retinoids and nuclear retinoid receptors. *Int J Cancer* 1997;70:470–2. PMID: 9033657.
10. Zhao X., Demary K., Wong L., Vaziri C. Retinoic acid receptor-independent mechanism of apoptosis of melanoma cells by the retinoid CD437 (AHPN). *Cell Death Differ* 2001;8(9):878–86. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400894.
11. Shyu R.Y., Lin D.Y., Reichert U. Synthetic retinoid CD437 induces cell-dependent cycle arrest by differential regulation of cell cycle associated proteins. *Anticancer Res* 2002;22(5):2757–64. PMID: 12529993.
12. Lotan R. Receptor-independent induction of apoptosis by synthetic retinoids. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17(1):13–28. PMID: 12757019.
13. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017;168:960–76. PMID: 28283069.
14. Karimi Roshan M., Soltani A., Soleimani A. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. *Biochimie* 2019;165:229–34. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.08.003.
15. Guo X., Wang X.F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 2009;19(1):71–88. DOI: 10.1038/cr.2008.302.
16. Xuefei Li, Xiaorong Hu, Jichun Wang. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Int J Mol Med* 2018;42(4):1917–24. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3794.
17. Perry C.N., Kyo S., Hariharan N. Novel methods for measuring cardiac autophagy. *Methods Enzymol* 2009;453:325–42. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)04016-0.
18. Maheswari U., Sadras S.R. Mechanism and Regulation of Autophagy in Cancer. *Crit Rev Oncol* 2018;23(5v6):269–80. DOI: 10.1615/CritRevOncol.2018028394.
19. Wang Z., Liu G., Jiang J. Profiling of apoptosis- and autophagy-associated molecules in human lung cancer A549 cells in response to cisplatin treatment. *It J Oncol* 2019;543:1071–85. DOI: 10.3892/ijo.2019.4690.
20. Wirawan E. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease* 2010;1(1):e18. DOI: 10.1038/cddis.2009.16.
21. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(5):985–1001. DOI: 10.1007/s00018-015-2104-y.
22. Мерабишвили В.М., Арсеньев А.И., Тарков С.А. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета. *Сибирский онкологический журнал* 2018;17(6):15–26. DOI.org/10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26. [Merabishvily V.M., Arseniev A.I., Tarkov S.A. Lung cancer morbidity and mortality in population, accuracy of accounting. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian journal of oncology* 2018;17(6):15–26. (In Russ.)].
23. Xu Z., Han X., Ou D., Liu T. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(2):575–87. DOI: 10.1007/s00253-019-10257-8.
24. Noonan J., Zarrer J., Murphy B.M. Targeting Autophagy in Glioblastoma. *Crit Rev Oncol* 2016;21(3–4):241–52. DOI: 10.1615/CritRevOncol.
25. Sun S.Y., Kurie J.M., Yue P. Differential responses of normal, premalignant, and malignant human bronchial epithelial cells to receptor-selective retinoids. *Cancer Res* 1999;59(2):431–7. PMID: 10037194.
26. Sun S.Y., Yue P., Chen X. The synthetic retinoid CD437 selectively induces apoptosis in human lung cancer cells while sparing normal human lung epithelial cells. *Cancer Res* 2002;62(8):2430–6. PMID: 11956107.

Благодарности

Авторы благодарят Уласова И.В. за помощь в обсуждении результатов и Рябую О.О. за предоставление ингибиторов PI-3K и хлорокина.

Acknowledgments

The authors thank I. Ulasov for valuable comments and critical reading the MS and O. Ryabaya for providing the PI-3K inhibitors, CQ and LY.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Вартанян / A.A. Vartanian: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>

Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

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

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

Вклад авторов

А.А. Вартанян: разработка концепции и дизайна статьи, сбор и обработка данных, подготовка рукописи;

Д.А. Хоченков, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных.

Author's contribution

A.A. Vartanian: developing the concept and design of the article, data collection and processing, preparation of the manuscript;

D.A. Khochenkov, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov: data collection and processing, providing research materials, data analysis and interpretation.

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-А20-120031190017-7 «Разработка и доклиническое исследование лекарственного средства BEL400, предназначенного для терапии опухолей».

Financing. This work was carried out with the financial support of the Russian Ministry of Health within the framework of experimental scientific development program № АААА-А20-120031190017-7 “Development and preclinical study of the drug BEL400 for tumor therapy”.

Статья поступила: 06.10.2020. Принята к публикации: 22.10.2020.

Article submitted: 06.10.2020. Accepted for publication: 22.10.2020.

ПОЛИАКРИЛАТ ЗОЛОТА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ

Л.А. Островская¹, Д.Б. Корман¹, Н.В. Блюхтерова¹, М.М. Фомина¹, В.А. Рыкова¹, А.К. Чигасова¹,
Е.И. Некрасова¹, К.А. Абзаева², О.О. Рябая³, Ж.П. Бурмий⁴

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН; Россия, 119334 Москва, ул. Косыгина, 4;

²ФГБУН Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН; Россия, 664033 Иркутск, ул. Фаворского, 1;

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

⁴ФГБУН Институт проблем технологии микроэлектроники и особо чистых материалов РАН;
Россия, 142432 Московская обл., Черноголовка, ул. Академика Осипьяна, 6

Контакты: Лариса Анатольевна Островская larros@list.ru

Введение. Изучение металлоорганических соединений в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов является одним из весьма перспективных направлений исследований в области экспериментальной и клинической онкологии.

Цель исследования — доклиническое изучение противоопухолевой активности препарата полиакрилата золота (аурумакрил), относящегося к новому для онкологии классу соединений металлополиакрилатов.

Материалы и методы. Противоопухолевая активность аурумакрила определялась по торможению роста солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома толстой кишки Акатол, аденокарцинома молочной железы Са-755). Цитотоксичность препарата оценивалась с использованием стандартного МТТ-теста в отношении клеточных культур опухолей человека (меланома Mel Mo, рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549, аденокарцинома толстой кишки HCT116). Влияние аурумакрила на пролиферацию опухолевых клеток MCF-7 изучено с использованием маркера клеточного деления (белок Ki-67). Фармакокинетика аурумакрила исследована путем измерения содержания золота в тканях опухоли (карцинома легких Льюис) и органов мышей (кровь, печень, почки, легкие, селезенка, мозг) с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой.

Результаты. Аурумакрил вызывает торможение развития солидных опухолей мышей на 80–90 % *in vivo*, гибель 60–90 % клеток опухолей человека *in vitro*, а также потерю репродуктивной способности клетками выжившей фракции линии MCF-7. Установлено распределение аурумакрила в организме животных опухоленосителей.

Заключение. Полученные данные о противоопухолевой активности, клеточных эффектах и фармакокинетике аурумакрила свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения препарата в качестве потенциального противоопухолевого средства.

Ключевые слова: полиакрилат золота (аурумакрил), экспериментальная противоопухолевая химиотерапия

Для цитирования: Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В. и др. Полиакрилат золота — экспериментальное изучение противоопухолевой активности. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):74–85.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-74-85



AURUM POLYACRYLATE: THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE ANTITUMOR ACTIVITY

L.A. Ostrovskaya¹, D.B. Korman¹, N.V. Blukhterova¹, M.M. Fomina¹, V.A. Rikova¹, A.K. Chigasova¹, E.I. Nekrasova¹,
K.A. Abzaeva², O.O. Riabaya³, J.P. Burmiy⁴

¹N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; 4 Kosigin St., Moscow 119991, Russia;

²A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences;
1 Favorsky St., Irkutsk 664033, Russia;

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

⁴Institute of Microelectronic Technology and Ultra-High-Purity Materials Russian Academy of Sciences;
6 Academician Osipian St., Chernogolovka 142432, Russia

Introduction. The investigation of metal substituted organic compounds as potential antitumor drugs is one of the promising areas of research in experimental and clinical oncology.

Objective. The pre-clinical study of the original antitumor drug aurum polyacrylate (aurumacryl) which belongs to such new for oncology group of compounds as polyacrylates of metals was the aim of this work.

Materials and methods. Aurumacryl antitumor activity was determined as the tumor growth inhibitory effect against some of the murine solid tumors (Lewis lung carcinoma, Acatol adenocarcinoma and Ca-755 adenocarcinoma). Drug cytotoxic effect against some of the human tumor cells (Mel-Mo melanoma, A549 lung carcinoma, MCF-7 breast carcinoma, HCT116 colon adenocarcinoma) was evaluated with standard MTT-test. The aurumacryl pharmacokinetics in tumor bearing mice (Lewis lung carcinoma) was studied. The inductively coupled plasma mass spectrometry method was used for the estimation of the aurum maintenance in the tested tissues (tumor, blood, kidneys, liver, lungs, spleen, brain).

Results. The 80–90 % tumor growth inhibitory effect of aurumacryl against some solid tumors in mice had been revealed *in vivo* as well as the death of the 60–90 % human tumor cells of various origins *in vitro*. Beside this the strong decrease of the number of proliferating MCF-7 tumor cells had been shown. The distribution of aurumacryl in the body of the mice with the solid tumor had been revealed.

Conclusion. On the base of the data obtained the further study of the aurumacryl as a potential antitumor agent seems rather promising.

Key words: aurum polyacrylate (aurumacryl), experimental antitumor chemotherapy

For citation: Ostrovskaya L.A., Korman D.B., Bluhterova N.V. et al. Aurum polyacrylate — the experimental study of the antitumor activity. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):74–85. (In Russ.).

Введение

Одним из весьма перспективных направлений исследований в области биомедицинской химии, экспериментальной и клинической онкологии признано изучение металлоорганических соединений в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов [1]. Интерес к металлоорганическим соединениям, особенно к структурам, содержащим благородные металлы, в значительной мере обусловлен открытием высокой противоопухолевой активности в ряду комплексных соединений платины, широко применяющихся в современной химиотерапии опухолей [2, 3].

Исследования последних лет выявили значительную противоопухолевую активность металлоорганических соединений, содержащих другой металл платиновой группы — золото. Показано, что золотосодержащие соединения обладают высокой цитотоксической активностью в отношении ряда стабильных клеточных линий опухолей человека *in vitro*, а также значимой противоопухолевой активностью в отношении опухолей животных *in vivo* [4–6]. Особый интерес золотосодержащие вещества вызывают в связи с тем, что предполагаемые мишени, на которые направлено их действие (митохондриальная тиоредоксин редуктаза), и механизмы этого действия (повреждение митохондриальной мембраны), отличают эти соединения от известных, клинически апробированных лекарственных средств (ЛС). Характерные химические свойства этих соединений, обусловленные наличием иона золота, определяют их особый фармакологический профиль и механизмы действия [7, 8].

Среди значительного многообразия изученных в последние годы металлоценов определенный интерес представляют металлопроизводные полиакриловой кислоты, относящиеся к новой для онкологии группе соединений, ранее в этом направлении не изучавшихся. В качестве потенциальных цитостатиков нами впервые были исследованы металлопроизвод-

ные полиакриловой кислоты, синтезированные под руководством академика М.Г. Воронкова в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН [9, 10].

Проведенное экспериментальное исследование зависимости «структура — эффект» в ряду более чем 20 металлополиакрилатов, позволило впервые обнаружить противоопухолевую активность полимерных комплексных соединений, содержащих благородные металлы [9–12]. Наиболее эффективным среди препаратов этого ряда оказался полиакрилат золота (аурумакрил), проявивший значительную противоопухолевую активность в отношении перевиваемых опухолей животных *in vivo* и стабильных клеточных линий опухолей человека *in vitro* [13–15].

В данной статье обобщены результаты экспериментального доклинического исследования аурумакрила в качестве потенциального противоопухолевого агента, включающие оценку противоопухолевой и цитотоксической активности полиакрилата золота в условиях *in vivo* и *in vitro*, изучение определенных аспектов механизма действия препарата и определение его фармакокинетики в организме животных опухоленосителей.

Цель исследования — доклиническое изучение противоопухолевой активности препарата полиакрилата золота (аурумакрил), относящегося к новому для онкологии классу соединений металлополиакрилатов.

Материалы и методы

Препарат. Исследуемое вещество с условным названием аурумакрил представляет собой неполную металлическую соль полиакриловой кислоты, содержащую ионы трехвалентного золота (массовая доля металла 8,03 мас. %). Общая формула $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOO}(\text{AuCl}_3)_m)_m$, где $n = 1263$; $m = 124$. Молекулярная масса 100–300 кДа. ИК-спектры препарата содержат полосы поглощения карбоксильной, карбоксилатной групп при 1720, 1570 cm^{-1} .

Субстанция аурумакрила — стекловидные пластинки желтого цвета, хорошо растворимые в воде [16]. В условиях *in vivo* аурумакрил вводился животным в водном растворе внутривентриально (в/б) в суточной дозе 20 мг/кг, ежедневно, 5-кратно, начиная со следующих суток после перевивки опухоли. Оценка цитотоксического эффекта аурумакрила *in vitro* проведена при применении препарата в концентрациях 1,0; 0,250; 0,125 и 0,060 мг/мл. Диапазон исследовавшихся концентраций аурумакрила был лимитирован растворимостью препарата в воде.

Лабораторные животные. Эксперименты проведены на инбредных линейных мышах BDF₁ — гибриды первого поколения $f_1(C_{57}Bl/6 \times DBA_2)$, а также мышах линии Balb/c, массой 18–20 г, из разведения питомника «Филиал «Столбовая» ФГБУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животные, полученные из питомника, после адаптации к условиям вивария (температура воздуха: 22 ± 2 °C, влажность воздуха: 55 ± 10 %, рацион: экструдированный комбикорм ПК-120–1, вода: *ex libitum*) и прохождения карантина в течение 7 сут были разделены на группы, промаркированы и размещены в отдельные клетки. В каждой серии экспериментов формировалось необходимое количество групп мышей, включающих контрольных и подвергавшихся воздействию аурумакрила животных. Размер группы составлял 6 особей грызунов, при 8–10 животных в контроле.

Модели опухолей животных. В качестве тест-систем служили солидные опухоли — карцинома легких Льюис, аденокарцинома молочной железы Са-755 (мыши BDF₁), аденокарцинома толстой кишки Акатол (мыши Balb/c). Перевивка опухолей осуществлялась в соответствии со стандартной методикой под кожу правого бока мышей измельченными фрагментами опухолевой ткани, содержащейся в 0,3 мл физиологического раствора хлористого натрия [17].

Оценка противоопухолевого эффекта *in vivo*. Показателями ретардирующего эффекта препаратов служили различия в кинетике роста опухолей и средней продолжительности жизни у леченых (Т) и контрольных (С) животных. Коэффициент торможения роста опухоли (ТРО, %) определялся из соотношения $TPO = (P_C - P_T) / P_C$ (%), где P_C и P_T — средняя масса опухоли мышей в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных. Изменение средней продолжительности жизни ($\Delta\tau$, %) определялось как $\Delta\tau = (\tau_C - \tau_T) / \tau_C$ (%), где τ_C и τ_T — средняя продолжительность жизни мышей в группах контрольных (С) и леченых (Т) животных [11, 12].

Культуры клеток. Для сравнительной оценки цитотоксического эффекта аурумакрила *in vitro* в отношении клеток опухолей человека различного генеза использованы 4 линии клеточных культур: эстро-

ген-положительная карцинома молочной железы (линия MCF-7), меланома (линия Mel Mo), эпителиоидный рак легкого (линия A549), аденокарцинома толстой кишки (линия HCT116), полученных из банка опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Цитотоксичность аурумакрила оценивалась путем определения доли выживших клеток по отношению к контролю с использованием стандартного МТТ-теста [17] в соответствии с ранее описанной методикой [18].

Изучение влияния аурумакрила на пролиферацию опухолевых клеток проведено иммуноцитохимическим методом с использованием маркера клеточного деления — белка Ki-67 в культуре клеток карциномы молочной железы MCF-7. Этот белок, как известно, присутствует в ядрах делящихся клеток, но отсутствует в покоящихся клетках [13, 14].

Фармакокинетика. Распределение аурумакрила в организме животных-опухоленосителей (карцинома легких Льюис) определялось путем измерения содержания золота в тканях опухоли и органов (кровь, печень, почки, легкие, селезенка, мозг) мышей с помощью метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (МС-ИСП). Аурумакрил вводился в дозе 100 мг/кг в/б однократно на 7-е сутки развития опухоли. Образцы биологического материала отбирались через 0,5; 1; 3; 4; 24 и 48 ч после введения аурумакрила. Проводилось определение массы извлеченных для исследования тканей, а также разделение крови на плазму и сыворотку путем центрифугирования в течение 10 мин при 3000 об/мин. Параллельно осуществлялись исследования контрольных животных, не получавших препарат [19]. Процедура МС-ИСП определения золота в биологических материалах проводилась в соответствии с ранее описанной методикой [20].

Статистический анализ результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета компьютерных программ Statistica 6.0 и Statistica 8.0. Результаты представлены как среднее из 12 индивидуальных измерений для каждого экспериментального животного. Оценка достоверности различий между сравниваемыми параметрами проведена помощью t-критерия Стьюдента. Различия признаются достоверными при условии, что вычисленные значения t превышают значения критерия Стьюдента $t_{0,1}$ для определенных уровней значимости ($p \leq 0,01$) при заданном числе степеней свободы f [17].

Результаты исследования

Противоопухолевая активность аурумакрила *in vivo*

Противоопухолевая активность аурумакрила установлена на моделях солидных опухолей мышей —

карциноме легких Льюис, аденокарциноме толстой кишки Акатол, аденокарциноме молочной железы Са-755, при ежедневном введении препарата в суточной дозе 20 мг/кг в/б, 5-кратно, начиная со следующих суток после перевивки опухоли.

Отметим, что применявшаяся суточная доза препарата в 5 раз меньше максимально переносимой дозы аурумакрила, равной при его однократном в/б введении 100 мг/кг, в то время как срединная летальная доза (LD_{50}) аурумакрила для мышей составляет 150 мг/кг.

Как видно из представленных на рис. 1 и в табл. 1 данных, аурумакрил тормозит развитие всех 3 изученных солидных опухолей мышей — карциномы легких Льюис, аденокарциномы Акатол и аденокарциномы Са-755 — на 80–90 %. При этом средняя продолжительность жизни животных с аденокарциномой Са-755 увеличивается на 31 % по сравнению с контролем.

Эффективность аурумакрила *in vitro*

Исследование эффектов аурумакрила в условиях *in vitro* включало сравнительную оценку цитотоксического эффекта аурумакрила в отношении клеток опухолей человека различного генеза (меланома Mel Mo, рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549, аденокарцинома толстой кишки HCT116), а также изучение его влияния на кинетику клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток MCF-7.

Установлено, что аурумакрил обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от времени воздействия препарата, его концентрации и природы опухолевых клеток.

Выживаемость опухолевых клеток в зависимости от концентрации аурумакрила охарактеризована данными, представленными на рис. 2 и демонстрирующими, что аурумакрил оказывает дозозависимое цитотоксическое действие на клетки всех изученных опухолей — даже в сравнительно небольших концентрациях. При применении препарата в наиболее высокой из изученных концентраций, равной 0,25 мг/мл, доля погибших клеток составляет 63–92 %, изменяясь в этих пределах в зависимости от типа культур опухолевых клеток.

Полученные данные позволяют дифференцировать клетки опухолей человека различной природы по чувствительности к препарату аурумакрил. Так, наибольшую чувствительность к действию аурумакрила проявляют клетки меланомы Mel Mo — доля погибших клеток составила более 90 %. Максимальная гибель клеток рака легкого A549 и рака молочной железы MCF-7 составляет 74 %. Наименьшей чувствительностью к аурумакрилу обладают клетки рака толстой кишки HCT116, гибель которых отмечена на уровне 63 % (табл. 2).

Расчетные значения концентрации аурумакрила, вызывающей гибель 50 % опухолевых клеток ($ИК_{50}$) (см. табл. 2), показывают, что цитотоксичность аурумакрила наиболее выражена в отношении клеток рака легкого A549, меланомы Mel Mo и молочной железы MCF-7. Для этих клеточных культур показатель $ИК_{50}$ изменяется в пределах от 60 до 80 мкг/мл. Существенно меньшую цитотоксичность аурумакрил проявляет в отношении клеток рака толстой кишки HCT116, $ИК_{50}$ для данной линии клеток составляет 180 мкг/мл.

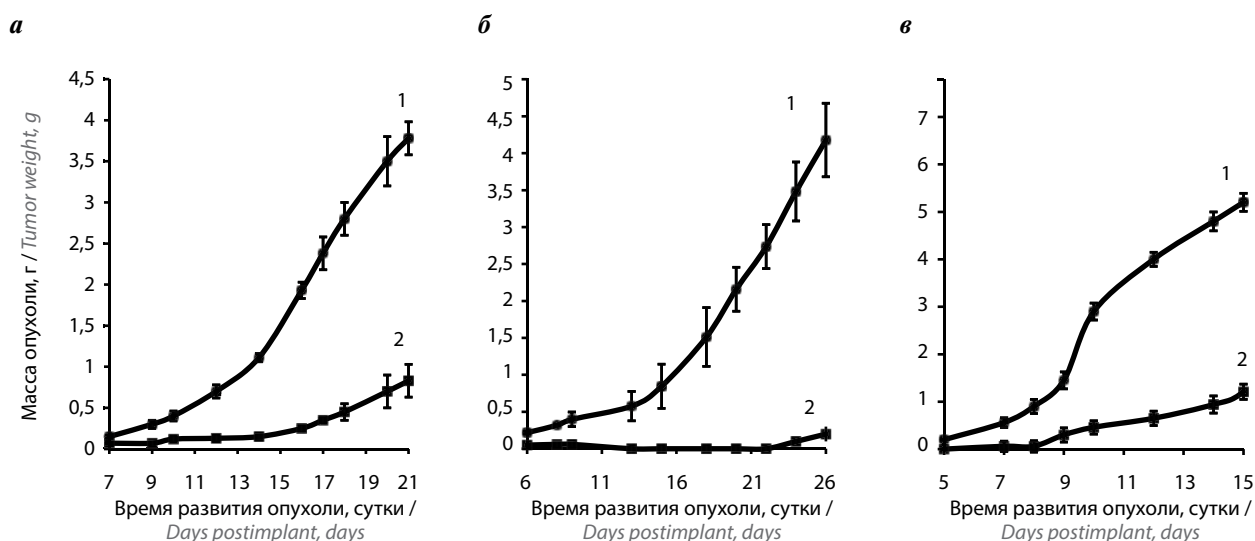


Рис. 1. Противоопухолевая активность аурумакрила на моделях карциномы легких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б), аденокарциномы Са-755 (в): 1 — контроль, 2 — аурумакрил, 20 мг/кг/сутки, в/б, 1–5-е сутки после перевивки опухоли

Fig. 1. Aurumacryl antitumor activity against Lewis lung carcinoma (a), Acatol adenocarcinoma (б) and Ca-755 adenocarcinoma (в): 1 — control, 2 — aurumacryl, 20 mg/kg/day, intraperitoneally (i/p), 1–5 days postimplant

Таблица 1. Противоопухолевая активность аурумакрила на моделях солидных опухолей мышей (введение препарата в суточной дозе 20 мг/кг, 1–5-е сутки развития опухоли, в/б)

Table 1. Antitumor activity of aurumacryl against the murine solid tumor models (intraperitoneal injection at a daily dose of 20 mg/kg, from day 1 to 5 post implantation)

Штамм опухоли Tumor strain	Время оценки эффекта (сут) The time of the effect evaluation (day)	Средняя масса опухоли (г) The mean tumor weight (g)		Торможение роста опухоли (ТРО, %) Coefficient of the tumor growth inhibition (TGI, %)	Критерий Стьюдента Student t -criteria, $f = 11$ $p \leq 0,01$
		Леченные мыши Treated mice	Контрольные мыши Control mice		
Карцинома легких Льюис Lewis lung carcinoma	21	$0,8 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,5$	80	$t = 21,4 > t_{0,1} = 4,44$
Аденокарцинома Акатол Acatol adenocarcinoma	27	$0,5 \pm 0,1$	$4,7 \pm 0,6$	90	$t = 24,7 > t_{0,1} = 4,44$
Аденокарцинома Са-755 Ca-755 adenocarcinoma	15	$1,2 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,5$	77*	$t = 28,5 > t_{0,1} = 4,44$

*На модели аденокарциномы Са-755 увеличение средней продолжительности жизни леченых животных составляет 31 % по сравнению с контролем. Средняя продолжительность жизни мышей в группах леченых и контрольных животных составляет $35,2 \pm 6,8$ и $26,8 \pm 7,2$ сут соответственно.

*The mean life span of treated animals with Ca-755 adenocarcinoma was extended by 31 % compared with the control. The mean life span of mice in groups of treated and control animals was 35.2 ± 6.8 and 26.8 ± 7.2 days, respectively.

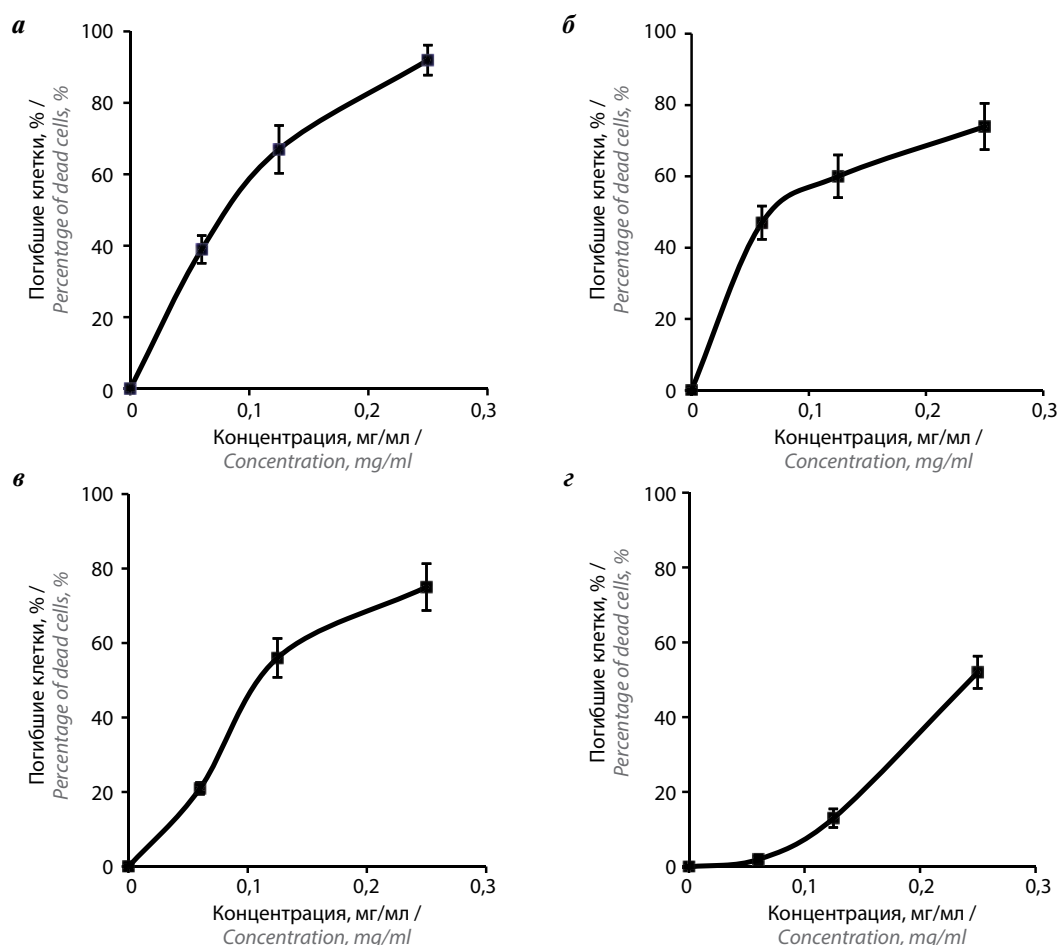


Рис. 2. Изменение доли погибших клеток в зависимости от концентрации аурумакрила для ряда клеточных культур опухолей человека: а – меланома Mel Mo; б – рак легкого A549; в – рак молочной железы MCF-7; г – аденокарцинома толстой кишки HCT116

Fig. 2. Variation in the percentage of died cells vs. aurumacryl concentration in cell cultures of human tumors: а – Mel-Mo melanoma; б – A549 lung carcinoma; в – MCF-7 breast; г – HCT116 colon adenocarcinoma

Таблица 2. Цитотоксический эффект аурумакрила для клеток ряда опухолей человека *in vitro*

Table 2. The aurumacryl cytotoxic effect against some human tumor cells *in vitro*

Клеточная линия опухоли человека Human tumor cell line	Максимальная доля погибших клеток (%) * The maximal percentage of died cells (%) *	ИК ₅₀ (мкг/мл) IC ₅₀ (μg/mL)
Рак легкого A549 A549 lung carcinoma	74	60
Меланома Mel Mo Mel-Mo Melanoma	92	80
Рак молочной железы MCF-7 MCF-7 breast carcinoma	74	90
Рак толстой кишки HCT116 HCT116 colon adenocarcinoma	63	180

*Концентрация аурумакрила – 250 мкг/мл.

*Aurumacryl concentration – 250 μg/mL.

Примечание. ИК₅₀ – концентрация аурумакрила, вызывающая гибель 50 % опухолевых клеток (расчетные значения).

Note. IC₅₀ – the aurumacryl concentration that causes 50 % tumor cell death (calculated values).

Влияние аурумакрила на кинетику клеточной пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток MCF-7 иллюстрируют данные, представленные на рис. 3 и 4. Как видно из рисунков, интенсивность пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток претерпевает под влиянием аурумакрила значительные изменения по сравнению с контролем, наиболее выраженные при применении препарата в самой высокой из изученных доз – 1 мг/мл.

Показано, что препарат вызывает накопление клеток, находящихся в фазе пролиферативного покоя G₀. Доля «покоящихся» клеток через 24 ч инкубации возрастает с 40 %, наблюдающихся в контроле, до 93 %, регистрируемых на этот срок при воздействии препарата в концентрации 1 мг/мл (см. рис. 3). Наряду с этим, среди выживших клеток наблюдается уменьшение под влиянием аурумакрила доли делящихся клеток. Так, после инкубации опухолевых клеток с препаратом в концентрации 1 мг/мл на протяжении 24 ч доля делящихся клеток уменьшается с 60 %, регистрируемых в это время в контроле, до 7 % (см. рис. 4).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что аурумакрил обладает выраженным цитотоксическим и цитостатическим действием, вызывая как гибель клеток, так и значительные изменения интенсивности клеточной пролиферации выжившей

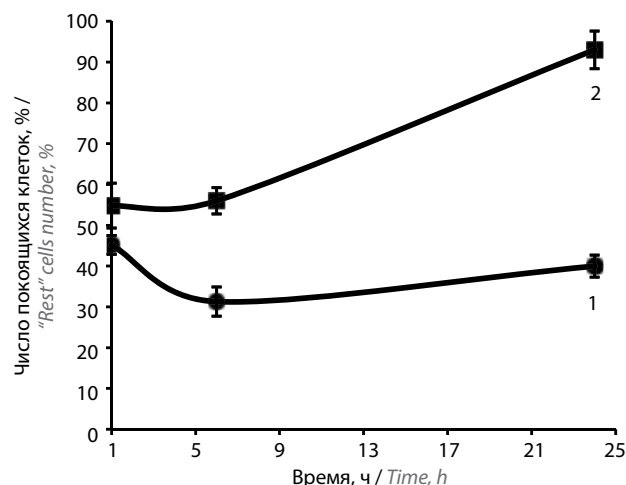


Рис. 3. Влияние аурумакрила на кинетику изменения доли покоящихся клеток MCF7: 1 – контроль; 2 – аурумакрил, 1 мг/мл

Fig. 3. Kinetics of the alteration of the MCF7 "rest" (G₀) cells number under action of aurumacryl: 1 – control; 2 – aurumacryl, 1 mg/ml

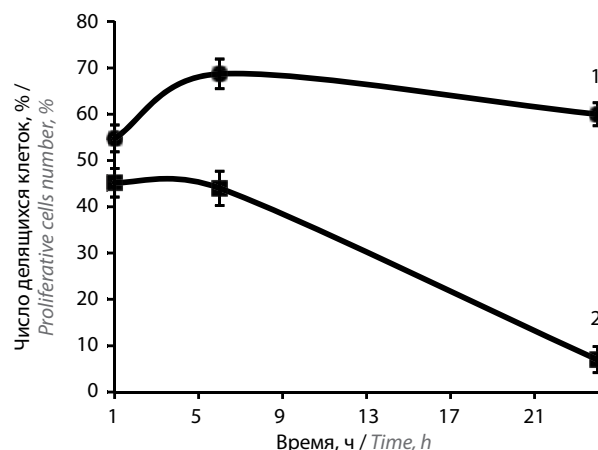


Рис. 4. Влияние аурумакрила на кинетику изменения доли делящихся клеток MCF7: 1 – контроль; 2 – аурумакрил, 1 мг/мл

Fig. 4. Kinetics of the alteration of the MCF7 proliferative cells number under action of aurumacryl: 1 – control; 2 – aurumacryl, 1 mg/ml

фракции опухолевых клеток, что подтверждается снижением доли делящихся клеток.

Фармакокинетика аурумакрила

Исследование фармакокинетики новых ЛС является, как известно, обязательным этапом их изучения, имеющим важное значение для разработки оптимальных схем и режимов применения препаратов, а также для понимания механизмов их действия.

Фармакокинетические кривые, характеризующие распределение аурумакрила в организме животных с карциномой легких Льюис, представлены на рис. 5.

Анализ приведенных зависимостей свидетельствует о том, что препарат после в/б внесосудистого введения обнаруживается через 30 мин в кровяном русле, в опухоли и в исследуемых органах (печень, почки,

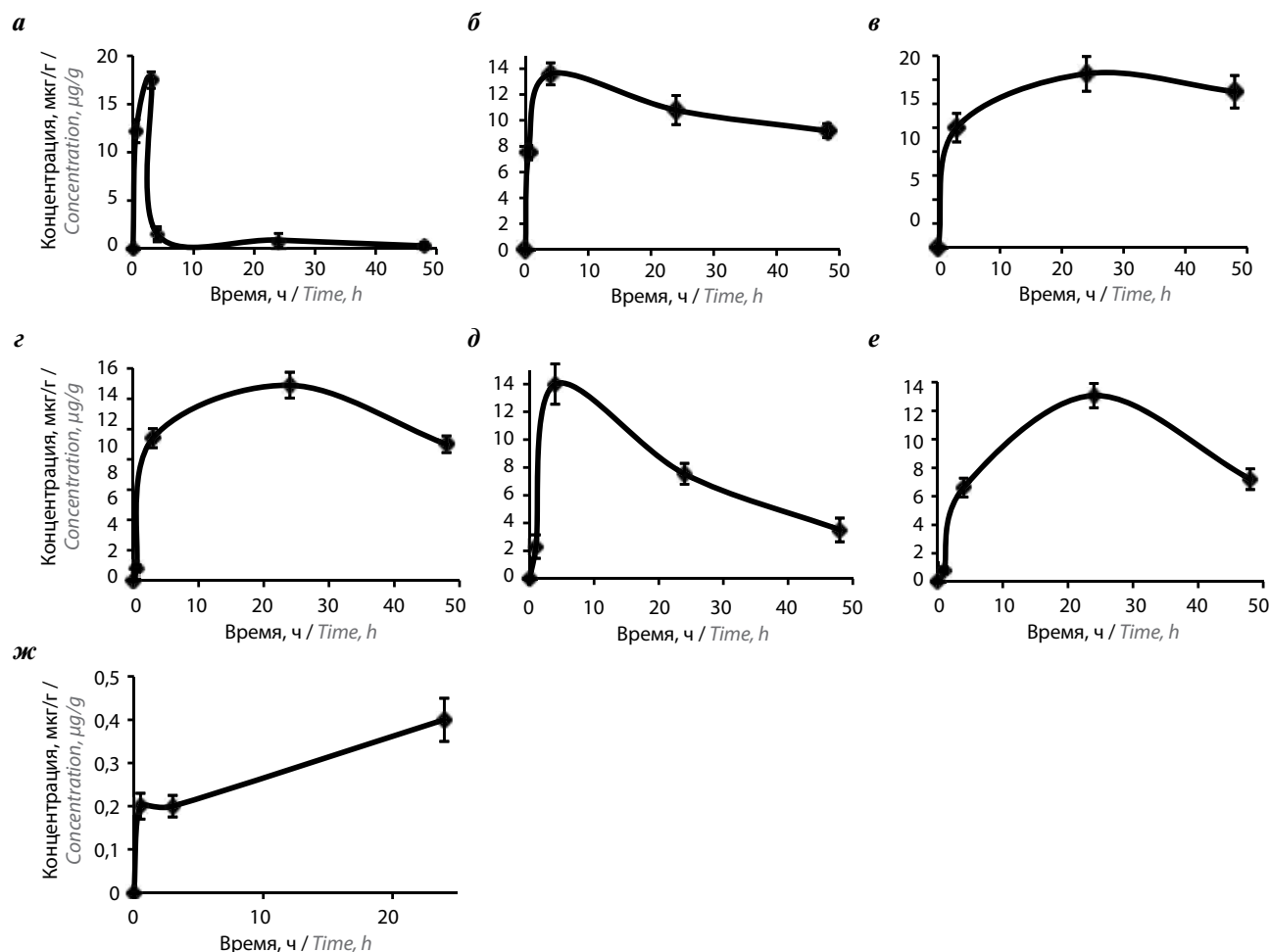


Рис. 5. Кинетика изменения содержания золота в крови (а), опухоли (б), печени (в), почках (г), легких (д), селезенке (е) и мозге (ж) мышей после однократного введения аурумакрила в дозе 100 мг/кг, в/б на 7-е сутки развития опухоли (карцинома легких Льюис)

Fig. 5. The kinetics of change in the gold content in (a) blood plasma, (б) tumor, (в) liver, (г) kidney, (д) lungs, (е) spleen, and (ж) brain in mice with Lewis lung carcinoma after a single intraperitoneal injection of aurumacryl at a dose of 100 mg/kg on 7th day

легкие, селезенка) животных, где детектируется на протяжении всего периода наблюдения в течение 48 ч.

Отметим, что концентрация золота в исследованных тканях у контрольных мышей, не получавших аурумакрил, составляет менее 0,006 мкг/г.

Максимальная концентрация золота (C_{max}), как видно из представленных данных (см. рис. 5, табл. 3), наблюдается в плазме крови через 3 ч после в/б введения аурумакрила (кривая 1), в опухоли и в легких — через 4 ч (кривые 2 и 5 соответственно), в печени, почках, селезенке и в мозге — через 24 ч после применения препарата (кривые 3, 4, 6, 7 соответственно).

Значения минимальной концентрации золота (C_{min}), регистрируемые спустя 48 ч после введения препарата, дают представление о длительности пребывания аурумакрила в исследуемых тканях и позволяют качественно сопоставить скорости выведения из них препарата. Показатель C_{min} для различных органов и опухоли возрастает в следующей последовательности: плазма крови—легкие—селезенка—опу-

холь—печень—почки, что свидетельствует об увеличении в указанной последовательности времени нахождения препарата в исследованных тканях (см. рис. 5, табл. 3).

Кумулятивный фармакокинетический показатель, позволяющий оценить биодоступность тканей различных органов и опухоли для аурумакрила, — площадь под фармакокинетической кривой (S) — охарактеризован данными, представленными в табл. 3. В соответствии со значениями этого интегрального показателя, возрастание содержания золота в различных тканях происходит в такой последовательности: мозг — плазма крови — легкие — селезенка — опухоль — печень — почки.

Обращает на себя внимание тот факт, что в ткани мозга аурумакрил обнаруживается в крайне низких концентрациях, на порядок меньших, чем концентрации препарата, регистрируемые в плазме крови (см. рис. 5, табл. 3). Столь низкое содержание золота в тканях мозга свидетельствует об отсутствии способности

Таблица 3. Фармакокинетические параметры распределения аурумакрила в организме животных с карциномой легких Льюис (введение препарата в/б в дозе 100 мг/кг)

Table 3. The pharmacokinetic parameters of aurumacryl distribution in the body of mice with Lewis lung carcinoma (intraperitoneal injection at a dose of 100 mg/kg)

Пробы тканей Tissue samples	C_{max} (мкг/г) $C_{max}, \mu\text{g/g}$	T_{max} (ч) T_{max}, h	C_{min}^* (мкг/г) $C_{min}^*, \mu\text{g/g}$	S (мкг/г × ч) $S, \mu\text{g/g} \times \text{h}$	Коэффициент ОБ ($ОБ = S_o/S_k$) RB factor ($RB = S_o/S_k$)
Плазма крови Blood plasma	15,6	3	0,9	88,1	—
Опухоль Tumor	13,6	4	9,2	522,8	5,93
Печень Liver	14,5	24	13,0	602,2	6,83
Почки Kidneys	129,0	24	90,0	5099,0	57,87
Легкие Lungs	14,0	4	3,5	372,6	4,23
Селезенка Spleen	13,1	24	7,2	452,1	5,13
Мозг Brain	0,36	24	—	6,8	0,08

*Указаны минимальные значения концентрации золота, зарегистрированные через 48 ч после введения аурумакрила.

*The minimum values of gold concentration recorded 48 h after aurumacryl administration.

Примечание. C_{max} , C_{min} — значения максимальной и минимальной концентрации золота соответственно; T_{max} — показатель времени достижения максимальной концентрации золота; S — площадь под фармакокинетической кривой; $ОБ = S_o/S_k$ — коэффициент относительной биодоступности аурумакрила, где S_o и S_k — площади под фармакокинетическими кривыми для исследуемых органов (либо опухоли) и крови соответственно.

Note. C_{max} , C_{min} — the maximum and the minimum concentrations of gold, respectively; T_{max} — the time of the maximum gold concentration achievement; S — the area under the pharmacokinetic curve; $RB = S_o/S_b$ — the relative bioavailability factor of tissues of various organs and tumors for aurumacryl, which is defined as the ratio between the areas under the curves for the organ under examination or the tumor (S_o) and blood (S_b).

у препарата преодолевать гематоэнцефалический барьер.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о преимущественном накоплении препарата в почках при относительно равномерном распределении аурумакрила между тканями опухоли, печени, легких и селезенки.

Коэффициент относительной биодоступности тканей различных органов и опухоли для аурумакрила ($ОБ = S_o/S_k$), определяемый как соотношение показателей площадей под кривыми (см. рис. 5) для исследуемого органа или опухоли (S_o) и крови (S_k), также свидетельствует о преимущественном накоплении аурумакрила в почках. Величина коэффициента ОБ для почек на порядок выше, чем значения этого показателя для всех других исследованных органов (печень, легкие, селезенка) и для опухоли (см. табл. 3). Обнаруженная высокая биодоступность почек к аурумакрилу указывает на определенную тропность препарата к тканям почек и позволяет предположить, что почки, возможно, являются потенциальной мишенью, как для противоопухолевого, так и для токсического действия препарата.

При рассмотрении данных, характеризующих биодоступность аурумакрила для опухоли, следует

отметить, что препарат после внесосудистого в/б введения обнаруживается в подкожно развивающейся опухоли практически одновременно с поступлением вещества в кровь, регистрируется в максимальной концентрации через 3 ч и сохраняется в тканях опухоли в концентрации, близкой к максимальной, на протяжении всего периода наблюдения, в течение 48 ч (см. рис. 5, табл. 3).

Как уже упоминалось ранее, показатель относительной биодоступности опухоли к аурумакрилу находится примерно на том же уровне, что и для других исследованных органов (за исключением почек с наиболее высоким индексом ОБ и мозга, имеющего самый низкий коэффициент ОБ). Однако коэффициент ОБ опухоли, равный 5,93, численно несколько превышает значения ОБ, установленные для селезенки (5,13) и легких (4,23), но уступает величине ОБ, регистрируемой для печени (6,83) (см. табл. 3).

Установленная величина коэффициента ОБ опухоли для аурумакрила, равная 5,93, соответствует известным значениям этого показателя для ряда других противоопухолевых препаратов, которые изменяются в пределах от 1,6 до 10,5 [19].

Таким образом, изучение распределения потенциального противоопухолевого препарата аурумакрил

в организме животных-опухоленосителей (карцинома легких Льюис) позволило установить, что аурумакрил после в/б введения поступает в кровяное русло, исследуемые органы (печень, почки, легкие, селезенка) и опухоль, где обнаруживается на протяжении всего периода наблюдения в течение 48 ч.

Обсуждение результатов

Проведенные исследования позволили установить, что аурумакрил эффективно, на 80–90 %, ингибирует развитие солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Ca-755) *in vivo*, а также вызывает гибель от 60 до 90 % клеток опухолей человека различного генеза (меланома Mel Mo, рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549, аденокарцинома толстой кишки HCT116) *in vitro*.

Обнаруженные в работе клеточные эффекты аурумакрила свидетельствуют не только о весьма значительном цитотоксическом эффекте аурумакрила, но демонстрируют также угнетающее влияние препарата на пролиферативную активность выжившей фракции опухолевых клеток, что указывает на выраженное цитостатическое действие препарата. Кинетика пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток MCF-7 претерпевает существенные изменения, выражающиеся в преимущественном накоплении клеток (93 %) в фазе пролиферативного покоя G_0 и в значительном уменьшении доли (7 %) делящихся клеток. Полученные данные могут быть расценены как свидетельство утраты выжившими клетками репродуктивной способности после воздействия аурумакрила.

Исследование фармакокинетики аурумакрила позволило установить, что аурумакрил после в/б введения мышам с развивающейся подкожно карциномой легких Льюис всасывается из брюшной полости и попадает в кровяное русло животных. В исследованных органах (печень, почки, легкие, селезенка) и в опухоли золото детектируется через 30 мин после в/б введения и продолжает определяться в течение 48 ч. Анализ полученных данных показывает, что обнаружено примерно равномерное распределение золота между тканями опухоли, печени, селезенки и легких. Можно отметить, что элиминация золота из легких происходит быстрее, чем из опухоли и других органов. Обращает на себя внимание существенно большее накопление золота в ткани почек, что можно интерпретировать, как указание на выделение препарата из организма преимущественно с мочой. Очень низкое содержание золота в ткани мозга, указывает на невозможность проникновения полимерного препарата через гематоэнцефалический барьер.

Для понимания механизмов действия ЛС важное значение имеет исследование их метаболизма в ор-

ганизме, выявление активных метаболитов и путей их взаимодействия с биомакромолекулами.

Известно, что полиакрилат золота, будучи эффективным гемостатиком, обладает высокой специфичностью взаимодействия с молекулой альбумина, образуя при этом интерполимерный комплекс [21]. Можно полагать, что и в организме животных-опухоленосителей аурумакрил после поступления в кровяное русло связывается с альбуминами сыворотки крови и в виде комплекса с альбумином попадает в ткани органов и опухоли, где происходит дальнейшее взаимодействие этого комплекса с внутриклеточными макромолекулами. Очевидно, что процессы биodeградации и метаболизма аурумакрила должны быть предметом специальных исследований.

Остаются пока невыясненными возможные молекулярные мишени и механизмы противоопухолевого действия аурумакрила, что необходимо для позиционирования препарата в соответствии с современными подходами к противоопухолевой химиотерапии.

Согласно существующим представлениям, биомишенями для золотосодержащих препаратов могут служить белки, участвующие в регуляции клеточной пролиферации опухолевых клеток, в развитии процессов апоптоза и ангиогенеза [6–8].

Показано, в частности, на ряде моделей стабильных клеточных линий опухолей человека высокоспецифичное ингибирование под влиянием препаратов золота такого фермента семейства пиридиннуклеотид оксиредуктазы, как митохондриальная тиоредоксин-редуктаза, имеющая в активном центре селен, который высокочувствителен к действию тяжелых металлов. Результатом такого взаимодействия является повреждение митохондриальной мембраны, выход в цитозоль цитохрома *c* и индукция апоптоза [22, 23].

Обнаружено также модулирование препаратами золота активности протеосом и уменьшение содержания антиапоптотических белков, что приводит к стимуляции процессов апоптоза клеток. Высока вероятность влияния золота на белки, входящие в сигнальный каскад трансдукции митогенных сигналов, что может вести к подавлению клеточной пролиферации и гибели клеток [7, 8, 24].

Необходимо отметить, что аурумакрил является первым и пока единственным полимерным соединением среди изученных золотосодержащих веществ, очевидно, способным в определенных условиях формировать наноразмерные частицы золота в полимерной матрице, что, возможно, вносит свой вклад в особенности метаболизма этого препарата в физиологических условиях [25].

Кроме того, исходя из известных представлений о некоторой преимущественной предрасположенности опухолевых клеток к взаимодействию

с полианионами, можно рассчитывать на некоторую возможность избирательного взаимодействия полиакрилата золота, как выраженного полианиона, с клетками опухоли [26]. Можно также предположить, что, взаимодействуя в качестве полианиона с положительно заряженными белками, в частности с гистонами, аурумакрил способен вызывать повреждение хроматина с последующим нарушением функций ДНК [24].

Вышеизложенные соображения позволяют отнести золотосодержащие соединения к потенциальным противоопухолевым агентам с мультитаргетным механизмом действия, подлежащим специальному целенаправленному исследованию.

Изучение детального механизма и мишеней противоопухолевого действия аурумакрила — одна из основных задач дальнейших исследований этого перспективного препарата.

Заключение

Установлена значительная противоопухолевая активность препарата полиакрилата золота (аурумакрил), представляющего новый для онкологии класс соединений — металлопроизводные полиакриловой кислоты.

Аурумакрил вызывает торможение роста солидных опухолей мышей (карцинома легких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755) на 80–90 % по сравнению с контролем *in vivo*, гибель от 60 до 90 % клеток опухолей человека различного

генеза (меланома Mel Mo, рак молочной железы MCF-7, рак легкого A549, аденокарцинома толстой кишки HCT116) *in vitro*, а также потерю репродуктивной способности клетками выжившей фракции линии MCF-7.

Изменения в кинетике пролиферации выжившей фракции опухолевых клеток MCF-7 под влиянием препарата выражаются в преимущественном накоплении клеток (93 %) в фазе пролиферативного покоя G_0 и в значительном уменьшении (7 %) доли делящихся клеток.

Проведено изучение распределения препарата аурумакрил в организме животных-опухоленосителей (карцинома легких Льюис) с помощью метода МС-ИСП. Установлено, что препарат обнаруживается через 30 мин после в/б внесосудистого введения в кровяном русле, в опухоли и в исследуемых органах (печень, почки, легкие, селезенка) животных, где детектируется на протяжении всего периода наблюдения в течение 48 ч. Показано преимущественное накопление аурумакрила в почках при крайне низком содержании золота в мозге и относительно равномерном распределении препарата между тканями опухоли, печени, легких и селезенки.

Совокупность полученных нами данных о противоопухолевой активности, клеточных эффектах аурумакрила и фармакокинетики препарата свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения этого соединения в качестве потенциального противоопухолевого средства.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бабин В.Н., Белоусов Ю.А., Борисов В.И. и др. Ферроцены как потенциальные противоопухолевые препараты. Факты и гипотезы (Обзор). Изв. РАН. Сер. Хим. 2014;63(11):2405–22. DOI: 10.1007/s11172-014-0756-7. [Babin V.N., Belousov Yu.A., Borisov V.I. et al. Ferrocenes as potential anticancer drugs. Facts and hypotheses. (Review). Izv. RAN Ser. khim = Russian Chemical Bulletin 2014;63(11):2405–22. (In Russ.)].
2. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. 503 с. [Korman D. B. The Basics of Antitumor Chemotherapy. Moscow: Prakticheskaya meditsina, 2006. 503 p. (In Russ.)].
3. Markowska A., Kasprzak B., Jaszczynska-Nowinka K. et al. Nobel metals in oncology. Contemp Oncol (Pozn) 2015;19:271–5. DOI: 10.5114/wo.2015.54386.
4. Da Silva Maia P.I., Deflon V.M., Abram U. Gold (III) complexes in medicinal chemistry. Future Med Chem 2014;6:1515–36. DOI: 10.4155/fmc.14.87.
5. Nardon C., Pettenuzzo N., Fregona D. Gold complexes for therapeutic purpose: an update patent review (2010–2015). Curr Med Chem 2016;23:3374–403. DOI: 10.2174/0929867323666160504103843.
6. Nobili S., Mini E., Landini I. et al. Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology and preclinical studies. Med Res Rev 2010;30(3):550–80. DOI: 10.1002/med.20168.
7. Корман Д.Б., Островская Л.А., Кузьмин В.А. Золотосодержащие комплексные соединения — противоопухолевые свойства, мишени и механизмы действия (Обзор). Вопросы онкологии 2018;64(6):697–707. [Korman D.B., Ostrovskaya L.A., Kuz'min V.A. Gold complexes — antitumor properties, targets and mechanism of action (An Overview). Voprosy onkologii = Problems in oncology 2018;64(6):697–707. (In Russ.)].
8. Корман Д.Б., Островская Л.А., Кузьмин В.А. Индукция оксидативного стресса в опухолевых клетках — новый подход к лекарственному лечению злокачественных опухолей (Обзор). Биофизика 2019;64(3):552–62. DOI: 10.1134/S0006302919030165 [Korman D.B., Ostrovskaya L.A., Kuz'min V.A. Induction of Oxidative Stress in Tumor Cells: A New Strategy for Drug Therapy of Malignant Tumors (An Overview). Biophizika = Biophysics 2019;64(3):552–62. (In Russ.)].
9. Ostrovskaya L.A., Voronkov M.G., Korman D.B. et al. Experimental Study of Antitumor Activity of Polymetal-acrylates against Animal Transplantable

- Tumors. J of Cancer Therapy 2010;1(2):59–65. DOI: 10.4236/jct.2010.12010.
10. Ostrovskaya L.A., Korman D.B., Bluhterova N.V. et al. Antitumor Activity of Polyacrylates of Noble Metals in Experiment. Biointerface Research in Applied Chemistry 2014;4:816–9.
 11. Островская Л.А., Воронков М.Г., Корман Д.Б. и др. Полиакрилаты благородных металлов как потенциальные противоопухолевые препараты. Биофизика 2014;59(4):785–89. DOI: 10.1134/S0006350914040216. [Ostrovskaya L.A., Voronkov M.G., Korman D.B. et al. Polyacrylates of Noble Metals as Potential Antitumor Drugs. Biophizika = Biophysics 2014;59(4):785–89. (In Russ.)].
 12. Островская Л.А., Варфоломеев С.Д., Воронков М.Г. и др. Полиметаллоакрилаты, ферроценсодержащие соединения и полисукцинимид как потенциальные противоопухолевые препараты. Изв. РАН. Сер. хим. 2014;5:1211–8. DOI: 10.1007/s11172-014-0575-x. [Ostrovskaya L.A., Varfolomeev S.D., Voronkov M.G. et al. Polymetalacrylates, ferrocene compounds, polysuccinimide as potential antitumor drugs. Izv. RAN Ser. khim. = Russian Chemical Bulletin 2014;5:1211–8. (In Russ.)].
 13. Островская Л.А., Корман Д.Б., Грехова А.К. и др. Экспериментальное исследование противоопухолевого эффекта препарата аурумакрила. Изв. РАН. Сер. хим. 2017;66(12):2333–7. DOI: 10.1007/s11172-017-2025-z. [Ostrovskaya L.A., Grehova A.K., Korman D.B. et al. Experimental study of the antitumor effect of aurumacryl. Izv. RAN Ser. khim. = Russian Chemical Bulletin 2017;66(12):2333–7. (In Russ.)].
 14. Островская Л.А., Грехова А.К., Корман Д.Б. и др. Клеточные эффекты противоопухолевого препарата аурумакрил. Биофизика 2017;62(3):598–603. DOI: 10.1134/S0006350917030150. [Ostrovskaya L.A., Grehova A.K., Korman D.B. et al. Cellular Effects of the Antitumor Drug Aurumacryl. Biophizika = Biophysics 2017;62(3):598–603. (In Russ.)].
 15. Островская Л.А., Корман Д.Б., Блюхтерова Н.В. и др. Металлополиакрилаты – новый класс потенциальных противоопухолевых препаратов. Химическая физика 2019;38(12):64–73. DOI: 10.1134/S0207401X19120161. [Ostrovskaya L.A., Korman D.B., Bluhterova N.V. et al. Polyacrylates of metals are the new class of the potential antitumor drugs. Khimicheskaya fizika = Russ J Phys Chem B 2019;38(12):64–73. (In Russ.)].
 16. Смирнова М.С., Спиридонов В.В., Позднякова Н.В. и др. Способ получения полиакрилата золота, проявляющего противоопухолевую активность. Патент на изобретение РФ № 2690536 от 04.06.2019. [Smirnova M.S., Spiridonov V.V., Pozdniakova N.V. et al. Method of producing gold polyacrylate exhibiting anti-tumor activity. RF Patent of Invention № 2690536 from 04.06.2019. (In Russ.)].
 17. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. (Ред. А.Н. Миронов и др.). М.: Гриф и К. 2012. С. 642–57. [Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for Preclinical Study of Pharmacological Substances. Part one. (Ed. by A.N. Mironov). Moscow: Griff i K. 2012. Pp. 642–57. (In Russ.)].
 18. Корман Д.Б., Некрасова Е.И., Островская Л.А. и др. Чувствительность клеток опухолей человека к цитотоксическому действию полиакрилата золота (аурумакрил). Биофизика 2019;64(6):1138–45. DOI: 10.1134/S0006350919060125. [Korman D.B., Nekrasova E.I., Ostrovskaya L.A. et al. The sensitivity of human tumor cells to the cytotoxic action of aurum polyacrylate (aurumacril). Biophizika 2019;64(6):1138–45. (In Russ.)].
 19. Островская Л.А., Корман Д.Б., Бурмий Ж.П. и др. Экспериментальное изучение фармакокинетики противоопухолевого препарата аурумакрил. Биофизика 2018;63(3):606–14. DOI: 10.1134/S0006350918030181. [Ostrovskaya L.A., Korman D.B., Burmij J.P. et al. An Experimental Study of the Pharmacokinetics of the Antitumor Drug Aurumacryl. Biophizika = Biophysics 2018;63(3):606–14. (In Russ.)].
 20. Karandashev V.K., Orlova T.A., Lezhnev A.E. et al. Use of the inductively coupled plasma mass spectrometry for element analysis of environmental objects. Inorganic Materials 2008;44(14):1491–1500. DOI: 10.1134/S0020168508140045.
 21. Абзаева К.А., Жилицкая Л.В., Белозерская Г.Г. и др. Влияние природы металла на гемостатическую активность водорастворимых нанокмполитов серебра и золота. Изв. РАН. Сер. хим. 2017;12:2314–6. DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3. [Abzaeva K.A., Zhilitskaya L.V., Belozerskaya G.G. et al. Effect of the metal nature on hemostatic activity of water-soluble gold and silver nanocomposites. Izv RAN Ser khim = Russian Chemical Bulletin 2017;66(12): 2314–6. (In Russ.)].
 22. Ranconi L., Aldinucoi D.P., Fregona D. Latest insights into anticancer activity of gold(III)-dithiocarbamate complexes. Anti-Cancer Agents in Med Chem 2010;4(4):283–92. DOI: 10.2174/187152010791162298/.
 23. Saggioro D., Rigobello M.P., Paloschi L. et al. Gold (III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway. Chemistry & Biology 2007;14:1128–39. DOI: 10.1016/j.chembiol.2007.08.016.
 24. Casini A., Messori L. Molecular mechanisms and proposed targets for selected anticancer gold compounds. Curr Top Med Chem 2011;11:2647–60. DOI: 10.2174/156802611798040732.
 25. Западский Б.И., Котова А.В., Матвеева И.А. и др. Индуцированный УФ облучением процесс формирования наноразмерных частиц золота в трехмерной полимерной матрице. Химическая физика 2010;29(10):87–97. [Zapadinskii B.I., Kotova A.V., Matveeva I.A. et al. UV radiation induced formation of gold nanoparticles in threedimensional. Khimicheskaya fizika = Russ J Phys Chem B 2010;29(10):87–97. (In Russ.)].
 26. Платэ Н.А., Васильев А.Е. Физиологически активные полимеры. М.: Химия, 1986. 293 с. [Plate N.A., Vasilyev A.E. Physiologically Active Polymers. Moscow: Khimiya, 1986. 293 p. (In Russ.)].

ORCID авторов/ ORCID of authors

Л.А. Островская /L.A. Ostrovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9484-5578>

Д.Б. Корман /D.B. Korman: <https://orcid.org/0000-0002-8890-1924>

Н.В. Блюхтерова /N.V. Bluhterova: <https://orcid.org/0000-0002-3295-6950>

М.М. Фомина /M.M. Fomina: <https://orcid.org/0000-0002-5202-5088>

В.А. Рыкова /V.A. Rikova: <https://orcid.org/0000-0001-6163-2923>

А.К. Чигасова /A.K. Chigasova: <https://orcid.org/0000-0001-7288-7155>

Е.И. Некрасова /E.I. Nekrasova: <https://orcid.org/0000-0002-1703-5010>

К.А. Абзаева /K.A. Abzaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5659-7078>

О.О. Рябая /O.O. Riabaya: <https://orcid.org/0000-0001-6295-3497>

Ж.П. Бурмий /J.P. Burmiy: <http://orcid.org/0000-0003-4195-9392>

Вклад авторов

Л.А. Островская: разработка дизайна исследования, анализ экспериментальных и литературных данных, написание статьи (текст, рисунки, таблицы);

Д.Б. Корман: обзор публикаций по теме статьи, анализ экспериментальных и литературных данных, участие в написании раздела «Обсуждение результатов»;

Н.В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова: проведение экспериментальных исследований *in vivo*;

А.К. Чигасова, Е.И. Некрасова, О.О. Рябая: проведение экспериментальных исследований *in vitro*;

К.А. Абзаева: синтез и физико-химическая характеристика препарата аурумакрил;

Ж.П. Бурмий: участие в экспериментальном изучении фармакокинетики препарата аурумакрил.

Authors' contributions

L.A. Ostrovskaya: study design, analysis of the experimental results and literary data, preparation of the paper (text, tables, figures);

D.B. Korman: review of the publications on the paper topic, participation in the analysis of the experimental results and literary data as well as in the preparation of the section "Discussion" of the paper;

N.V. Bluhterova, M.M. Fomina, V.A. Rikova: participation in the experimental study of the drug *in vivo*;

A.K. Chigasova, E.I. Nekrasova, O.O. Riabaya: participation in the experimental study of the drug *in vitro*;

K.A. Abzaeva: synthesis, physical and chemical characteristics of the aurumacryl;

J.P. Burmiy: participation in the experimental study of the aurumacryl pharmacokinetics.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Statement on the welfare of animals. All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ. Федеральная целевая программа «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы». Проект № 14.607.21.0199 (26 сентября 2017 г.).

Financing. The work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the framework of the Federal Target Program "Research and Development in Priority Areas for the Development of Russia's Science and Technology Complex for 2014–2020". Project № 14.607.21.0199 (26th September 2017).

Статья поступила: 19.06.2020. Принята к публикации: 02.10.2020.

Article submitted: 19.06.2020. Accepted for publication: 02.10.2020.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ N-ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛО[2,3-А]КАРБАЗОЛОВ С УГЛЕВОДНЫМ ОСТАТКОМ КСИЛОЗОЙ

И.С. Голубева, Н.П. Яворская, Л.В. Эктова, М.В. Дмитриева, Л.М. Борисова, В.А. Еремина,
Н.И. Тихонова, Р.Б. Пугачева

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

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Введение. Поиск новых противоопухолевых агентов в ряду производных индоло[2,3-а]-карбазолов является актуальным и перспективным направлением, поскольку в этом классе обнаружены соединения с противоопухолевой активностью. В лаборатории химического синтеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработали оригинальный и эффективный метод синтеза гликозидов индоло[2,3-а]-пирроло[3,4-с]карбазолов, позволяющий синтезировать производные N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с разными заместителями в гетероциклической части, в том числе при малеимидном атоме азота, и с разными углеводными остатками.

Цель исследования — первичная оценка противоопухолевой активности новых производных индолокарбазолов с углеводным остатком ксилозой на моделях опухолевого роста мышей.

Материалы и методы. Соединения изучали на перевиваемых опухолях мышей: эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC), раке толстой кишки Акатол, раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме молочной железы Ca-755. Исследования проведены на иммунокомпетентных мышцах: самцах и самках гибридов BDF₁(C₅₇Bl/6 × DBA/2), самках CBA/Lac и Balb/c. Растворы соединений готовили ex tempore и вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 60 мг/кг ежедневно в течение 5 дней. Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни леченых животных по сравнению с контрольными.

Результаты. Восемь изученных соединений, содержащих в качестве углеводного компонента D-ксилозу и различные заместители при малеимидном атоме азота, проявили противоопухолевую активность разной степени. Выявлены 2 производных: N-[5,7-диоксо-12-(β-D-ксилопиранозил)-индол[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил]бензамид (соединение 4) и N-[5,7-диоксо-12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7,12,13-тетрагидро-6H-индол[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил]пиридин-2-карбоксамид (соединение 8), показавшие высокую противоопухолевую активность на 4 перевиваемых опухолях мышей с продолжительностью эффекта от 12 дней наблюдения и более. Наиболее выраженный противоопухолевый эффект получен на РШМ-5 и Ca-755, для соединений 4 и 8 торможение роста опухоли составило: на РШМ-5 — 68–82 % и 80–72 % соответственно; на Ca-755 — 57–62 % и 86–68 % соответственно (p < 0,05).

Заключение. Для дальнейшего исследования выбрали соединение N-[5,7-диоксо-12-(β-D-ксилопиранозил)-5,7,12,13-тетрагидро-6H-индол[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-6-ил]пиридин-2-карбоксамид, как показавшее наибольший противоопухолевый эффект.

Ключевые слова: производные индолокарбазолов, противоопухолевая активность, перевиваемые опухоли мышей

Для цитирования: Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность некоторых производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4): 86–93.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-86-93



ANTITUMOR ACTIVITY OF SOME DERIVATIVES OF INDOLO[2,3-A]CARBAZOLES N-GLYCOSIDES WITH XYLOSE CARBOHYDRATE RESIDUE

I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, L.V. Ektova, M.V. Dmitrieva, L.M. Borisova, V.A. Eremina, N.I. Tikhonova, R.B. Pugacheva

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 search for new antineoplastic agents in a series of indolo[2,3-a]-carbazole derivatives is an urgent and promising direction, since compounds with antitumor activity have been found in this class. In the chemical fusion laboratory, N.N. Blokhin National Medical Research Center of the Ministry of Health of Russia has developed an original and effective method for the synthesis of glycosides

of indolo[2,3-*a*]-pyrrolo[3,4-*c*]carbazoles, which makes it possible to synthesize derivatives of *N*-glycosides of indolo[2,3-*a*]carbazoles with different substituents in the heterocyclic parts including at the maleimide nitrogen atom and with different carbohydrate residues.

The purpose of the study — the primary assessment of the antitumor activity of new derivatives of indolocarbazoles with a carbohydrate residue xylose in models of tumor growth mice.

Materials and methods. The compounds studied at transplanted tumors of mice: the Lewis epidermoid carcinoma (LLC), colon cancer ACATOL, cervical cancer RSHM-5, breast adenocarcinoma CA-755. Studies were performed on immunocompetent mice: males and females of BDF1 hybrids ($C_{57}Bl/6 \times DBA/2$), females CBA/Lac and Balb/c. Compound solutions were prepared *ex tempore* and administered to the mice intraperitoneally at a dose of 60 mg/kg daily for five days. The antitumor effect was evaluated as to of tumor growth inhibition and increase of life span of the treated animals as compared with the control ones.

Results. Eight compounds studied, containing *D*-xylose as a carbohydrate component and various substituents at the maleimide nitrogen atom, showed different degrees of antitumor activity. Two derivatives have been identified: *N*-[5,7-dioxo-12-(β -*D*-xylopyranosyl)-indole[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazol-6-yl]benzamide (compound 4) and *N*-[5,7-dioxo-12-(β -*D*-xylopyranosyl)-5,7,12,13-tetrahydro-6*H*-indole[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazole-6-yl]pyridin-2-carboxamide (compound 8), which showed high antitumor activity on 4 solid tumors of mice with a duration of effect of 12 days or more.

The most pronounced antitumor effect was obtained in compounds 4 and 8 in RSHM-5 and Ca-755, tumor growth inhibition was amounted, respectively: in RSHM-5 — 68–82 % and 80–72 %; for Ca-755 — 57–62 % and 86–68 % ($p < 0.05$).

Conclusion. For further research, we chose the compound (*N*-[5,7-dioxo-12-(β -*D*-xilopiranosil)-5,7,12,13-tetrahydro-6*H*-indole[2,3-*a*]pyrrolo[3,4-*c*]carbazol-6-yl]pyridin-2-carboxamide).

Key words: indolocarbazole derivatives, antitumor activity, transplantable mouse tumors

For citation: Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of some derivatives of indolo[2,3-*a*]carbazoles *N*-glycosides with xylose carbohydrate residue. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19 (4): 86–93. (In Russ.).

Введение

Класс индоло[2,3-*a*]-карбазолов представлен многочисленными соединениями, как выделенными из природных источников, так и полученными синтетическим путем. Представители этого класса обладают различной биологической активностью: антибактериальной, противогрибковой, противовирусной и противоопухолевой [1–3].

Среди *N*-гликозидов индолокарбазолов был выявлен антибиотик ребеккамицин, обладающий противоопухолевой активностью.

Для ребеккамицинового ряда индолокарбазолов наиболее изучены 2 соединения: эдотекарин — 12-(β -*D*-глюкопиранозил)-2,10-дигидрокси-6-[[2-гидрокси-1-(гидроксиметил)этил]амино]-5,7-диоксо-индол[2,3-*a*]пиррол[3,4-*c*]карбазол, полученный синтетическим путем, и бекатекарин — тартрат 1,11-дихлор-6-[2-диэтиламино)этил]—5,7-диоксо-12-(4-*O*-ил- β -*D*-глюкопиранозил) — индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол, полученный на основе антибиотика ребеккамицина.

Противоопухолевая активность эдотекарина была подтверждена в исследованиях *in vivo* на моделях рака молочной железы, шейки матки, глотки, легких, толстой кишки, желудка, печени. Лекарственное средство успешно прошло испытания в клинике [4, 5].

Бекатекарин продемонстрировал противоопухолевую активность в отношении экспериментальных моделей: лейкозов (P-388, L-1210), меланомы (B-16), ретикулярной саркомы (M-5076) и легочной карциномы (M109) [1]. Бекатекарин показал эффективность при клинических исследованиях [6].

На противоопухолевый эффект, спектр противоопухолевого действия и биодоступность *N*-гликозидов индолокарбазолов оказывают влияние как заместители в агликоне (ароматический, при малеимидном атоме азота), так и природа углеводного остатка [7–10].

Таким образом, работы по индолокарбазолам и их углеводсодержащим производным перспективны для дальнейшей оптимизации химической структуры. Выявление связи химической структуры веществ с их биологической активностью открывает оптимальные пути для создания лекарственных препаратов высокой избирательности и эффективности действия [11–13].

В лаборатории химического синтеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработали эффективный метод синтеза гликозидов индоло[2,3-*a*]-пирроло[3,4-*c*]карбазолов [14], позволяющий получать производные индолокарбазола с различными углеводными остатками и разными заместителями в гетероциклической части. Так были синтезированы *N*-гликозиды индолокарбазолов с общей формулой (рис. 1), заместителями при малеимидном атоме азота и различными углеводными остатками: *L*-арабинозы, *D*-галактозы, *D*-ксилозы, *D*-рибозы [15].

Полученные соединения практически нерастворимы в воде, почти нерастворимы в этаноле и ацетоне, растворимы в диметилсульфоксиде (ДМСО) и диметилформамиде [16]. Для изучения соединений *in vivo* первоначально субстанции растворяли в ДМСО и затем разводили физиологическим раствором

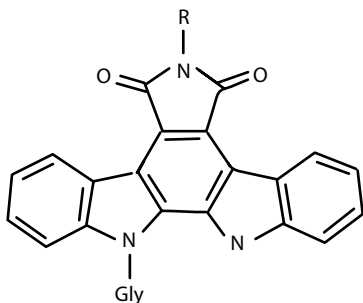


Рис. 1. Основная формула производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов, где R – H, NH₂, OH, NHCHO и др.; Gly – L-арабинопиранозил, D-ксилопиранозил, D-галактопиранозил, D-рибопиранозил

Fig. 1. The basic formula of n-glycosides derivatives of indolo[2,3-a]carbazoles. Notation: R – H, NH₂, OH, NHCHO et al.; Gly – L-arabinopyranosyl, D-xylopyranosyl, D-galactopyranosyl, D-riboypyranosyl

до концентрации ДМСО 10 %. В дальнейшем в результате экспериментальных исследований в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России создана модель лекарственной формы (ЛФ), которую использовали для изучения противоопухолевой активности синтезированных соединений производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов.

Необходимо было провести первичную оценку противоопухолевой активности производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с некоторыми заместителями при малеимидном атоме азота (рис. 2, R), с углеводным остатком ксилозой и выбрать наиболее активного представителя из изученных соединений данной группы.

Цель исследования – изучение противоопухолевой активности синтезированных соединений на солидных моделях опухолевого роста у мышей в соответствии с методикой, принятой в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [17].

Материалы и методы

Изучили противоопухолевую активность 8 соединений – производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов с разными заместителями при малеимидном атоме азота и с углеводным остатком ксилозой (см. рис. 2, R), синтезированных в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДнТО ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Соединения изучали на перевиваемых солидных опухолях мышей: эпидермоидной карциноме легкого Льюис (LLC), раке шейки матки РШМ-5, аденокарциноме молочной железы Ca-755, раке толстой кишки Акатол. Эти модели опухолевого роста мышей широко применяются в экспериментальной

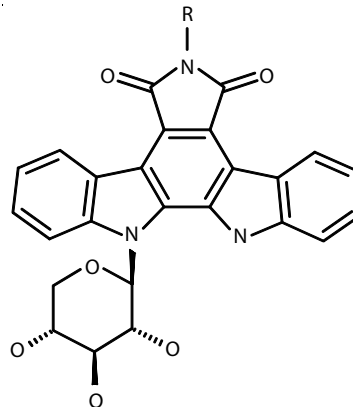


Рис. 2. Производные N-гликозидов индокарбазолов с заместителем в положении R и углеводным остатком ксилозой, где: 1 R – атом водорода (H); 2 R – аминогруппа (NH₂); 3 R – формамид (NHCHO); 4 R – бензамид (NHCOC₆H₅); 5 R – N'-фенилмочевина (NHCONHC₆H₅); 6 R – изоникотинамид (NHCOC₅H₄N); 7 R – никотинамид (NHCOC₅H₅N); 8 R – пиридин-2-карбоксамид (NHCOC₅H₃N)

Fig. 2. Derivatives of N-glycosides of indolocarbazoles with a carbohydrate residue xylose and substituents: 1 R – hydrogen atom (H); 2 R – amino group (NH₂); 3 R – formamide (NHCHO); 4 R – benzamide (NHCOC₆H₅); 5 R – N'-phenylurea (NHCONHC₆H₅); 6 R – isonicotinamide (NHCOC₅H₄N); 7 R – nicotinamide (NHCOC₅H₅N); 8 R – pyridine-2-carboxamide (NHCOC₅H₃N)

онкологии для доклинической оценки противоопухолевой активности новых субстанций [18].

В опытах использовали 2–10-й пассажи штаммов опухолевых моделей. В эксперименте инокуляцию опухолевых клеток проводили подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде 199 в разведении 1 : 10 (5 × 10⁶ клеток) [17].

В опытах на LLC использовали самцов, на Ca-755 – самок мышей-гибридов 1-го поколения BDF₁ (C₅₇Bl/6 × DBA/2), на РШМ-5 – самок CBA/Lac, на Акатол – самок Balb/c.

Штаммы Ca-755, РШМ-5 и Акатол поддерживали на самках линейных мышей C₅₇Bl/6, CBA/Lac и Balb/c соответственно при подкожной перевивке, штамм LLC – при внутримышечной [19].

В исследования включали животных с массой тела 18–22 г. Мышей получали из разведения экспериментально-биологической лаборатории (виварий) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУ «Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животных содержали в помещении вивария с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде.

Перед исследованием мышей распределяли в группы по 6–7 особей (n = 6–7), контрольные группы состояли из 10 животных (n = 10).

Таблица 1. Противоопухолевая активность соединений из класса N-гликозидов индолокарбазолов с ксилозой при внутрибрюшинном введении на LLC

Table 1. Antitumor activity of compounds from the class of N-glycosides of indolocarbazoles with xylose during intraperitoneal administration on LLC

Соединения Compound	ТРО, % TGI, %								УПЖ, % ILS, %	Гибель от токсичности, % случаев Toxicity death, %
	Дни после окончания лечения Days after treatment									
	1	4	8	12	15–16	19–20	22	26		
1	17	20	8	5	6	—	—	—	8	0
2	27	46	35	34	34	26	34	—	7	0
3	53	55	35	22	24	37	—	—	21	0
4	62	62	54	51	48	—	—	—	35	0
5	71	43	46	19	6	23	—	—	11	0
6	48	48	38	17	32	—	—	—	17	0
7	55	30	38	43	40	—	—	—	2	17
8	75	82	59	67	71	67	56	62	33	0

Примечание. Здесь и в табл. 2–4: ТРО – торможение роста опухоли; УПЖ – увеличение продолжительности жизни.
Note. Here and in table 2–4: TGI – tumor growth inhibition; ILS – increase of life span.

Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухолей – время интенсивного размножения и наибольшей чувствительности опухолевых клеток к химиотерапии [17, 19, 20].

Для первичной оценки противоопухолевой активности все соединения изучали в дозе 60 мг/кг при внутрибрюшинном введении ежедневно в течение 5 дней с интервалом 24 ч в экспериментальной ЛФ. Состав модели ЛФ включал: действующее вещество 5 мг/мл, ДМСО (5 %) и спирт этиловый 95 % (20 %) в качестве комплексного растворителя, солюбилизатор – комплексобразователь коллидон 17 PF (20 %). ЛФ готовили *ex tempore* непосредственно перед опытами.

Критериями оценки противоопухолевой активности служили: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) подопытных животных по сравнению с контрольными животными [17].

ТРО вычислялось по формуле:

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

где V_k и V_o – средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытной группах, который определялся как произведение 3 максимальных взаимно перпендикулярных размеров опухолевого узла (длина – l , ширина – b , высота – h) у каждого животного.

Измерение объема опухолей проводили на разных сроках (каждые 3–5 дней) после окончания лечения, в зависимости от скорости роста опухоли.

УПЖ вычисляли по формуле:

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

где СПЖ_o и СПЖ_k – средняя продолжительность жизни (сут) в опытных и контрольных группах животных.

Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 % и УПЖ ≥ 25 % для животных с солидной опухолью.

Эффективными считали дозы соединений, вызывающие ТРО ≥ 70 % продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения и УПЖ ≥ 25 % [15].

Статистический анализ данных проводили с использованием компьютерной программы STATISTICA 6.0. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Изученные производные N-гликозидов индолокарбазолов с разными заместителями R, углеводным остатком ксилозой представлены на рис. 2.

Результаты изучения противоопухолевой активности соединений из класса N-гликозидов индолокарбазолов с ксилозой на LLC мышей представлены в табл. 1.

Результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что из 8 изученных производных N-гликозидов индолокарбазолов с разными заместителями в положении R (см. рис. 2) соединение 4 с ароматическим ядром в заместителе проявило противоопухолевый

эффект — ТРО составило 62 % непосредственно после окончания лечения и сохранялось на уровне ТРО = 51 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю) до 12-го дня наблюдения. Соединения 1, 2 и 3 с заместителями Н, NH_2 и NHCHO соответственно оказались неактивны.

Присутствие в заместителе R карбонильной группы при ароматическом кольце в соединении 5 по сравнению с соединением 4 усилило противоопухолевый эффект только в 1-й день после окончания лечения. ТРО составило 71 %.

Введение в ароматическое ядро соединения 4 атома азота в положения пара- (соединение 6), орто- (соединение 8), мета- (соединение 7) по отношению к карбонильной группе по-разному повлияло на противоопухолевый эффект.

Соединение 8 с азотом в положении орто- ароматического ядра проявило противоопухолевый эффект в виде ТРО = 75–62 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю), который сохранялся до 27-го дня после окончания лечения. При этом УПЖ составило 33 %.

Соединения 6 и 7 с азотом в положении пара- или мета- в ароматическом ядре заместителя соответственно не проявили противоопухолевого эффекта (ТРО = 48 и 55 % в 1-й день наблюдения).

Таким образом, из 8 соединений, представленных в табл. 1 и исследованных на модели рака легкого LLC, интерес вызывают только производные 4 и 8.

Далее синтезированные производные из класса N-гликозидов индолокарбазолов с углеводным остатком ксилозой исследовали на модели рака толстой кишки Акатол (табл. 2). Соединение 1 с Н в заместителе проявило невысокий, но продолжительный противоопухолевый эффект в течение 19 дней (ТРО = 62–51 %). Производное 2, с аминогруппой в заместителе, показало кратковременный эффект до 4-го дня наблюдения (ТРО = 52–67 %).

Присутствие ароматического ядра в заместителе у производного 4 оказало минимальный эффект с ТРО = 51–50 % до 12-го дня после окончания лечения.

Соединение 6 с азотом в ароматическом ядре в положении пара- не показало противоопухолевого эффекта, тогда как соединение 8 с азотом в положении орто- показало высокий противоопухолевый эффект с ТРО = 90–62 % до 26-го дня наблюдения по окончании лечения.

Таким образом, стойкий продолжительный противоопухолевый эффект при исследовании производных с разными заместителями при малеимидном атоме азота на модели рака толстой кишки Акатол получили у производного 8 с азотом в положении орто- ароматического ядра по отношению к карбонильной группе (см. рис. 2, R).

На модели плоскоклеточного рака шейки матки РШМ-5 производные исследовали при внутрибрюшинном введении в той же дозе и режиме (табл. 3). Четыре из 8 синтезированных соединений, исследованных на РШМ-5, проявили противоопухолевый эффект, который различался по силе и продолжительности. Производные 4 и 8 показали высокий длительный противоопухолевый эффект с ТРО = 68–82 % и ТРО = 80–72 % до 19-го и 26-го дня наблюдения после окончания лечения соответственно. По-видимому, опухолевая модель РШМ-5 оказалась наиболее чувствительной для группы производных с углеводным остатком ксилозой.

На перевиваемой аденокарциноме молочной железы Са-755 исследовали 4 соединения (табл. 4).

Изученные на этой модели производные проявили противоопухолевый эффект разной степени активности с сохранением его от 4 до 19 дней после

Таблица 2. Противоопухолевая активность соединений из класса N-гликозидов индолокарбазолов с ксилозой при внутрибрюшинном введении на Акатол

Table 2. Antitumor activity of compounds from the N-glycosides class of indolocarbazoles with xylose during intraperitoneal administration on Acatol

Соединения Compound	ТРО, % TGI, %								УПЖ, % ILS, %	Гибель от токсичности, % случаев Toxicity death, %
	Дни после окончания лечения Days after treatment									
	1	4	8	12	15–16	19–20	22	26		
1	62	24	50	47	56	51	39	27	0	0
2	52	67	44	44	32	29	—	—	0	0
4	51	69	56	50	46	44	40	—	0	17
6	35	37	52	47	52	49	46	—	0	0
8	90	87	82	75	76	73	72	62	0	0

Таблица 3. Противоопухолевая активность соединений из класса N-гликозидов индокарбазолов с ксилозой при внутрибрюшинном введении на РШМ-5

Table 3. Antitumor activity of compounds from the class of N-glycosides of indolocarbazoles with xylose during intraperitoneal administration on RSHM-5

Соединения Compound	ТРО, % TGI, %							УПЖ, % ILS, %	Гибель от токсичности, % случаев Toxicity death, %
	Дни после окончания лечения Days after treatment								
	1	4	8	12	15–16	19–22	26		
1	53	67	55	60	58	56	41	0	0
2	60	63	64	56	49	36	30	0	29
4	68	58	77	86	84	82	—	0	0
8	80	73	84	86	81	79	72	—	0

Таблица 4. Противоопухолевая активность соединений из класса N-гликозидов индокарбазолов с ксилозой при внутрибрюшинном введении на Са-755

Table 4. Antitumor activity of compounds from the N-glycosides class of indolocarbazoles with xylose during intraperitoneal administration on CA-755

Соединения Compound	ТРО, % TGI, %						УПЖ, % ILS, %	Гибель от токсичности, % случаев Toxicity death, %
	Дни после окончания лечения Days after treatment							
	1	4	8	12	15–16	19		
1	85	86	56	16	26		0	0
2	58	61	43	39	26	37	8	0
4	26	57	47	41	62	62	0	0
8	86	82	78	85	75	68	21	0

окончания лечения. Соединение 1 проявило высокий противоопухолевый эффект на уровне 85–56 % ТРО продолжительностью до 8-го дня, а соединение 2 — невысокий кратковременный эффект с ТРО = 58–61 % до 4-го дня наблюдения. Производное 4 с ароматическим ядром в заместителе проявило непосредственный эффект на уровне 26 % ТРО в 1-й день после окончания лечения, с последующим увеличением ТРО до 62 % на 19-й день наблюдения. Высокий противоопухолевый эффект выявлен после применения производного 8 с азотом в положении орто- ароматического ядра заместителя: ТРО = 86–68 % до 19-го дня наблюдения.

Опухолевая модель рака молочной железы Са-755, так же как и РШМ-5, оказалась чувствительной для этих производных.

Заключение

Проведено исследование по изучению и оценке противоопухолевой активности 8 производных N-гликозидов индо[2,3-а]карбазолов с разными заместителями при малеимидном атоме азота и с углеводным остатком ксилозой, синтезированных в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДИТО ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование проводилось на 4 солидных моделях опухолевого роста мышей: LLC, Акатол, РШМ-5 и Са-755. Соединения с разными заместителями показали эффект разной степени активности на всех 4 представленных моделях опухолевого роста.

Изученные производные N-гликозидов индо[2,3-а]карбазолов с углеводным остатком ксилозой,

независимо от заместителя при малеимидном атоме азота, показали противоопухолевую активность на гормоночувствительных опухолевых моделях РШМ-5 (с высокой дифференцированностью и медленным ростом) и Ca-755 (наиболее чувствительная из опухолевых моделей к химиотерапевтическим препаратам с разными механизмами действия).

Среди исследованных новых соединений выявлены производные 4 и 8, показавшие высокую противоопухолевую активность с продолжительностью эффекта от 12 дней наблюдения и более.

Для дальнейшего исследования выбрали производное 8 с азотом в положении орто-ароматического ядра заместителя.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sánchez C., Méndez C., Salas J.A. Indolocarbazole natural products: occurrence, biosynthesis, and biological activity. *Nat Prod Rep* 2006;23:1007–45. DOI: 10.1039/b601930g.
2. Bashir M., Bano A., Ijaz A.S., Chaudhary B.A. Recent developments and biological activities of n-substituted carbazole derivatives: A review. *Molecules* 2015;20(8):13496–517. DOI: 10.3390/molecules200813496.
3. Киселева М.П., Покровский В.С., Татарский В.В. и др. Производные индолокарбазолов — перспективный класс противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(4):20–26. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-20-26 [Kiseleva M.P., Pokrovsky V.S., Tatarskiy V.V. et al. Indolocarbazole derivatives — a promising class of anti-cancer drugs. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(4):20–26. (In Russ.)].
4. Saif M.W., Diasio R.B. Edotecarin: a novel topoisomerase I inhibitor. *Clin Colorectal Cancer* 2005;5(1):27–36. DOI: 10.3816/cc.2005.n.014. PMID: 15929804.
5. Yamada Y., Tamura T., Yamamoto N. et al. Phase I and pharmacokinetic study of edotecarin, a novel topoisomerase I inhibitor, administered once every 3 weeks in patients with solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2006;58(2):173–82. DOI: 10.1007/s00280-005-0149-6.
6. Nock C.J., Brell J.M., Bokar J.A. et al. A phase I study of rebeccamycin analog in combination with oxaliplatin in patients with refractory solid tumors. *Investigational New Drugs* 2011;29(1):126–30. DOI: 10.1007/s10637-009-9322-9.
7. Голубева И.С., Яворская Н.П., Эктова Л.В. и др. Сравнение противоопухолевой активности производных индолокарбазолов с углеводными остатками галактозой, арабинозой и заместителями по имидному атому азота. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;16(s1):23. [Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Ektova L.V. et al. Comparison of the anti-tumor activity of indolocarbazole derivatives with carbohydrate residues galactose, arabinose and substituents on the imide nitrogen atom. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2017;16(S1):23. (In Russ.)].
8. Prudhomme M. Biological targets of antitumor indolocarbazoles bearing a sugar moiety. *Current Medicinal Chemistry — Anti-Cancer Agents* 2004;4(6):509–21. DOI: 10.2174/1568011043352650.
9. Civenni G., Longoni N., Costales P. et al. EC-70124, a novel glycosylated indolocarbazole multikinase inhibitor, reverts tumorigenic and stem cell properties in prostate cancer by inhibiting STAT3 and NF-κB. *Molecular Cancer Therapeutics* 2016;15(5):806–18. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0791.
10. Киселева М.П., Покровский В.С., Борисова Л.М. и др. Влияние химической структуры производных N-гликозидов индоло[2,3-A]пирроло[3,4-C]карбазолов на противоопухолевую активность. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(2):32–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-32-39. [Kiseleva M.P., Pokrovsky V.S., Borisova L.M. et al. N-glycosidesindolo[2,3,-a]pyrrolo[3,4,-c]carbazole derivatives chemical structure influence on antitumor activity. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(2):32–39. (In Russ.)].
11. Sánchez C., Méndez C., Salas J.A. Engineering biosynthetic pathways to generate antitumor indolocarbazole derivatives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2006;33(7):560–8. DOI: 10.1007/s10295-006-0092-5.
12. Zhang G., Shen J., Cheng H. et al. Syntheses and biological activities of rebeccamycin analogues with uncommon sugars. *J Med Chem* 2005;48(7):2600–11. DOI: 10.1021/jm0493764.
13. Moreau P., Holbeck S., Prudhomme M., Sausville E.A. Cytotoxicities of three rebeccamycin derivatives in the National Cancer Institute screening of 60 human tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 2005;16(2):145–50. DOI: 10.1097/00001813-200502000-00005.
14. Голубева И.С., Еремина В.А., Моисеева Н.И. и др. Производное класса Т-гликозидов индоло[2,3-a]-пирроло[3,4-c]карбазол-5,7-дионов-N-{12-(β-D-ксилопиранозол)-5,7-диоксо}индоло[2,3-a]-пирроло[3,4-c]карбазол-6-ил}пиридин-2-карбоксамид. Патент RU 2667906 от 25.09.2018 г. [Golubeva I.S., Eremina V.A., Moiseeva N.I. et al. A derivative of the class of T-glycosides of indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole-5,7-dione-N-{12-(β-D-xylopyranosole)-5,7-dioxo}indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazol-6-yl}pyridin-2-carboxamide. RU patent 2667906, 25.09.2018 (In Russ.)].
15. Kaluzhny D.N., Tatarskiy Jr. V.V., Dezhenkova L.G. et al. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to DNA. *Chem Med Chem* 2009;4(10):1641–8. DOI: 10.1002/cmdc.200900227.
16. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазолов — ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3):25–32. [Lantsova A.V., Sanarova K.V., Oborotova N.A. et al. Development of technology for injectable dosage form based on the national substance from the class of indolocarbazoles. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2014;13(3):25–32. (In Russ.)].
17. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство*

- по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К., 2012. С. 642–57. [Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K., 2012. Pp. 642–57 (In Russ.)].
18. Трещалина Е.М., Андропова Н.В., Гарин А.М. Доклиническое изучение противоопухолевых препаратов. В кн.: Рациональная фармакотерапия. М.: Литтерра, 2015. С. 75–82. [Treschalina E.M., Andronova N.V., Garin A.M. Preclinical study of antitumor drugs. In: Rational pharmacotherapy. Moscow: Litterra, 2015. Pp. 75–82 (In Russ.)].
19. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина (СССР), А. Голдина, А. Кляйна (США). М.: Медицина, 1980. 295 с. [Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. Z.P. Sofina, A.B. Syrkin (USSR), A. Goldin, A. Klein (USA). Moscow: Medicine, 1980. 296 p. (In Russ.)].
20. Chabner B.A., Longo D.L. Cancer Chemotherapy and Biotherapy: Principles and Practice. 3rd ed., Philadelphia: Lippincott-Raven, 2001. Pp. 678–90.

Вклад авторов

И.С. Голубева, Н.П. Яворская, Л.М. Борисова: дизайн исследования, проведение экспериментов и анализ данных, написание и редактирование статьи;

Л.В. Эктова, В.А. Еремина, Н.И. Тихонова, Р.Б. Пугачева: синтез исследуемых соединений, обзор публикаций, написание статьи; М.В. Дмитриева: приготовление моделей лекарственной формы исследуемых соединений, подготовка статьи к публикации.

Authors' contributions

I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, L.M. Borisova: research design, receiving and analyzing data, conduction of the research and analyzing data, writing and editing of the manuscript;

L.V. Ektova, V.A. Eremina, N.I. Tikhonova, R.B. Pugacheva: synthesis of the studied compounds, review of publications, writing of the manuscript; M.V. Dmitrieva: preparation of models of the dosage form of the studied compounds, preparation of the manuscript for publication.

ORCID авторов/ORCID of authors

И.С. Голубева/I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>

Н.П. Яворская/N.P. Yavorskaya: <https://orcid.org/0000-0003-3147-5917>

Л.В. Эктова/L.V. Ektova: <https://orcid.org/0000-0002-3987-6072>

М.В. Дмитриева/M.V. Dmitrieva: <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>

Л.М. Борисова/L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0001-6554-1949>

В.А. Ерёмина/V.A. Eremina: <https://orcid.org/0000-0002-7457-3659>

Н.И. Тихонова/N.I. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0003-0043-3503>

Р.Б. Пугачева/R.B. Pugacheva: <https://orcid.org/0000-0003-2640-935X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР № АААА-А20-120031190013-9 «Фармацевтическая разработка и доклинические исследования оригинальных инновационных лекарственных средств с улучшенным профилем безопасности для лечения злокачественных новообразований».

Financing. The study was performed in the framework research work № АААА-А20-120031190013-9 “Pharmaceutical development and preclinical research of original innovative medicines with an improved safety profile for the treatment of malignant neoplasms”.

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 15.06.2020. Принята к публикации: 22.10.2020.

Article submitted: 15.06.2020. Accepted for publication: 22.10.2020.

Информация для авторов

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

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

1. Общие правила

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

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

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

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

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

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

Пример:

ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

И.И. Иванов¹, П.П. Петров²

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

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

Контакты: Иван Иванович Иванов chem_analysis@rnc.ru

THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEVTICHESKY JZHURNAL»

I.I. Ivanov¹, P.P. Petrov²

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

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

Последняя страница должна содержать:

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

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

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

Текст статьи начинается со второй страницы.

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

Обзор литературы — не более 15 страниц,

оригинальная статья — не более 12 страниц,

краткие сообщения — не более 4 страниц.

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

5. Резюме и ключевые слова

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

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

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

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

6. Структура статей

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. Иллюстративный материал

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

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

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

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

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

Названия рисунков должны быть переведены на английский язык.

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

Названия таблиц должны быть переведены на английский язык.

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

8. Единицы измерения и сокращения

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

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

Название генов пишется курсивом, название белков — обычным шрифтом.

9. Список литературы

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

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

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

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

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

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

Статья в журнале

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

Примеры:

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

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

Монографии, сборники тезисов

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

Примеры:

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

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

Патенты

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

Пример:

Колс Ян. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей. Патент США № 5093330 от 03.03.1992 г. [Kols Jan (BE) Administration of Midostaurin for treating gastrointestinal stromal tumours. RU2 410 098C2. (In Russ.)].

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

10. Этические вопросы

• Авторство

Право называться автором имеют лица, которые:

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

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

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

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

Пример:

А.М. Иванов: разработка дизайна исследования;

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

М.М. Иванова: написание текста рукописи;

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

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

• Конфликт интересов

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

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

Для статьи 1 автора/2 и более авторов

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

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

• Источник финансирования

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

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

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

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

• Информированное согласие пациентов

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

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

• Соблюдение прав животных при проведении исследования

Пример оформления раздела:

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

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

Общие положения

• Оплата публикации

Все статьи принимаются к печати бесплатно.

• Авторские права

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

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

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

• Приватность

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

Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.

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

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

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

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

Авторы могут присылать свои материалы по электронной почте на адрес:

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

Также статью можно подать через редакционную систему на сайте журнала.

11. Подготовка статей

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

1. Эта статья ранее не была опубликована, а также не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале (или дано объяснение этого в Комментариях для редактора).
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате документа OpenOffice, Microsoft Word, RTF или WordPerfect.
3. Приведены полные интернет-адреса (URL) для ссылок там, где это возможно.
4. Текст набран с полупоротым межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 12 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание (за исключением интернет-адресов).
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Руководстве для авторов, расположенном на странице «О журнале».
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то выполнены требования документа Обеспечение слепого рецензирования.

