

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2021 • ТОМ 20 • № 1

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

1

ТОМ 20
2021

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

1
ТОМ 20
'21

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 Т.Н. Помилуйко
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка О.В. Гончарук

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

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

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

Российский биотерапевтический журнал.
2021. Том 20. № 1. 1–84. 18.03.2021.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2021

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 81679.

Отпечатано в типографии ООО «Буки Веди»
127273, 117246, Москва, Научный проезд, 19,
2-й этаж, приложение 6Д, офис 202.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.
<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)

Bunyatyan 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)

1 VOL. 20
'21

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@rnc.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 T.N. Pomiluyko
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered
at the Federal Service for Supervision
of Communications, Information
Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695
dated 21.01.2002;
ПИ № 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. 2021. Volume 20.
No 1. 1–84. 18.03.2021.
© PH "ABV-Press", 2021
Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Buki Vedi LLC.117246,
Moscow, Nauchniy Proyezd 19,
floor 2, app. 6D, office 202.
1,000 copies. Free distribution
<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

- И.С. Карлина, Е.С. Горожанина, И.В. Уласов*
Перспектива использования онкогенов *INHA*, *MMP2* и *DLL4* в диагностике и лечении онкологических заболеваний 8
- Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина, Н.В. Матвиенко, Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева*
PI3K/Akt/mTOR: вклад в формирование фенотипа опухоли, чувствительного к тамоксифену 16
- Е.П. Смородин*
Актуальность дальнейших клинических исследований применения мелатонина в адьювантной онкотерапии 24
- В.С. Горбик, З.С. Шпрах, Ж.М. Козлова, В.Г. Салова*
Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор) 33

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Э.Ф. Валиахметова, Л.И. Папуша, А.В. Артёмов, Г.В. Терещенко, Е.А. Сальникова, Л.А. Ясько, А.Е. Друй, А.П. Шехтман, Г.А. Новичкова, А.И. Карачунский*
Диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль у детей: МРТ и молекулярно-генетические характеристики, клинические особенности и исход заболевания. Описание 4 клинических случаев 42
- А.О. Ситковская, Е.Ю. Златник, С.Ю. Филиппова, Е.С. Бондаренко, Л.Н. Ващенко, Э.Э. Кечеджиева, И.Р. Дашкова, Е.А. Андрейко, И.А. Новикова*
Влияние интерлейкинов 2, 7, 15 на пролиферацию натуральных киллеров *in vitro* 56
- Л.М. Борисова, В.Н. Осипов, Д.В. Гусев, И.С. Голубева, М.П. Киселева, А.А. Вартамян*
Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы 67
- М.В. Дмитриева, Бу Лугэнь, А.П. Полозкова, О.Л. Орлова, И.И. Краснюк, И.И. Краснюк (мл.)*
Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269 74

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- О.И. Тарасова, А.А. Рыжова, М.И. Савинова, В.Д. Бородин*
Объекты интеллектуальной собственности ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, созданные в 2019–2020 годах 80

REVIEWS

Irina S. Karlina, Elena S. Gorozhanina, Ilya V. Ulasov

The prospect of using oncogenes' *INHA*, *DLL4* and *MMP2* role in diagnosis and treatment of oncological diseases 8

Tatyana A. Dronova, Natalia N. Babyskhina, Natalya V. Matvienko, Elena M. Slonimskaya, Nadezhda V. Cherdyntseva

PI3K/Akt/mTOR: contribution to the tumor phenotype sensitive to tamoxifen 16

Eugeniy P. Smorodin

Relevance of further clinical trials of the use of melatonin in adjuvant cancer therapy 24

Valentina S. Gorbik, Zoya S. Shprakh, Zhanna M. Kozlova, Valentina G. Salova

Liposomes as a targeted delivery system of drugs (review) 33

ORIGINAL REPORTS

Andge F. Valiakmetova, Lyudmila I. Papusha, Anton V. Artemov, Galina V. Tereshchenko, Ekaterina A. Sal'nikova, Lyudmila A. Yasko, Aleksandr E. Druy, Anastasia P. Shekhtman, Galina A. Novichkova, Aleksandr I. Karachunsky

Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor in children: MR characteristics, clinical features and outcome. Four clinical cases 42

Anastasia O. Sitkovskaya, Elena Yu. Zlatnik, Svetlana Yu. Filippova, Elena S. Bondarenko, Larisa N. Vaschenko, Emma E. Kechedzhieva, Irina R. Dashkova, Elena A. Andreiko, Inna A. Novikova

Effect of interleukins 2, 7, 15 on the proliferation of natural killers *in vitro* 56

Larisa M. Borisova, Vasilii N. Osipov, Dmitriy V. Gusev, Irina S. Golubeva, Marina P. Kiseleva, Amalia A. Vartanian

3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells 67

Maria V. Dmitrieva, Bu Lugen, Alevtina P. Polozkova, Olga L. Orlova, Ivan I. Krasnyuk, Ivan I. Krasnyuk (Jr.)

Selection of a cryoprotector for production a lyophilized liposomal dosage form of the indolocarbazole derivative LHS-1269 74

BRIEF REPORT

Olga I. Tarasova, Anna A. Ryzhova, Marina I. Savinova, Vitaliy D. Borodin

Objects of intellectual property in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology created in 2019–2020 80

Перспектива использования онкогенов *INHA*, *MMP2* и *DLL4* в диагностике и лечении онкологических заболеваний

И.С. Карлина, Е.С. Горожанина, И.В. Уласов

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

Контакты: Елена Сергеевна Горожанина 308gorod@mail.ru

Большую роль в развитии злокачественных образований играет генетическая предрасположенность. К факторам риска возникновения онкологических заболеваний относится наличие мутаций в онкогенах – генах, вызывающих развитие опухолей. Впервые они были обнаружены в геноме вирусов, а у человека были найдены их аналоги, названные протоонкогенами. Изучение работы онкогенов – перспективное направление в современной онкологии. Открытие и исследование онкогенов всех классов необходимо не только для понимания механизмов развития новообразований, но и для разработки новых методов диагностики и лечения рака. Онкогены отвечают за синтез факторов роста, а также контролируют протекание клеточного цикла. При избытке или нарушении функций продуктов генов нарушаются процессы роста и деления клеток, что приводит к перерождению клеток, их неконтролируемому делению и в итоге к образованию опухоли. Можно предположить, что, изучив механизмы работы онкогенов на молекулярном уровне, функции их продуктов и их влияние на процессы жизнедеятельности клеток и целого организма, можно разработать способы лечения онкологических заболеваний путем ингибирования или коррекции работы конкретного онкогена или его продукта. Процесс активации онкогена многогранен и может быть вызван персистенцией онкогенных вирусов, интеграцией ретровирусов в геном клетки, наличием точечных мутаций или делеций в геномной ДНК, транслокацией хромосом или белок-белковым взаимодействием. Именно поэтому полностью не известны общее число онкогенов и возможные пути их активации на разных стадиях прогрессии опухоли. В связи с этим мы решили в данном обзоре проанализировать имеющуюся информацию об относительно недавно открытых и малоизученных онкогенах *INHA*, *DLL4* и *MMP2*, которые контролируют важные функции, в том числе метастазирование и рост опухоли.

Ключевые слова: онкогены, *INHA*, *MMP2*, *DLL4*

Для цитирования: Карлина И.С., Горожанина Е.С., Уласов И.В. Перспектива использования онкогенов *INHA*, *MMP2* и *DLL4* в диагностике и лечении онкологических заболеваний. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):8–15.

The prospect of using oncogenes' *INHA*, *DLL4* and *MMP2* role in diagnosis and treatment of oncological diseases

Irina S. Karlina, Elena S. Gorozhanina, Ilya V. Ulasov

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

Contacts: Elena Sergeevna Gorozhanina 308gorod@mail.ru

A large role in the development of malignant tumors is played by a genetic predisposition. Risk factors for cancer include the presence of mutations in oncogenes-genes that cause the development of tumors. They were first found in the genome of viruses, and their analogs, called proto-oncogenes, were found in humans. The study of the work of oncogenes is a promising direction in the development of new methods for the diagnosis and treatment of oncological diseases. The discovery and research of oncogenes of all classes are necessary not only to understand the mechanisms of neoplasm development but also to develop new methods of cancer treatment.

Oncogenes are responsible for the synthesis of growth factors, and also control the course of the cell cycle. With an excess or violation of the functions of gene products, the processes of cell growth and division are disrupted, which leads to cell degeneration, their uncontrolled division, and, as a result, to the formation of a tumor. Based on the above, we can say that by studying the mechanisms of oncogenes at the molecular level, the functions of their products, and their influence on the vital processes of cells and the whole organism, it is possible to develop ways to treat cancer by inhibiting or correcting the work of a particular oncogene or its product. The process of oncogene activation is multifaceted and can be caused by the persistence of oncogenic viruses, the integration of retroviruses into the cell genome, the presence of point mutations or deletions in genomic DNA, chromosome translocation, or protein-protein interaction. That is why the total number of oncogenes and possible ways of their activation at different stages of tumor progression are not fully known. In this regard, we decided in this review to analyze the available information about the relatively new and poorly studied oncogenes *INHA*, *DLL4*, and *MMP2*, which control important functions, including metastasis and tumor growth.

Key words: oncogenes, *INHA*, *DLL4*, *MMP2*

For citation: Karlina I.S., Gorozhanina E.S., Ulasov I.V. The prospect of using oncogenes' *INHA*, *DLL4* and *MMP2* role in diagnosis and treatment of oncological diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):8–15. (In Russ.).

Введение

Появление и развитие опухолевого процесса в тканях контролируется генами. В ходе эволюции выделилось 2 группы генов, состоящих из онкогенов и супрессоров опухолевого роста, которые определяют поведение клетки с самого рождения. Нормальная клетка нуждается в активации протоонкогенов для поддержания своей жизнедеятельности, однако накопление генетических aberrаций (например, *MER*-делеция, делеция экзонов 2–7 эпидермального гормона фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR) – такой мутантный рецептор распространен у людей с глиобластомами и придает им большую злокачественность) и нарушение механизма репарации эпигенетических повреждений протоонкогенов приводит к неконтролируемому росту клеток и их перерождению [1–3].

Превращение протоонкогенов в онкогены затрагивает главным образом клеточное деление, восстановление ДНК и резистентность клеток к терапии. Хотя активация одного из онкогенов обеспечивает наилучшие условия для выживания перерождающейся клетки, процесс малигнизации требует активации сразу нескольких онкогенов. Например, рецептор онкогенного эпидермального фактора роста активирует сразу несколько элементов сигнального пути тканевого фактора в клетках глиомы человека [4, 5].

Таким образом, изучение функционирования онкогенов – перспективное направление в разработке новых методов диагностики и лечения онкологических заболеваний. Долгое время считалось, что активация, связанная с последовательностями ДНК, ассоциированными с ретровирусом (retrovirus associated DNA sequences, RAS), киназой тирозиновых рецепторов (tyrosine-receptors kinase, TRK), семейством белков-аналогов myelocytomatosis (MYC) онкогенов, – это все, что нужно клетке для инициали-

зации неопластического роста [6, 7]. Однако недавние исследования показали существование таких онкогенов, как *INHA*, *DLL4* и *MMP2*. Известно, что наличие транскрипционных факторов, включая суперэнхансеры, способствует активации транскрипции генов и стимулирует трансформацию клетки из дефектного состояния в неопластическое. Именно поэтому мы решили в данном обзоре собрать и проанализировать имеющуюся информацию об относительно недавно открытых и малоизученных онкогенах *INHA*, *DLL4* и *MMP2*, которые контролируют важные функции, в том числе метастазирование и рост опухоли (см. таблицу).

INHA

INHA относится к генам, ответственным за фертильность яичников (ovarian infertility genes). Он кодирует TGF- β (transforming growth factor beta), часть суперсемейства белков, контролирующих функции половых желез. В этом гене также зашифрована информация об ингибинах и активинах, которые, соответственно, замедляют или ускоряют секрецию фоллитропина аденогипофизом.

Экспрессия данного гена начинается с образования пребелка, который подвергается протеолитическому расщеплению и распадается на несколько субъединиц, в том числе на α -субъединицу белковых комплексов ингибина А и В. Именно α -субъединица ингибина А – *INHA* (inhibin subunit alpha) – используется в диагностике опухолей гранулезных клеток (granulosa cells of tumours, GCT), а также в качестве маркера прогрессирующих онкологических заболеваний женских половых органов в сыворотке крови [8].

Ингибины и активины, экспрессируемые геном *INHA*, также участвуют в регуляции различных функций и процессов: секреции гликопротеиновых гормонов гипоталамо-гипофизарной системой (помимо

Сравнительная характеристика онкогенов *INHA*, *DLL4* и *MMP2*Comparative characteristic of oncogenes *INHA*, *DLL4* and *MMP2*

Характеристика Characteristics	Различия Differences	Общие свойства Common
Локализация Location	<i>INHA</i> – 2-я хромосома <i>INHA</i> – 2 nd chromosome <i>DLL4</i> – 15-я хромосома <i>DLL4</i> – 15 th chromosome <i>MMP2</i> – 16-я хромосома <i>MMP2</i> – 16 th chromosome	Не участвуют в развитии конкретного вида рака They are not involved in the development of a specific type of cancer (not specific)
Тканеспецифичность Tissue specificity	Гены <i>DLL4</i> и <i>MMP2</i> – отсутствует Genes <i>DLL4</i> and <i>MMP2</i> – don't have Ген <i>INHA</i> – клетки надпочечников, яичники и семенники, плацента Gen <i>INHA</i> – cells of the adrenal glands, ovaries and testes, placenta	Активны в эмбриональном периоде Active in the embryonic period
Внеклеточная локализация продукта экспрессии Extracellular localization of the expression product	Белок <i>INHA</i> – секретируется в кровь Protein <i>INHA</i> – blood Белок <i>DLL4</i> – не секретируется Protein <i>DLL4</i> – not secreted Белок <i>MMP2</i> – во внеклеточном матриксе Protein <i>MMP2</i> – extracellular matrix	Неактивны в иммунокомпетентных клетках Inactive in immunocompetent cells
Хранение в клетках Keeping in cells	Белки <i>INHA</i> и <i>MMP2</i> – в везикулах Proteins <i>INHA</i> and <i>MMP2</i> – in vesicles Белок <i>DLL4</i> – не хранится, продукт встраивается в мембраны клеток Protein <i>DLL4</i> embedded in cell membranes	–
Локализация продуктов экспрессии в структурах мозга Localization of expression products in brain structures	Белки <i>DLL4</i> и <i>MMP2</i> – не имеют Proteins <i>DLL4</i> and <i>MMP2</i> – don't have Белок <i>INHA</i> – в базальных ядрах Protein <i>INHA</i> – in basal nuclei	–
Молекулярные функции Molecular functions	Белок <i>INHA</i> – фактор роста и гормон Protein <i>INHA</i> is growth factor and hormone Белок <i>DLL4</i> – участвует в процессах развития организма Protein <i>DLL4</i> takes part in development of organisms Белок <i>MMP2</i> – гидролаза и металлопротеиназа Protein <i>MMP2</i> is the hydrolase and metalloproteinase	–
Физиологические процессы Physiological process	Белок <i>INHA</i> – половые функции Protein <i>INHA</i> – sexual function Белок <i>DLL4</i> – участвует в процессах ангиогенеза, дифференцировки, нейрогенеза, активации сигнального Notch-пути, сенсорной трансдукции и обеспечении процесса зрения Protein <i>DLL4</i> – angiogenesis, differentiation, neurogenesis, Notch-pathway, sensory transduction and vision process Белок <i>MMP2</i> – участвует в процессах ангиогенеза и разрушении коллагена Protein <i>MMP2</i> – angiogenesis and destruction of collagen	–

фоллитропина), гормонов половых желез (через увеличение секреции β -гидроксистероиддегидрогеназы (β -HSD), которая способствует производству половых гормонов); секреции инсулина поджелудочной железой; развития и созревания половых клеток; эритропоэза; перестройки костной ткани; а также в поддержании жизнедеятельности нервных клеток [8, 9]. Ингибины участвуют в регуляции пролиферации клеток, апоптоза и процессов, влияющих на развитие иммунного ответа.

Мутации в этом гене могут вызвать бесплодие у мужчин и преждевременную недостаточность яичников у женщин [10]. Так, у женщин с высокой экспрессией α -ингибина вероятность беременности при экстракорпоральном оплодотворении ниже [11].

INHA вовлечен в 2 сигнальных пути: PEDF-путь (pigment epithelium-derived factor) и метаболизм пептидных гормонов аденогипофиза [12]. А именно этот ген участвует во взаимодействии цитокин-цитоклиновых рецепторов. Также ген *INHA* участвует

в процессах старения клеток, вызванных стрессом теломер, что может быть причиной перерождения клеток в злокачественные.

Экспрессия INHA наблюдается в половых органах, а также в плаценте и надпочечниках. Причем по секретиции этого белка гранулезными клетками опухолей яичников и клетками Сертоли семенников можно идентифицировать онкологические заболевания [13, 14], а его иммуногистохимический анализ в тканях надпочечников позволяет отличить злокачественные стромальные опухоли от других неоплазм [15–17].

DLL4

Ген *DLL4* относится к семейству дельта-генов (*DLL1, 3, 4*). Продукт экспрессии гена *DLL4* – белок Delta-like 4, который является лигандом сигнального Notch-пути. Этот путь влияет на пролиферативную активность клеток во время нейрогенеза, а также ингибирует активность другого белка – Numb, что способствует дифференцировке нервных клеток.

Ген *DLL4* экспрессируется во многих тканях, являясь ключевым регулятором прорастания кровеносных сосудов. Он также отрицательно влияет на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток.

Белок *DLL4* нетканеспецифичен, главным образом локализуется в мембране клеток. Он участвует в важных процессах: ангиогенезе, дифференцировке клеток, нейрогенезе, сигнальном Notch-пути, сенсорной трансдукции и зрении. В последнем случае его роль связана с участием в процессе пролиферации предшественника сетчатки – белка сетчатки и в образовании палочек и колбочек путем регуляции их правильной дифференцировки.

Ген *DLL4* влияет на многие процессы, активируя различные сигнальные пути. Помимо активации сигнальных путей семейства Notch, его активность наблюдается при развитии рака молочной железы, а также при васкуляризации злокачественных опухолей разных типов.

Белок *DLL4* также участвует в регуляции дифференцировки CD4⁺-Т-лимфоцитов [18], которые являются активаторами процессов иммунитета, что может вызывать и противоопухолевую защиту. Кроме того, он участвует в дифференцировке эпителиальных клеток [19].

Одна из функций продукта экспрессии гена *DLL4* – регуляция ангиогенеза [20]. Эта функция была доказана в эксперименте 2018 г. на клетках гепатоцеллюлярной карциномы, вызванной вирусом гепатита В, *in vivo* [19]. Авторы показали, что *DLL4* является важным регуляторным фактором роста карциномы, ассоциированной с вирусом гепатита В. Этот эффект обусловлен тем, что регуляторный белок вируса HBV (viral hepatitis B protein), связываясь с рецептором *DLL4*, способствует пролиферации

клеток опухоли. По словам авторов, дальнейшая роль и способы регуляции *DLL4* в терапии карциномы требуют дополнительного изучения.

MMP2

Данный ген кодирует матриксную металлопротеиназу 2 (MMP2), которая относится к семейству цинк-зависимых эндопептидаз. Этот фермент внеклеточного матрикса выполняет множество функций в организме: участвует в ремоделировании сосудистой системы (в том числе в ангиогенезе), восстановлении тканей, инвазии и васкуляризации опухолей, воспалительных процессах, разрыве атеросклеротических бляшек и инактивации X-хромосом у женщин. Продукт экспрессии этого гена также принимает участие в деградации коллагена IV, V, VII, X типов, процессах гипоксии, протеолиза. К другим функциям MMP2 относится участие в отторжении эндометрия во время менструации у женщин и заживлении травм в тканях. Кроме того, может выполнять роль таких белков, как эндотелин-1 и β-тип CGRP (calcitonin gene-related peptide), который является вазоконстриктором. Возможно его участие в гибели клеток миокарда, так как MMP2 способствует окислительному стрессу миокарда через регуляцию активности GSK3 (glycogen synthase kinase 3 beta).

Из группы матриксных металлопротеиназ также выделяют мембранную эндопептидазу MMP14. Ранее было проведено исследование, в котором была показана роль гена, кодирующего этот фермент, при раке шейки матки. Подавление экспрессии этого гена снижало пролиферацию раковых клеток [21].

Высокая активность *MMP2* наблюдается также во время беременности [22]. Этот белок вместе с другими из этого же семейства причастен к расширению сосудов, имплантации и расширению матки во время роста плода. Высокая активность данных белков, возможно, связана с высоким уровнем женских половых гормонов (эстрогена и прогестерона).

MMP2 является прямым эффектором *p53* – важного гена, который задействован в регуляции клеточного деления. Также *MMP2* участвует в прорастании аксонов, передаче сигналов от цитокинов и интерлейкинов в процессе образования иммунного ответа, передаче сигнала эстрогена и гонадотропин-рилизинг гормона и других важных процессах.

Механизмы регуляции белков INHA, DLL4 и MMP2

α-субъединица ингибина А вместе с субъединицей ингибина В составляют единый комплекс INHВ, который уменьшает выработку фоллитропин-гликопротеина. Это гетеродимер, состоящий из 2 субъединиц: FSHB (follicle stimulating hormone beta subunit) и CGA (glycoprotein hormones, alpha polypeptide).

Действие комплекса INHIB, который выполняет функцию ингибитора, направлено на процесс объединения CGA и FSHB. При этом снижается скорость их соединения, а значит, и выработки фоллитропина. На этот же процесс оказывает влияние другой белок – активин, который также экспрессируется в гене *INHA*. Активин оказывает противоположное действие, ускоряя объединение в комплекс CGA и FSHB (рис. 1).

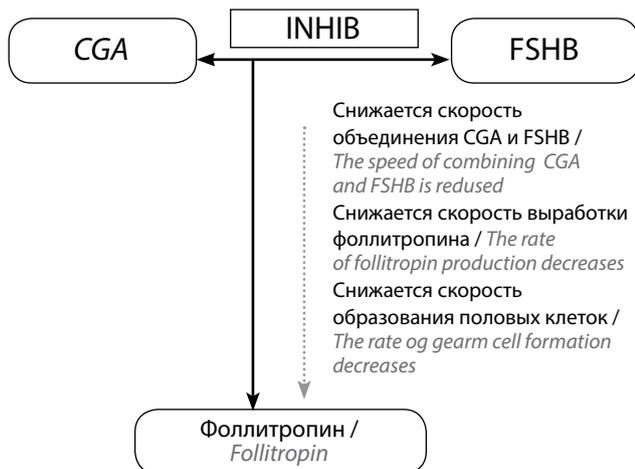


Рис. 1. Схема работы гена *INHA*. CGA – ген, экспрессирующий гликопротеиновые гормоны α -цепи фоллитропина; FSHB – субъединица β фоллитропина; INHIB – комплекс *INHA* и *INHIB*

Fig. 1. *INHA* gen's work scheme. CGA – gene that expresses the follitropin alpha-chain glycoprotein hormones; FSHB – subunit of beta follitropin; INHIB – complex of *INHA* and *INHIB*

Как видно из схемы, *INHA* действует как фактор роста, а механизм его действия схож с таковым у гормонов. Экспрессия *INHA* регулируется главным образом концентрацией рилизинг-гормонов гипофиза и либеринов и статинов гипоталамуса.

Регуляция экспрессии гена *DLL4* начинается с проводящего пути ангиопротеин-1/Tie2, который активирует PI3K/АКТ (фосфоинозитид-3-киназа/киназа АКТ) и, следовательно, транскрипцию гена β -катенина [23]. Транскрипцию гена контролируют 5 видов энхансеров и факторы транскрипции: ATF (adenosine triphosphate), GATA-2 (GATA Binding Protein 2), HEN1 (helix-loop-helix transcription factor 1), Nkx2-5 (NK2 homeobox 5), p53, Pax-5 (paired box 5), STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3).

Транскрипция генов семейства Notch – сложный процесс, который регулируется в зависимости от стадии развития и типа ткани. После трансляции образованные пребелки (pre-NOTCH1, pre-NOTCH2, pre-NOTCH3 и pre-NOTCH4) подвергаются модификациям в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Функционально активные Notch-белки – гетеродимеры, состоящие из внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного доменов. После посттрансляционной модификации они встраиваются

в мембраны клеток, где участвуют в межклеточной передаче сигналов.

Белок *DLL4*, взаимодействуя с белком митохондрией SYNJ2BP (synaptojanin 2 binding protein), объединяется с белками семейства Notch. Образовавшийся комплекс запускает каскадный механизм активации регуляторного внутриклеточного процесса транскрипции ряда генов (рис. 2).

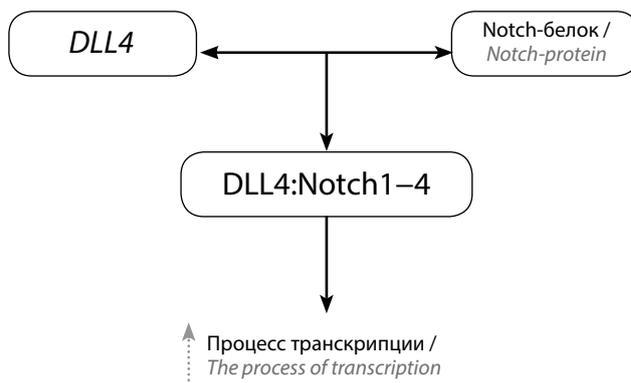


Рис. 2. Схема работы гена *DLL4*. Notch-сигнальный путь – высококонсервативный путь межклеточных взаимодействий

Fig. 2. *DLL4* gen's work scheme. Notch-signaling pathway – a highly conserved pathway of intercellular interactions

В норме экспрессия *MMP2* – низкая, так как большую часть времени данные ферменты, участвующие в перестройке межклеточного вещества и обновлении коллагена, неактивны. В раковых клетках происходит активация экспрессии этих генов (в том числе и *MMP2*) атипичными MAP-киназами (mitosis-activating protein kinase 4, 6, MAPK4, 6) (рис. 3).

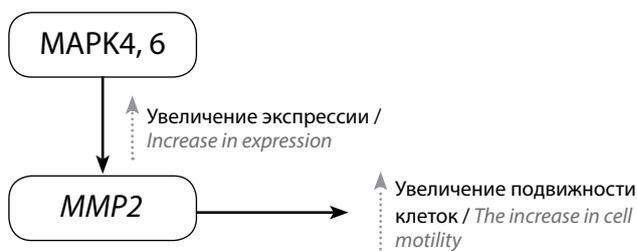


Рис. 3. Схема работы гена *MMP2*. MAPK – киназа белка, активирующего митоз 4,6

Fig. 3. *MMP2* gen's work scheme. MAPK – mitosis-activating protein kinase 4,6

Участие в развитии злокачественных новообразований

Белок *INHA* участвует в образовании опухолей надпочечников [24]. В настоящее время его используют в качестве специфического маркера неоплазий коры больших полушарий, а также опухолей надпочечников, поскольку его концентрация в данных

структурах достаточно высокая, а при образовании злокачественных опухолей к тому же увеличивается. Перспективным является использование INHA в качестве маркера феохромоцитом. В эксперименте T.J. Pelkey и соавт. на аденомах надпочечников и карциномах коры надпочечника, например, ген *INHA* был иммунореактивен только в 2 из 19 случаев, но выборка была не слишком большой, поэтому выводы делать пока рано [25].

В целом ингибины, к которым относится и INHA, экспрессируются в клетках многих видов рака [26]. INHA регулирует ангиогенез при метастазировании опухолей. Высокая активность этого белка в клинической диагностике используется в качестве маркера при мультифакториальном раке. Другими заболеваниями, связанными с этим геном, являются туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, трофобластическая опухоль плаценты, андробластома, цистаденома и капиллярная гемангиобластома.

В работах, описывающих влияние белка DLL4 на развитие злокачественных новообразований, сделаны противоречивые выводы. Так, показано, что ген *DLL4* чрезмерно экспрессируется во время роста опухолей, поэтому его блокада ингибирует их развитие и способствует уменьшению популяции раковых стволовых клеток. Также известно, что усиленная работа DLL4/Notch-сигнального пути снижает рост опухолевых клеток из-за ингибирования фактора роста эндотелия сосудов VEGF (vascular endothelial growth factor) [27]. В настоящее время белок DLL4 используют для диагностики рака шейки матки [28]. Кроме того, DLL4 участвует в образовании различных форм псевдоопухолевых процессов в головном мозге (ангиомы, гемангиомы, каверномы и др.). Также обнаружено, что DLL4 ускоряет рост клеток карциномы печени, это связано с его влиянием на прорастание кровеносных сосудов к опухолям [29]. Такую же функцию этот фактор выполняет в поддержании жизнедеятельности опухолей щитовидной железы [12]. Показано, что в эпителиальных клетках опухолей регистрируется высокая экспрессия *DLL4*, что является главным условием для ангиогенеза [29]. Была показана роль DLL4 в прогрессировании рака пищевода [30]. Как сообщают авторы, этот фактор является ключевым в миграции раковых клеток, их инвазии и апоптозе. В статье 2018 г. было отмечено, что DLL4 можно использовать как маркер мелкоклеточного рака легких [31].

Все это подтверждает необходимость дальнейшего изучения роли *DLL4* в развитии злокачественных новообразований. Уже были получены специфические антитела, нейтрализующие DLL4 [32, 33], сейчас они проходят клинические испытания.

Поскольку ферменты из группы металлопротеиназ участвуют в ремоделировании внеклеточного

матрикса путем разрушения нативной формы коллагеновых волокон, повышенная экспрессия этих ферментов может способствовать метастазированию опухолей и их распространению. Так, MMP2 и MMP3 способствуют метастазированию клеток плоскоклеточного рака гортани [34].

Показано, что сверхэкспрессия *MMP2* связана с развитием злокачественных глиом головного мозга, а также рака полости носа и колоректального рака [35]. Кроме того, *MMP2* регулирует инвазию клеток рака легких и повышает проницаемость сосудов при данной патологии [36, 37].

При развитии патологических процессов ген *MMP2* участвует в других сигнальных путях, среди которых путь AGE-RAGE (receptor for advanced glycation endproducts signaling pathway) при осложнениях, вызванных диабетом, при раке мочевого пузыря, развитии эндокринной резистентности, атеросклерозе, васкуляризации опухолей различной природы, а также в передаче сигнала от протеогликанов при развитии онкологий. Во время перерождения клеток MMP2 разрушает компоненты межклеточного матрикса, способствуя прорастанию метастазов опухоли и ее распространению.

Пути коррекции экспрессии белка в клинике

Учитывая, что экспрессия гена *INHA* зависит от концентрации половых гормонов, скорость его транскрипции можно регулировать, действуя на ось гипоталамус-гипофиз-гонады, например, изменяя концентрации рилизинг-гормонов, тропных или эффекторных гормонов, что возможно при проведении гормональной и гормонозаместительной терапии [38, 39].

В отличие от INHA, на активность DLL4 нельзя влиять через регуляцию других гормонов или сигнальных молекул. Можно регулировать экспрессию гена *DLL4* на стадии транскрипции, изменяя концентрацию факторов его транскрипции [40, 41]. Еще один способ изменения активности DLL4 – действие на Notch-сигнальный путь [42].

Активность *MMP2* пробовали регулировать с помощью фармакологических препаратов, что дало положительные результаты в терапии рака предстательной железы [43]. Мы хотим отметить, что изучение механизмов экспрессии генов *DLL4* и *MMP2* и разработка методов их регуляции позволят предотвратить васкуляризацию опухолей, что очень важно на ранних этапах выявления новообразований. Пока способы коррекции экспрессии рассматриваемых генов недостаточно изучены.

Заключение

По результатам анализа доступной литературы можно констатировать необходимость более глубокого изучения данных генов и разработки путей

коррекции их экспрессии. Для дальнейших исследований следует учитывать, что онкогены *INHA*, *DLL4* и *MMP2* являются многофункциональными, регулируют ряд важных функций. Поэтому коррекция ра-

боты и сохранение правильного функционирования этих генов позволит не только предотвратить развитие злокачественных новообразований, но и обеспечить нормальную деятельность всего организма.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Chen X., Yan Y., Zhou J. et al. Clinical prognostic value of isocitrate dehydrogenase mutation, O-6-methylguanidine-DNA methyltransferase promoter methylation, and 1p19q co-deletion in glioma patients. *Ann Transl Med* 2019;7(20):541. DOI: 10.21037/atm.2019.09.126. PMID: 31807523.
- Chen X., Zhang M., Gan H. et al. A novel enhancer regulates MGMT expression and promotes temozolomide resistance in glioblastoma. *Nat Commun* 2018;9(1):2949. DOI: 10.1038/s41467-018-05373-4. PMID: 30054476.
- Foster S.A., Whalen D.M., Özen A. et al. Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell* 2016;29(4):477–93. DOI: 10.1016/j.ccell.2016.02.010. PMID: 26996308.
- Saaddeh F.S., Mahfouz R., Assi H.I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas. *Int J Biol Markers* 2018;33(1):22–32. DOI: 10.5301/ijbm.5000301. PMID: 28885661.
- Fu Q., Song X., Liu Z. et al. miRNomics and Proteomics Reveal a miR-296-3p/PRKCA/FAK/Ras/c-Myc Feedback Loop Modulated by HDGF/DDX5/ β -catenin Complex in Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2017;23(20):6336–50. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2813. PMID: 28751441.
- Bunda S., Heir P., Metcalf J. et al. CIC protein instability contributes to tumorigenesis in glioblastoma. *Nat Commun* 2019;10(1):661. DOI: 10.1038/s41467-018-08087-9. PMID: 30737375.
- Booth L., Roberts J.L., Poklepovic A. et al. The levels of mutant K-RAS and mutant N-RAS are rapidly reduced in a Beclin1/ATG5-dependent fashion by the irreversible ERBB1/2/4 inhibitor neratinib. *Cancer Biol Ther* 2018;19(2):132–7. DOI: 10.1080/15384047.2017.1394556. PMID: 29219657.
- Wang C., Li C., Li H. et al. Down-regulation of the expression of inhibin α subunit and betaglycan in porcine cystic follicles. *J Vet Med Sci* 2015;77(11):1419–25. DOI: 10.1292/jvms.14-0617. PMID: 26097017.
- Huang M., Cheng Y.L., Zeng J.T. et al. Inhibin α -subunit inhibits BMP9-induced osteogenic differentiation through blocking BMP/Smad signal and activating NF- κ B signal in mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2018;119(10):8271–81. DOI: 10.1002/jcb.26843.
- Demyashkin G.A. Inhibin B in seminiferous tubules of human testes in normal spermatogenesis and in idiopathic infertility. *Syst Biol Reprod Med* 2019;65(1):20–8. DOI: 10.1080/19396368.2018.1478470. PMID: 29886763.
- Silveira C.O., Rezende C.P., Ferreira M.C. et al. Implantation Failure Is Associated With Increased α -Inhibin and β -Glycan Gene Expression in Secretory Phase Endometrium: Nested Case-Control Study of Infertile Women Undergoing IVF/Fresh Embryo Transfer. *Reprod Sci* 2017;24(5):720–5. DOI: 10.1177/1933719116667490. PMID: 27628954.
- Geers C., Colin I.M., Gérard A.C. Delta-like 4/Notch pathway is differentially regulated in benign and malignant thyroid tissues. *Thyroid* 2011;21(12):1323–30. DOI: 10.1089/thy.2010.0444. PMID: 22066479.
- Cooke I., O'Brien M., Charnock F.M. et al. Inhibin as a marker for ovarian cancer. *Br J Cancer* 1995;71(5):1046–50. DOI: 10.1038/bjc.1995.201. PMID: 7734297.
- Lappöhn R.E., Burger H.G., Bouma J. et al. Inhibin as a marker for granulosa-cell tumors. *N Engl J Med* 1989;321(12):790–3. DOI: 10.1056/NEJM198909213211204. PMID: 2770810.
- Flemming P., Wellmann A., Maschek H. et al. Monoclonal antibodies against inhibin represent key markers of adult granulosa cell tumors of the ovary even in their metastases. A report of three cases with late metastasis, being previously misinterpreted as hemangiopericytoma. *Am J Surg Pathol* 1995;19(8):927–33. DOI: 10.1097/0000478-199508000-00008. PMID: 7611539.
- Rishi M., Howard L.N., Bratthauer G.L., Tavassoli F.A. Use of monoclonal antibody against human inhibin as a marker for sex cord-stromal tumors of the ovary. *Am J Surg Pathol* 1997;21(5):583–9. DOI: 10.1097/0000478-199705000-00012. PMID: 9158684.
- Stewart C.J., Jeffers M.D., Kennedy A. Diagnostic value of inhibin immunoreactivity in ovarian gonadal stromal tumours and their histological mimics. *Histopathology* 1997;31(1):67–74. DOI: 10.1046/j.1365-2559.1997.5780819.x. PMID: 9253627.
- Ting H.A., de Almeida Nagata D., Rasky A.J. et al. Notch ligand Delta-like 4 induces epigenetic regulation of Treg cell differentiation and function in viral infection. *Mucosal Immunol* 2018;11(5):1524–36. DOI: 10.1038/s41385-018-0052-1. PMID: 30038214.
- Kunanopparat A., Issara-Amphorn J., Leelahavanichkul A. et al. Delta-like ligand 4 in hepatocellular carcinoma intrinsically promotes tumour growth and suppresses hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2018;24(34):3861–70. DOI: 10.3748/wjg.v24.i34.3861. PMID: 30228780.
- Hellström M., Phng L.K., Gerhardt H. VEGF and Notch signaling: the yin and yang of angiogenic sprouting. *Cell Adh Migr* 2007;1(3):133–6. DOI: 10.4161/cam.1.3.4978. PMID: 19262131.
- Li M., Ren C.X., Zhang J.M. et al. The Effects of miR-195-5p/MMP14 on Proliferation and Invasion of Cervical Carcinoma Cells Through TNF Signaling Pathway Based on Bioinformatics Analysis of Microarray Profiling. *Cell Physiol Biochem* 2018;50(4):1398–413. DOI: 10.1159/000494602. PMID: 30355924.
- Chen J., Khalil R.A. Matrix Metalloproteinases in Normal Pregnancy and Preeclampsia. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2017;148:87–165. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.04.001. PMID: 28662830.
- Oon C.E., Harris A.L. New pathways and mechanisms regulating and responding to Delta-like ligand 4-Notch signaling in tumour angiogenesis. *Biochem Soc Trans* 2011;39(6):1612–8. DOI: 10.1042/BST20110721. PMID: 22103496.
- Păun D., Neamtu M.C., Avramescu E.T. et al. Inhibin alpha-subunit, Melan A

- and MNF116 in pheochromocytomas. *Rom J Morphol Embryol* 2014;55(3):905–8. PMID: 25329118.
25. Pelkey T.J., Frierson H.F. Jr, Mills S.E., Stoler M.H. The alpha subunit of inhibin in adrenal cortical neoplasia. *Mod Pathol* 1998;11(6):516–24. PMID: 9647588.
 26. Singh P., Jenkins L.M., Horst B. et al. Inhibin Is a Novel Paracrine Factor for Tumor Angiogenesis and Metastasis. *Cancer Res* 2018;78(11):2978–89. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-2316. PMID: 29535220.
 27. Trindade A., Djokovic D., Gigante J. et al. Endothelial Dll4 overexpression reduces vascular response and inhibits tumor growth and metastasization *in vivo*. *BMC Cancer* 2017;17(1):189. DOI: 10.1186/s12885-017-3171-2. PMID: 28288569
 28. Yang S., Liu Y., Xia B. et al. DLL4 as a predictor of pelvic lymph node metastasis and a novel prognostic biomarker in patients with early-stage cervical cancer. *Tumour Biol* 2016;37(4):5063–74. DOI: 10.1007/s13277-015-4312-3.
 29. Patel N.S., Li J.L., Generali D. et al. Up-regulation of delta-like 4 ligand in human tumor vasculature and the role of basal expression in endothelial cell function. *Cancer Res* 2005;65(19):8690–7. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1208. PMID: 16204037.
 30. Guo X., Duan Y., Ye X. et al. Stable silencing of dll4 gene suppresses the growth and metastasis of esophagus cancer cells by attenuating Akt phosphorylation. *Oncol Rep* 2018;40(1):495–503. DOI: 10.3892/or.2018.6427. PMID: 29749499.
 31. Liu H., Peng J., Zhao M. et al. Downregulation of DLL4 predicts poor survival in non small cell lung cancer patients due to promotion of lymph node metastasis. *Oncol Rep* 2018;40(5):2988–96. DOI: 10.3892/or.2018.6679. PMID: 30226615.
 32. Chiorean E.G., LoRusso P., Strother R.M. et al. A Phase I First-in-Human Study of Enoticumab (REGN421), a Fully Human Delta-like Ligand 4 (Dll4) Monoclonal Antibody in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2015;21(12):2695–703. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2797. PMID: 25724527.
 33. Smith D.C., Eisenberg P.D., Manikhas G. et al. A phase I dose escalation and expansion study of the anticancer stem cell agent demcizumab (anti-DLL4) in patients with previously treated solid tumors. *Clin Cancer Res* 2014;20(24):6295–303. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1373. PMID: 25324140.
 34. Zhu Y., Yan L., Zhu W. et al. MMP2/3 promote the growth and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via PI3K/Akt-NF- κ B-mediated epithelial-mesenchymal transformation. *J Cell Physiol* 2019 [ahead of print]. DOI: 10.1002/jcp.28242. PMID: 30714134.
 35. Sincevičiūtė R., Vaitkienė P., Urbanavičiūtė R. et al. MMP2 is associated with glioma malignancy and patient outcome. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11(6):3010–8. PMID: 31938426.
 36. Liao H., Wang Z., Deng Z. et al. Curcumin inhibits lung cancer invasion and metastasis by attenuating GLUT1/MT1-MMP/MMP2 pathway. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(6):8948–57. PMID: 26309547.
 37. Tang L., Pei H., Yang Y. et al. The inhibition of calpains ameliorates vascular restenosis through MMP2/TGF- β 1 pathway. *Sci Rep* 2016;6:29975. DOI: 10.1038/srep29975. PMID: 27453531.
 38. Dafopoulos K., Venetis C., Messina C.I. et al. Inhibin secretion in women with the polycystic ovary syndrome before and after treatment with progesterone. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:59. DOI: 10.1186/1477-7827-9-59. PMID: 21529351.
 39. Burkhardt N., Jückstock J., Kuhn C. et al. Inhibin A is down-regulated during chemotherapy in patients with breast cancer. *Anticancer Res* 2010;30(11):4563–6. PMID: 21115906.
 40. Hall K., Ran S. Regulation of tumor angiogenesis by the local environment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 2010;15:195–212. DOI: 10.2741/3615. PMID: 20036815.
 41. Huang J., Hu W., Hu L. et al. Dll4 Inhibition plus Aflibercept Markedly Reduces Ovarian Tumor Growth. *Mol Cancer Ther* 2016;15(6):1344–52. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0144. PMID: 27009216.
 42. Masuko K., Masaru K. Precision medicine for human cancers with Notch signaling dysregulation (Review). *Int J Mol Med* 2020;45(2):279–97. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4418. PMID: 31894255.
 43. Murray N.P., Reyes E., Badinez L. et al. Effect of androgen blockade on HER-2 and matrix metalloproteinase-2 expression on bone marrow micro-metastasis and stromal cells in men with prostate cancer. *ScientificWorld-Journal* 2013;2013:281291. DOI: 10.1155/2013/281291. PMID: 23766685.

Вклад авторов

И.С. Карлина: обзор публикаций по теме статьи и написание текста рукописи;

Е.С. Горожанина: редактирование рисунков статьи;

И.В. Уласов: обзор публикаций по теме статьи, помощь в оформлении статьи.

Authors contributions

I.S. Karlina: articles review, writing the text of the article;

E.S. Gorozhanina: editing pictures for the paper;

I.V. Ulasov: articles review, article formatting.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.С. Карлина / I.S. Karlina: <https://orcid.org/0000-0003-1929-9551>;

Е.С. Горожанина / E.S. Gorozhanina: <https://orcid.org/0000-0002-9529-7606>;

И.В. Уласов / I.V. Ulasov: <https://orcid.org/0000-0002-0818-0363>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила: 07.09.2020. **Принята к публикации:** 27.01.2021.

Article submitted: 07.09.2020. **Accepted for publication:** 27.01.2021.

PI3K/Akt/mTOR: вклад в формирование фенотипа опухоли, чувствительного к тамоксифену

Т.А. Дронова^{1,2}, Н.Н. Бабышкина¹⁻³, Н.В. Матвиенко³, Е.М. Слонимская⁴, Н.В. Чердынцева^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт онкологии ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук»; Россия, 634009 Томск, пер. Кооперативный, 5;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет»; Россия, 634050 Томск, пр-кт Ленина, 36;

³ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 634050 Томск, Московский тракт, 22;

⁴ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; Россия, 199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 13Б

Контакты: Татьяна Анатольевна Дронова tanyadronova@mail.ru

PI3K/Akt/mTOR-каскад является ключевой системой передачи сигнала, который связывает онкогены и разнообразные классы рецепторов со многими клеточными функциями, способствует устойчивости к эстрогенам. Это наиболее часто активируемый сигнальный путь при злокачественных новообразованиях, в том числе при раке молочной железы (РМЖ). Известно, что около 70 % случаев РМЖ представляют собой гормонозависимые опухоли, основным компонентом лечения которых является эндокринная терапия. Тамоксифен остается одним из базовых препаратов для проведения адъювантной эндокринотерапии у больных эстроген-позитивным РМЖ. Однако, несмотря на благоприятный прогноз такого лечения, у 25–30 % пациентов отмечается рецидив либо прогрессирование заболевания вследствие приобретенной устойчивости к данному препарату. Развитие резистентности к тамоксифену – одна из ключевых клинических проблем лечения эстроген-позитивного РМЖ. Предполагается, что одним из механизмов неэффективности проводимой терапии служат перекрестные взаимодействия эстрогеновых рецепторов и PI3K/Akt/mTOR-пути, обеспечивающие устойчивость злокачественных клеток к противоопухолевой терапии. В настоящем обзоре обобщены современные данные литературы о роли этого каскада в механизмах формирования гормональной резистентности, включая полную характеристику его звеньев и особенности взаимодействия PI3K/Akt/mTOR с рецепторами эстрогенов. Представлены результаты исследований основных компонентов каскада в качестве молекулярных маркеров ответа на терапию тамоксифеном у больных эстроген-позитивным РМЖ. Дальнейшее изучение взаимодействия PI3K/Akt/mTOR с различными сигнальными каскадами будет способствовать как пониманию фундаментальных процессов канцерогенеза, так и разработке новых молекулярно-направленных противоопухолевых препаратов для терапии тамоксифен-резистентных опухолей молочной железы.

Ключевые слова: PI3K/Akt/mTOR, эстроген-позитивный рак молочной железы, тамоксифен, механизмы резистентности

Для цитирования: Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Матвиенко Н.В. и др. PI3K/Akt/mTOR: вклад в формирование фенотипа опухоли, чувствительного к тамоксифену. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):16–23.

PI3K/Akt/mTOR: contribution to the tumor phenotype sensitive to tamoxifen

Tatyana A. Dronova^{1,2}, Natalia N. Babyskhina¹⁻³, Natalya V. Matvienko³, Elena M. Slonimskaya⁴, Nadezhda V. Cherdynseva^{1,2}

¹Cancer Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences; 5 Kooperativny St., Tomsk 634009, Russia

²National Research Tomsk State University; 36 Lenina Avenue, Tomsk 634050, Russia

³Siberian State Medical University, Ministry of Health of Russia; 2 Moskovsky tract, Tomsk 634050, Russia

⁴St Petersburg University; 13B Universitetskaya Emb., St Petersburg 199034, Russia

Contacts: Tatyana Anatolievna Dronova tanyadronova@mail.ru

The PI3K/Akt/mTOR is a key signaling system that binds oncogenes and various receptors to many cell functions, promotes estrogen resistance, and is the most frequently activated signaling pathway in malignant neoplasm, including breast cancer (BC). About 70 % of BC is hormone-receptor positive and the endocrine therapy is the main component of treatment for hormone-receptor positive BC patients. Tamoxifen remains one of the basic drugs for adjuvant endocrine therapy in estrogen-positive BC patients. However, due to acquired resistance to this drug, 25–30 % of patients develop a relapse or disease progression. Resistance to tamoxifen is one of the key clinical problems in the treatment of estrogen-positive BC. The potential mechanisms of tamoxifen resistance may be associated with crosstalk between estrogen receptors and PI3K/Akt/mTOR signaling. This review summarizes the current literature data on the role of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the mechanisms of hormonal resistance, including a complete characterization of its main components and the features of PI3K/Akt/mTOR interaction with estrogen receptors. The results of studies of the main components of the cascade as molecular markers of response to tamoxifen therapy in estrogen-positive BC patients are presented. Further study of the PI3K/Akt/mTOR crosstalk with various signaling pathways will contribute to both the understanding of carcinogenesis and the development of new molecular-targeted anticancer drugs for the treatment of tamoxifen-resistant breast tumors.

Key words: PI3K/Akt/mTOR, estrogen-receptor positive breast cancer, tamoxifen, resistance mechanisms

For citation: Dronova T.A., Babyshkina N.N., Matvienko N.V. et al. PI3K/Akt/mTOR: contribution to the tumor phenotype sensitive to tamoxifen. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):16–23. (In Russ.).

Введение

Поиск активированных при канцерогенезе сигнальных путей и подавление их активности является одной из актуальных задач современной онкологии. Сигнальный путь, опосредованный фосфоинозитид-3-киназой (PI3K), играет ключевую роль в патогенезе различных злокачественных новообразований, в том числе эстроген-позитивного рака молочной железы (РМЖ), чувствительного к гормональной терапии. Несмотря на достоверное улучшение отдаленных результатов лечения тамоксифеном, который используется в качестве основного антиэстрогенного препарата для проведения гормонотерапии у больных эстроген-позитивным РМЖ, отсутствие положительного терапевтического ответа от его применения или возникновение резистентности к нему значительно снижают эффективность контроля над заболеванием [1]. В настоящее время доказано, что регуляторная роль PI3K/Akt/mTOR-каскада в процессах пролиферации и метаболизма клеток и его широкая коммуникативность с другими внутриклеточными сигнальными путями во многом может определять развитие опухолевого фенотипа, резистентного к гормональной терапии [2, 3].

Активация каскада осуществляется за счет взаимодействия рецепторов, сопряженных с G-белками, или фосфорилированных тирозиновых остатков рецепторов факторов роста с SH₂-доменом регуляторной субъединицы p85 белка PI3K. В итоге данное взаимодействие приводит к аллостерической активации каталитической субъединицы p110 белка PI3K и генерации фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PI-4,5-P₂) в фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат (PI-3,4,5-P₃). Образующиеся трифосфаты рекрутируют к плазматической мембране

сигнальные белки, такие как Akt1 и серин/треонинкиназа (3'-фосфоинозитид-зависимая киназа 1, PDK1), содержащие плекстрин-гомологичный домен (PH) [4]. Фосфорилирование и активация Akt1 происходит посредством PDK1 в положении Thr-308 и комплекса mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2), либо DNA-ПК (DNA-dependent protein kinase) в положении Ser-473, что способствует ее перемещению в клеточное ядро для дальнейшего фосфорилирования белков-мишеней, отвечающих за многочисленные клеточные процессы [5].

В экспериментальных исследованиях показано, что в результате фосфорилирования эстрогенового рецептора α (ER α) по Ser167 и Ser118 посредством PI3K/Akt/mTOR происходит стабилизация его взаимодействия с ER-зависимыми промоторами, что приводит к повышенной экспрессии эстроген-регулируемых генов и формированию устойчивости клеток к тамоксифену [6, 7]. Клинические данные подтверждают связь между активностью PI3K/Akt/mTOR-каскада и резистентностью к гормонотерапии тамоксифеном [8].

Характеристика компонентов PI3K/Akt/mTOR-каскада

PI3K. PI3K, гетеродимерная молекула, принадлежащая к классу липид-киназ, является ключевым элементом PI3K/Akt/mTOR-каскада. В соответствии со структурой, механизмами регуляции и специфичности по отношению к субстрату среди PI3-киназ выделяют 3 класса: PI3K I, PI3K II и PI3K III [9]. Класс PI3K I изучен наиболее широко и в зависимости от типа субъединиц разделяется на подклассы IA и IB. PI3K подкласса IA представляет собой гетеродимер, состоящий из каталитической субъединицы,

которая может быть представлена изоформами p110 α , p110 β или p110 δ , и регуляторной субъединицы, имеющей изоформы p85 α , p55 α , p50 α , p85 β и p55 γ . Активация данного подкласса осуществляется посредством рецепторных тирозинкиназ, а также рецепторов, ассоциированных с G-белками [10]. Гетеродимеры, включающие в свой состав регуляторный белок p101 или p84 и связанную с ним каталитическую субъединицу p110 γ , объединены в подкласс PI3K IB, который также активируется рецепторами, ассоциированными с G-белками [11].

Киназы класса II имеют только каталитическую субъединицу, представленную изоформами PI3K α , PI3K β и PI3K γ . Характерным отличием PI3K данного подкласса является отсутствие ответственного за связывание кальция С-концевого домена [12]. Функциональная роль подкласса II мало изучена, однако существуют исследования, свидетельствующие о возможном участии данного подкласса в регуляции процессов клеточного роста, а также ангиогенеза [13].

В отличие от класса II, гетеродимерный комплекс PI3K класса III включает как регуляторную p150, так и каталитическую Vps34 субъединицы, и отвечает за регуляцию внутриклеточного транспорта везикул и белков [14].

Акт. Семейство протеинкиназ В (Акт) представлено 3 гомологичными (на 77–82 %) изоформами Akt1, Akt2, Akt3, имеющими длину около 479–481 пар оснований, и состоящими из 4 доменов – N-концевого плекстрин-гомологичного, линкерной области, киназного и С-концевого регуляторного участка [15]. Активация данных белков происходит за счет гормональных рецепторов посредством PI3K и общих внутриклеточных сигнальных путей факторов роста. Каждая из изоформ контролирует множество каскадов, включающих фосфорилирование mTORC1, GSK3 α и GSK3 β [16]. Экспериментальные исследования, проведенные на клетках РМЖ линии MCF-7, показали, что при гиперэкспрессии конститутивно активной Akt1 происходит стимуляция клеточной пролиферации, рост опухоли, а также снижение процессов клеточной подвижности и инвазии [17]. Тем не менее потеря экспрессии Akt1 в клетках РМЖ обуславливала усиление процессов клеточной миграции за счет гиперэкспрессии Akt2 [18]. Таким образом, каждая из изоформ Akt может характеризоваться как различными, так и перекрывающимися функциональными возможностями.

mTOR. Белок mTOR (mammalian target of rapamycin) является ключевой мишенью PI3K/Akt/mTOR-сигналинга [19]. В клетках данная протеинкиназа серин-треониновой специфичности представлена в виде каталитической субъединицы двух мультибелковых комплексов – mTORC1 и mTORC2. Канонический, чувствительный к рапамицину mTORC1 включает

следующие белки: mTOR, Raptor (regulatory-associated protein of TOR), PRAS40 (proline-rich PKB/AKT substrate 40kDa), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8), Deptor (domain containing mTOR interacting protein), Tti1 (KIAA0406) и Tel2 (telomere maintenance 2).

Белок Raptor регулирует сборку mTORC1 и отвечает за внутриклеточную локализацию комплекса. Белки Deptor и PRAS40 негативно регулируют активность mTORC1 [20]. Стабильность сборки комплекса mTORC1 поддерживается за счет белков Tti1/Tel2, в то время как функциональная роль mLST8 до сих пор не выяснена [21]. Ключевой функцией mTORC1 является регуляция транскрипции, процессов биосинтеза белка, апоптоза, а также деления клеток и метаболизма. При активации PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути происходит инактивация димеризации белков TSC1/TSC2 и фосфорилирование Akt [19]. Данные внутриклеточные процессы приводят к активации комплекса mTORC1 и последующему фосфорилированию белков-эффекторов: транскрипционного репрессора 4E-BP1 (eIF-4E binding protein 1) и рибосомального белка S6K1 (p70 ribosomal protein S6 kinase – S6K) [22]. При фосфорилировании 4E-BP1 происходит его инактивация, высвобождение фактора eIF-4E и последующее образование функционально активного комплекса, что приводит к стимуляции синтеза белка [23]. Активация резистентного к рапамицину киназного комплекса mTORC2 происходит посредством только факторов роста. Основная функция mTORC2 – регуляция активности Akt и организация актинового цитоскелета клетки [21].

В отличие от mTORC1, в состав mTORC2 входят не только белки mTOR, Deptor, mLST8, Tti1 и Tel2, но и белки Rictor (rapamycin-insensitive companion of TOR), Protor (protein observed with rictor), G β L (G protein beta subunit-like) и mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase (SAPK) – interacting protein 1). Rictor конкурирует с Raptor за связывание с киназой mTOR. Наличие mLST8 необходимо для поддержания киназной активности комплекса, а белок mSin1 стабилизирует 2-й комплекс киназы mTOR. Также выявлено, что комплекс mTORC1 может регулировать активность mTORC2. Данная регуляция происходит за счет фосфорилирования белка Rictor в положении Thr1135 киназой S6K1 комплекса mTORC1 и последующего ингибирования 2-го комплекса [24].

PTEN. В качестве негативного регулятора PI3K/Akt/mTOR-каскада выступает фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатаза (PTEN). Данный белок содержит следующие структурные компоненты: короткий N-концевой домен связывания фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата, домен C2, фосфатазный и С-концевой домены, а также участок, связывающий PDZ-домен. Каждый из них обладает своей функциональной значимостью. Так, фосфатазный домен содержит активный сайт связывания,

осуществляющий ферментативную функцию, которая отвечает за дефосфорилирование фосфоинозитол-3-фосфата в дифосфат (PIP3→PIP2), при этом происходит ингибирование фосфорилирования Akt и прекращение передачи сигнала [25]. Домен C2 отвечает за связывание фосфолипидов и удержание молекулы на поверхности мембраны, в то время как C-концевой домен PTEN регулирует стабильность белка. N-концевой домен имеет гомологичное сходство по аминокислотной последовательности с актин-связывающимся белком тензином [26].

EGFR. Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR, HER-1) принадлежит к семейству рецепторных тирозинкиназ ErbB, которое состоит из 4 трансмембранных белков: ErbB1/EGFR, ErbB2/HER2, ErbB3/HER3 и ErbB4/HER4 [27]. Все члены семейства ErbB имеют сходное строение, состоят из внеклеточного домена, одного гидрофобного трансмембранного сегмента и внутриклеточного участка с протеинкиназной активностью, который может быть активирован после гомо- или гетеродимеризации рецептора, что приводит к автофосфорилированию тирозина и инициации нижележащих сигнальных каскадов, включая PI3K/Akt/mTOR и MAPK. В качестве лигандов EGFR с высоким сродством выступают эпидермальный фактор роста, трансформирующий фактор роста α , β -целлюлин, гепарин-связывающий фактор роста, тогда как амфигулин, эпигулин и эпиген являются низкоаффинными лигандами [28]. Показано, что гиперэкспрессия EGFR определяет резистентность к гормональной терапии и неблагоприятный прогноз больных РМЖ [29]. В доклинических исследованиях на тамоксифен-резистентных клеточных линиях РМЖ MCF-7 представлены данные, свидетельствующие о том, что селективный ингибитор тирозинкиназных рецепторов гефитиниб эффективно блокирует гетеродимеризацию EGFR-HER2, фосфорилирование и PI3K/Akt/mTOR-сигнальную трансдукцию [30].

Особенности регуляции PI3K/Akt/mTOR-каскада при эстроген-позитивном РМЖ

В настоящее время доказано, что между внутриклеточными путями ER α и PI3K/Akt/mTOR существуют перекрестные связи, реализация которых происходит как прямым, так и косвенным взаимодействием на разных уровнях каждого из них. Так, установлено, что PI3K/Akt/mTOR-сигналинг способен активировать эстроген-независимую транскрипционную активность ER [2], тем самым регулируя клеточную пролиферацию в отсутствие эстрогенов. Данная активация происходит посредством прямого фосфорилирования эстрогенового рецептора по сайту Ser167 киназой S6 или Akt [31]. С другой стороны, Ras/PI3K/Akt внутриклеточный сигнальный путь

за счет фосфорилирования c-Jun приводит к активации транскрипционного фактора AP-1, который отвечает за процессы регуляции транскрипции ER α . Однако ER α может активировать транскрипцию генов, кодирующих инициаторы активации PI3K/Akt/mTOR, включая как рецепторные тирозинкиназы, различные адаптерные молекулы, так и лиганды рецепторов факторов роста [2]. Прямое взаимодействие эстроген-связанной формы ER α с субъединицей p85 киназы PI3 приводит к стимуляции PI3K/Akt/mTOR, что свидетельствует об активации данного каскада посредством внеядерных ER α -зависимых механизмов [32].

Проведенные исследования указывают на наличие отрицательной корреляционной связи между уровнем экспрессии ER α в опухолевой ткани эстроген-позитивного РМЖ и степенью активации PI3K как на транскриптомном, так и протеомном уровнях; в то время как высокая активность PI3K и низкий уровень экспрессии ER α определяют неэффективность проводимой гормонотерапии [33]. Кроме того, низкий уровень экспрессии ER α и неблагоприятный исход заболевания связаны с потерей опухолевыми клетками экспрессии PTEN [34]. В одном из проведенных исследований на клеточных линиях РМЖ MCF-7 продемонстрировано, что конститутивная гиперэкспрессия Akt ассоциирована с резистентностью к фулвестранту и тамоксифену [7]. Однако инактивация PI3K/Akt/mTOR с применением клеточных линий РМЖ приводит к увеличению экспрессии мРНК гена *ESR1*, что способствует повышению чувствительности опухолевых клеток к препарату тамоксифен [33]. Вероятно, восстановление гормонозависимости опухолевых клеток и их чувствительности к проводимой терапии может происходить за счет инактивации PI3K/Akt/mTOR посредством регуляторных механизмов экспрессии ER α .

Компоненты PI3K/Akt/mTOR как молекулярные маркеры ответа на терапию тамоксифеном

Наиболее распространенные генетические события при эстроген-позитивном РМЖ представляют собой мутации гена *PIK3CA*, кодирующего каталитическую α -субъединицу PI3K. До 80 % данных генетических нарушений представляют миссенс-мутации, включающие hotspot-мутации E542K, E545K и H1047R и локализующиеся в хеликазном и киназном доменах (экзоны 9 и 20), которые определяют высокую каталитическую активность PI3K, способствующей лиганд-независимой активации PI3K/Akt/mTOR-сигналинга [35]. Значительно реже отмечаются мутации *PIK3R1* (1–2 %), *Akt1* (2–3 %) и *PTEN* (2–4 %) [36]. В настоящее время данные о прогностической роли мутаций *PIK3CA/Akt1* при эстроген-позитивных

опухолях противоречивы. Одни из исследований подтверждают взаимосвязь данных маркеров с неблагоприятным исходом, в других продемонстрирована ассоциация генетических нарушений *PIK3CA/Akt1* с благоприятным прогнозом заболевания. Однако существуют работы, в которых не выявлено достоверных корреляций между мутациями *PIK3CA/Akt1* и прогнозом заболевания среди пациенток с эстроген-позитивным РМЖ [37–42].

На сегодняшний день также нет однозначного мнения относительно взаимосвязи между мутациями *PIK3CA* и уровнем фосфорилированной Akt1 (Ser473, Thr308), которая является наиболее часто используемым маркером активации PI3K/Akt/mTOR-сигналинга; исследования включают как данные, подтверждающие положительную корреляционную зависимость указанных маркеров [43], так и ее отсутствие [44]. Установлено, что высокий уровень экспрессии Akt (pS473) ассоциирован с неэффективным ответом на тамоксифен среди пациенток в период постменопаузы без метастатического поражения регионарных лимфатических узлов [8]. Кроме того, обнаружена ассоциация высокого уровня экспрессии Akt с низкими показателями общей выживаемости у больных РМЖ, получавших терапию тамоксифеном [45]. Недавно опубликованные результаты собственных исследований также подтверждают прямую зависимость высокого уровня экспрессии Akt (pS473) с развитием резистентности к тамоксифену и сокращением времени до прогрессирования заболевания среди пациенток, получавших тамоксифен в течение 5 лет [46].

При эстроген-позитивном РМЖ частота соматических мутаций гена *P TEN* составляет 5–10 %, а потеря, либо снижение его экспрессии, связаны с неблагоприятным исходом заболевания [47]. Потеря гетерозиготности в гене *P TEN* может обуславливать снижение иммуногистохимической экспрессии белка, что коррелирует с резистентностью к тамоксифену, рецидивами заболевания и низкими показателями выживаемости у больных РМЖ [48]. Кроме того, показано, что активация Akt и снижение экспрессии *P TEN* связаны с неэффективностью гормональной терапии и рецидивом заболевания у пациентов, получавших тамоксифен [49]. Следует отметить, что уровень экспрессии фосфорилированных форм Akt1, p70S6K и mTOR был достоверно выше в опухолях с низкой экспрессией *P TEN* по сравнению с высокоэкспрессирующими *P TEN* опухолями [50]. Низкие показатели экспрессии фосфорилированной формы mTOR в опухоли ассоциированы с наличием эффективного ответа на тамоксифен у больных ER/PR-позитивным РМЖ [8].

Вклад тирозинкиназы EGFR в механизмы неэффективности гормональной терапии несомненен,

на что указывает большое количество проведенных исследований, свидетельствующих о том, что экспрессия мРНК гена *EGFR* и его продукта значительно выше в опухолевой ткани больных, не отвечающих на гормонотерапию тамоксифеном [51–53]. Проведенное нами исследование согласуется с представленными данными и указывает на то, что эстроген-позитивные опухоли, экспрессирующие высокие значения EGFR, потенциально резистентны к тамоксифену [54].

Многочисленные исследования показали, что около 20 % больных метастатическим РМЖ имеют мутации в лиганд-связывающем домене ER α , возникающие на фоне гормонотерапии. В большинстве случаев это hotspot-мутации, затрагивающие сайты фосфорилирования Y537 и D538, а также приводящие к лиганд-независимой активации ER α , которая, в свою очередь, отвечает за рост опухоли, ее метастатический потенциал и резистентность к антиэстрогенам [55–57]. Предполагают, что интенсивное рекрутирование коактиваторов SRC-3 и увеличение транскрипционной активности ER α происходит посредством конститутивной активности ER α , обусловленной мутациями Y537S и D538G, которая связана с внутренней способностью мутантных рецепторов конформационно изменяться в отсутствие эстрогенов [58]. Помимо мутаций, определенный вклад в механизмы резистентности к гормональной терапии могут вносить однонуклеотидные полиморфизмы (точечные мутации или SNP) гена *ESR1*. Показано, что мутантные генотипы *ESR1* PvuII TT полиморфного локуса rs2234693, а также мутантные варианты *ESR1* XbaI AA полиморфного локуса rs9340799 гена *ESR1* являются предикторами ответа на тамоксифен у больных РМЖ [59]. Наш собственный опыт изучения 2 синонимичных SNP *ESR1* +30T>C rs2077647 и *ESR1* 2014G>A rs2228480 свидетельствует о том, что неэффективность терапии тамоксифеном может быть связана с носительством мутантных генотипов полиморфного локуса rs2228480 как у больных люминальным В подтипом опухоли, так и в общей когорте больных эстроген-позитивным РМЖ [60]. Учитывая локализацию данной синонимичной замены в кодоне 594 F домена, который принимает участие в процессе димеризации и транскрипционной активности ER α , можно предположить, что мутации данной области гена обуславливают образование транскрипционно-неактивного или нерастворимого рецептора, что изменяет способность ER α взаимодействовать с препаратом тамоксифен и способствует резистентности.

Многочисленные исследования, посвященные фундаментальной роли PI3K/Akt/mTOR-каскада в механизмах резистентности к гормонотерапии, фактически обосновали подходы к преодолению ее развития с использованием комбинированного лечения антиэстрогенами и ингибиторами PI3K/Akt/mTOR.

На сегодняшний день проводятся клинические испытания большого количества ингибиторов PI3K/Akt/mTOR-каскада. Прежде всего они нацелены на ключевые компоненты сигналинга: все изоформы PI3-киназы (пан-PI3K-ингибиторы – GDC-094, пиктилизиб ВКМ120 бупарлизиб), α -изоформы PI3-киназы (α -специфичные ингибиторы PI3K – GDC-0032 тазелизиб, ВУЛ719 альпелизиб), все существующие изоформы Akt (пан-Akt-ингибиторы – AZD5363, МК2206), mTOR (RAD001 эверолимус, ССИ-779 темсиролимус, AP23573 дефоролимус), а также сочетание 2 мишеней PI3K/mTOR (двойной ингибитор PI3K/mTOR – GDC-0980). Клинические исследования ингибиторов PI3K, Akt и PI3K/mTOR у пациентов с диагнозом эстроген-позитивного РМЖ указывают на их потенциальную эффективность в механизмах инактивации PI3K/Akt/mTOR-каскада.

Закключение

Возможности создания новых подходов к контролю опухолевого процесса и персонификации

лечения РМЖ связаны с изучением многогранных механизмов, ответственных за устойчивость опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям. PI3K/Akt/mTOR-сигнальный путь представляет одну из магистральных внутриклеточных систем, изменение активности которой определяет биологическое поведение опухоли и устойчивость к действию антиэстрогенного препарата – тамоксифена. Значительные достижения в области исследования механизмов регуляции PI3K/Akt/mTOR в эстроген-позитивных опухолях молочной железы позволили определить множество молекулярных точек приложения для поиска маркеров эффективности тамоксифена и прогноза заболевания. Дальнейшее углубленное изучение взаимодействия PI3K/Akt/mTOR с различными сигнальными каскадами будет способствовать как пониманию фундаментальных процессов канцерогенеза, так и разработке новых молекулярно-направленных противоопухолевых препаратов для терапии тамоксифен-резистентных опухолей молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Pan H., Gray R., Braybrooke J. et al. 20-year risks of breast-cancer recurrence after stopping endocrine therapy at 5 years. *N Engl J Med* 2017;377:1836–46. DOI: 10.1056/NEJMoa1701830. PMID: 29117498.
- Viedma-Rodriguez R., Baiza-Gutman L., Salamanca-Gomez F. et al. Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncol Rep* 2014;32(1):3–15. DOI: 10.3892/or.2014.3190. PMID: 24841429.
- Mills J.N., Rutkovsky A.C., Giordano A. Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors. *Curr Opin Pharmacol* 2018;41:59–65. DOI: 10.1016/j.coph.2018.04.009. PMID: 29719270.
- Manning B.D., Cantley L.C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129(7):1261–74. DOI: 10.1016/j.cell.2007.06.009.
- Franke T.F. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 2008;27(50):6473–88. DOI: 10.1038/onc.2008.313. PMID: 18955974.
- Campbell R.A., Bhat-Nakshatri P., Patel N.M. et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha: a new model for anti-estrogen resistance. *J Biol Chem* 2001;276:9817–24. DOI: 10.1074/jbc.M010840200. PMID: 11139588.
- Faridi J., Wang L., Endemann G. et al. Expression of constitutively active Akt-3 in MCF-7 breast cancer cells reverses the estrogen and tamoxifen responsiveness of these cells in vivo. *Clin Cancer Res* 2003;9:2933–39. PMID: 12912939.
- Bostner J., Karlsson E., Pandiyan M.J. et al. Activation of Akt, mTOR, and the estrogen receptor as a signature to predict tamoxifen treatment benefit. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137(2):397–406. DOI: 10.1007/s10549-012-2376-y. PMID: 23242584.
- Mayer I.A., Arteaga C.L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment. *Annu Rev Med* 2016;67:11–28. DOI: 10.1146/annurev-med-062913-051343. PMID: 26473415.
- Guillemet-Guibert J., Bjorklof K., Salpekar A. et al. The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(24):8292–97. DOI: 10.1073/pnas.0707761105. PMID: 18544649.
- Courtney K.D., Corcoran R.B., Engelman J.A. The PI3K pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(6):1075–83. DOI: 10.1200/JCO.2009.25.3641. PMID: 20085938.
- Falasca M., Maffucci T. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem J* 2012;443(3):587–601. DOI: 10.1042/BJ20120008. PMID: 22507127.
- Yoshioka K., Yoshida K., Cui H. et al. Endothelial PI3K-C2alpha, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med* 2012;18(10):1560–69. DOI: 10.1038/nm.2928. PMID: 22983395.
- Raiborg C., Schink K.O., Stenmark H. Class III phosphatidylinositol 3-kinase and its catalytic product PtdIns3P in regulation of endocytic membrane traffic. *FEBS J* 2013;280:2730–42. DOI: 10.1111/febs.12116. PMID: 23289851.
- Manning B.D., Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell* 2017;169(3):381–405. DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.001. PMID: 28431241.
- Hers I., Vincent E.E., Tavaré J.M. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 2011;23(10):1515–27. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.05.004. PMID: 21620960.
- Liu H., Radisky D.C., Nelson C.M. et al. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(11):4134–9. DOI: 10.1073/pnas.0511342103. PMID: 16537497.
- Irie H.Y., Pearline R.V., Grueneberg D. et al. Distinct roles of Akt1 and Akt2

- in regulating cell migration and epithelial mesenchymal transition. *J Cell Biol* 2005;171(6):1023–34. DOI: 10.1083/jcb.200505087. PMID: 16365168.
19. Peterson T.R., Laplante M., Thoreen C.C. et al. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 2009;137(5):873–86. DOI: 10.1016/j.cell.2009.03.046. PMID: 19446321.
 20. Kaizuka T., Hara T., Oshiro N. et al. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem* 2010;285(26):20109–16. DOI: 10.1074/jbc.M110.121699. PMID: 20427287.
 21. LoRusso P.M. Mammalian target of rapamycin as a rational therapeutic target for breast cancer treatment. *Oncology* 2013;84(1):43–56. DOI: 10.1159/000343063. PMID: 23128843.
 22. Ma C.X., Crowder R.J., Ellis M.J. Importance of PI3-kinase pathway in response/resistance to aromatase inhibitors. *Steroids* 2011;76(8):750–2. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.02.023.
 23. Sheri A., Martin L.A., Johnston S. Targeting endocrine resistance: is there a role for mTOR inhibition? *Clin Breast Cancer* 2010;10(3):S79–85. DOI: 10.3816/CBC.2010.s.016.
 24. Frias M.A., Thoreen C.C., Jaffe J.D. et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 2006;16(18):1865–70. DOI: 10.1016/j.cub.2006.08.001. PMID: 16919458.
 25. Planchon S.M., Waite K.A., Charis E. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Biol* 2008;121(3):249–53. DOI: 10.1242/jcs.022459. PMID: 18216329.
 26. Vazquez F., Ramaswamy S., Nakamura N. et al. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Mol Cell Biol* 2000;20:5010–8. DOI: 10.1128/MCB.20.14.5010-5018.2000.
 27. Lemmon M.A., Schlessinger J., Ferguson K.M. The EGFR family: not so prototypical receptor tyrosine kinases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014;6(4):a020768. DOI: 10.1101/cshperspect.a020768. PMID: 24691965.
 28. Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 2003;284(1):2–13. DOI: 10.1016/s0014-4827(02)00105-2. PMID: 12648462.
 29. Fedele P., Calvani N., Marino A. et al. Targeted agents to reverse resistance to endocrine therapy in metastatic breast cancer: where are we now and where are we going? *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;84(2):243–51. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2012.03.004. PMID: 22494933.
 30. Massarweh S., Osborne C.K., Creighton C.J. et al. Tamoxifen resistance in breast tumors is driven by growth factor receptor signaling with repression of classic estrogen receptor genomic function. *Cancer Res* 2008;68(3):826–33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2707. PMID: 18245484.
 31. Gucalp A., Tolaney S., Isakoff S.J. et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013;19(9):5505–12. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3327. PMID: 23965901.
 32. Simoncini T., Hafezi-Moghadam A., Brazil D.P. et al. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 2000;407(6803):538–41. DOI: 10.1038/35035131. PMID: 11029009.
 33. Creighton C.J., Fu X., Hennessy B.T. et al. Proteomic and transcriptomic profiling reveals a link between the PI3K pathway and lower estrogen-receptor (ER) levels and activity in ER+ breast cancer. *Breast Cancer Res* 2010;12(3):R40. DOI: 10.1186/bcr2594.
 34. Shi W., Zhang X., Pintilie M. et al. Dysregulated PTEN–PKB and negative receptor status in human breast cancer. *Int J Cancer* 2003;104(2):195–203. DOI: 10.1002/ijc.10909. PMID: 12569575.
 35. Gustin J.P., Karakas B., Weiss M.B. et al. Knockin of mutant PIK3CA activates multiple oncogenic pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(8):2835–40. DOI: 10.1073/pnas.0813351106.
 36. Koboldt D.C., Fulton R.S., McLellan M.D. et al. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2012;490(7418):61–70. DOI: 10.1038/nature11412. PMID: 23000897.
 37. Maruyama N., Miyoshi Y., Taguchi T. et al. Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res* 2007;13(2):408–14. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0267.
 38. Sabine V.S., Crozier C., Brookes C.L. et al. Mutational analysis of PI3K/AKT signaling pathway in tamoxifen exemestane adjuvant multinational pathology study. *J Clin Oncol* 2014;32(27):2951–8. DOI: 10.1200/JCO.2013.53.8272. PMID: 25071141.
 39. Kalinsky K., Jacks L.M., Heguy A. et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2009;15(16):5049–59. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0632.
 40. Perez-Tenorio G., Alkhorri L., Olsson B. et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(12):577–84. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1609. PMID: 17575221.
 41. Pang B., Cheng S., Sun S.P. et al. Prognostic role of PIK3CA mutations and their association with hormone receptor expression in breast cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2014;4:6255. DOI: 10.1038/srep06255. PMID: 25176561.
 42. Badve S., Collins N.R., Bhat-Nakshatri P. et al. Subcellular localization of activated AKT in estrogen receptor and progesterone receptor-expressing breast cancers: potential clinical implications. *Am J Pathol* 2010;176(5):2139–49. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090477. PMID: 20228224.
 43. Beelen K., Opdam M., Severson T.M. et al. PIK3CA mutations, phosphatase and tensin homolog, human epidermal growth factor receptor 2, and insulin-like growth factor 1 receptor and adjuvant tamoxifen resistance in postmenopausal breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2014;16(1):R13. DOI: 10.1186/bcr3606. PMID: 24467828.
 44. Lazaridis G., Lambaki S., Karayannopoulou G. et al. Prognostic and predictive value of p-Akt, EGFR, and p-mTOR in early breast cancer. *Strahlenther Onkol* 2014;190(7):636–8. DOI: 10.1007/s00066-014-0620-6. PMID: 24658605.
 45. Kirkegaard T., Witton C.J., McGlynn L.M. et al. Akt activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *J Pathol* 2005;207(2):139–46. DOI: 10.1002/path.1829. PMID: 16088978.
 46. Дронова Т.А., Бабышкина Н.Н., Завьялова М.В. и др. Взаимосвязь компонентов EGFR/PI3K/AKT-сигнального пути с эффективностью терапии тамоксифеном у больных эстрогензависимым раком молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(3):40–50. DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-3-40-50. [Dronova T.A., Babyskhina N.N., Zavyalova M.V. et al. Relation of EGFR/PI3K/AKT signaling components with tamoxifen efficacy in patients with estrogen-dependent breast cancer. *Uspehi molekulyarnoi onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(3):40–50 (In Russ.)].

47. Capodanno A., Camerini A., Orlandini C. et al. Dysregulated PI3K/Akt/PTEN pathway is a marker of a short disease-free survival in node-negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 2009;40:1408–17. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.02.005.
48. Tanic N., Milovanovic Z., Tanic N. et al. The impact of PTEN tumor suppressor gene on acquiring resistance to tamoxifen treatment in breast cancer patients. *Cancer Biol Ther* 2012;13(12):1165–74. DOI: 10.4161/cbt.21346. PMID: 22892847.
49. Shoman N., Klassen S., McFadden A. et al. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. *Mod Pathol* 2005;18(2):250–9. DOI: 10.1038/modpathol.3800296. PMID: 15475931.
50. Stemke-Hale K., Gonzalez-Angulo A.M., Lluch A. et al. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. *Cancer Res* 2008;68(15):6084–91. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6854. PMID: 18676830.
51. Jeong Y., Bae S.Y., Daeun Y. et al. EGFR is a Therapeutic Target in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2019;53:805–19. DOI: 10.33594/000000174. PMID: 31670920.
52. Detre S.I., Ashley S., Mohammed K. et al. Immunohistochemical phenotype of breast cancer during 25-year follow-up of the royal marsden tamoxifen prevention trial. *Cancer Prev Res (Phila)* 2017;10(3):171–6. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-16-0247-T. PMID: 28100469.
53. Bae S.Y., Nam S.J., Lee S.K. et al. Tamoxifen resistance: EGFR expression in hormone receptor-positive and HER2 negative breast cancer. In: *Proceedings of the 2016 San Antonio Breast Cancer Symposium*. *Cancer Res* 2017;77(4):P6–09–36. DOI: 10.1158/1538-7445.SABCS16-P6-09-36.
54. Babyshkina N., Vtorushin S., Zavyalova M. et al. The distribution pattern of ER α expression, ESR1 genetic variation and expression of growth factor receptors: association with breast cancer prognosis in Russian patients treated with adjuvant tamoxifen. *Clin Exp Med* 2017;17(3):383–93. DOI: 10.1007/s10238-016-0428-z. PMID: 27225751.
55. Robinson D.R., Wu Y.M., Vats P. et al. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer. *Nat Genet* 2013;45(12):1446–51. DOI: 10.1038/ng.2823. PMID: 24185510.
56. Alluri P.G., Speers C., Chinnaiyan A.M. Estrogen receptor mutations and their role in breast cancer progression. *Breast Cancer Res* 2014;16(6):494. DOI: 10.1186/s13058-014-0494-7. PMID: 25928204.
57. Toy W., Shen Y., Won H. et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet* 2013;45(12):439–45. DOI: 10.1038/ng.2822. PMID: 24185512.
58. Fanning S.W., Mayne C.G., Dharmarajan V. et al. Estrogen receptor alpha somatic mutations Y537S and D538G confer breast cancer endocrine resistance by stabilizing the activating function-2 binding conformation. *Elife* 2016;5:e12792. DOI: 10.7554/eLife.12792. PMID: 26836308.
59. Madeira K.P., Daltoe R.D., Sirtoli G.M. et al. Estrogen receptor alpha (ERS1) SNPs c454-397T>C (PvuII) and c454-351A>G (XbaI) are risk biomarkers for breast cancer development. *Mol Biol Rep* 2014;41(8):5459–66. DOI: 10.1007/s11033-014-3419-8. PMID: 24928087.
60. Babyshkina N., Vtorushin S., Dronova T. et al. Impact of estrogen receptor α on the tamoxifen response and prognosis in luminal-A-like and luminal-B-like breast cancer. *Clin Exp Med* 2019;19(4):547–56. DOI: 10.1007/s10238-019-00583-6. PMID: 31562548.

Благодарности. Авторы признательны за поддержку этой работы Программе повышения конкурентоспособности Национального исследовательского Томского государственного университета.

Acknowledgement. The authors acknowledge support of this work by the National Research Tomsk State University Competitiveness Improvement Program.

Вклад авторов

Т.А. Дронова, Н.Н. Бабышкина: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Н.В. Матвиенко: обзор публикаций по теме статьи;

Е.М. Слонимская, Н.В. Чердынцева: разработка дизайна исследования.

Authors contribution

T.A. Dronova, N.N. Babyshkina: reviewing of publications of the article's theme, article writing;

N.V. Matvienko: reviewing of publications of the article's theme;

E.M. Slonimskaya, N.V. Cherdynitseva: developing the research design.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.А. Дронова / T.A. Dronova: <https://orcid.org/0000-0003-3009-2404>

Н.Н. Бабышкина / N.N. Babyshkina: <https://orcid.org/0000-0002-0562-3878>

Е.М. Слонимская / E.M. Slonimskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4382-5697>

Н.В. Чердынцева / N.V. Cherdynitseva: <https://orcid.org/0000-0003-1526-9013>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 22.10.2020. **Принята к публикации:** 26.01.2021.

Article submitted: 22.10.2020. **Accepted for publication:** 26.01.2021.

Актуальность дальнейших клинических исследований применения мелатонина в адъювантной онкотерапии

Е.П. Смородин

Департамент вирусологии и иммунологии, Национальный институт развития здоровья; Эстония, 11619 Таллинн, Хийу, 42

Контакты: Евгений Павлович Смородин jevgeni.smorodin@outlook.com

Обзор составлен на основании поиска в PubMed, Web of Science, Scopus и Google, который показал недостаток информации по клиническим исследованиям применения мелатонина (М) в онкологии, несмотря на многочисленные и многообещающие результаты экспериментов. В предварительных клинических исследованиях, выполненных группой P. Lissony, отмечается терапевтический потенциал М в качестве вспомогательного средства при химио-, лучевой терапии и иммунотерапии опухолей различной локализации. М смягчает токсическое действие стандартной терапии и, по наблюдениям авторов, повышает ее эффективность. Экзогенный М может быть востребован в качестве синхронизатора циркадного ритма для реабилитации и улучшения качества жизни больных, так как уменьшает дистресс и улучшает сон, а также в поддерживающей и паллиативной терапии. Онкостатическая активность М связана с влиянием: а) на гомеостаз и циркадные ритмы, б) воспаление, кооперацию иммунцитов и продукцию цитокинов в микроокружении опухоли, в) экспрессию генов и сигнальные пути, связанные с ангиогенезом, пролиферацией и метастазированием, г) метаболизм, гипоксию и оксидативный стресс, д) апоптоз и резистентность к химио- и лучевой терапии. Обзор содержит следующие разделы: физиологические и фармакологические исследования, эпидемиологические исследования, клинические исследования, иммунорегуляторная роль М, экспериментальные исследования. В настоящее время востребованы рандомизированные и длительные клинические исследования гомогенных групп больных со II–III стадиями рака для статистической обработки информации по влиянию М на побочное действие стандартной терапии, динамику болезни, клинические параметры, а также на качество и продолжительность жизни после основного лечения.

Ключевые слова: мелатонин, адъювантная терапия рака

Для цитирования: Смородин Е.П. Актуальность дальнейших клинических исследований применения мелатонина в адъювантной онкотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):24–32.

Relevance of further clinical trials of the use of melatonin in adjuvant cancer therapy

Eugeniy P. Smorodin

Department of Virology & Immunology, National Institute for Health Development; 42 Hiiu, Tallinn 11619, Estonia

Contacts: Eugeniy Pavlovich Smorodin jevgeni.smorodin@outlook.com

The review was compiled from a PubMed, Web of Science, Scopus and Google search, which showed a lack of information on clinical studies of melatonin (M) in oncology, despite numerous and promising experimental results. In preliminary clinical studies carried out by P. Lissony and his co-authors, the therapeutic potential of M as an adjuvant in chemotherapy, radiation therapy and immunotherapy at different tumor localizations is noted. M alleviates the toxic effect of standard therapy and, according to the authors' observations, increases its effectiveness. Exogenous M can be in demand as a circadian rhythm synchronizer for rehabilitation and improvement of the quality of life of patients, because reduces distress and improves sleep, and in supportive and palliative therapy. Oncostatic activity of M is associated with the effect on: a) homeostasis and circadian rhythms, b) inflammation, cooperation of immunocytes and cytokine production in the tumor microenvironment, c) gene expression and signalling pathways associated with angiogenesis, proliferation and metastasis, d) metabolism, hypoxia and oxidative stress, e) apoptosis and resistance to chemotherapy and radiation therapy.

The review contains the following sections: physiological and pharmacological studies, epidemiological studies, clinical studies, the immunoregulatory role of melatonin, experimental studies. Currently, randomized and long-term clinical studies of homogeneous groups of patients with tumor stages II–III are in demand for statistical processing of information of the M influence on the side effects of standard therapy, on the dynamics of the disease, clinical parameters, as well as on the quality and duration of life after the main treatment.

Key words: melatonin, adjuvant cancer therapy

For citation: Smorodin E.P. Relevance of further clinical trials of the use of melatonin in adjuvant cancer therapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):24–32. (In Russ.).

Введение

В последние два десятилетия отмечается неуклонный рост публикаций, посвященных мелатонину (М). Многим он известен как гормон эпифиза, регулирующий циркадный ритм смены дня и ночи. Как универсальный синхронизатор биологических ритмов, М регулирует многие жизненно важные процессы в организме и продуцируется во всех органах и тканях. При старении выработка М уменьшается, и его рекомендуют принимать при нарушениях сна и циркадного ритма. Кроме оригинальных статей с рекомендациями использования М для профилактики заболеваний, связанных со старением, имеется множество обзоров (включая метаанализы). Критический многосторонний анализ обзоров на тему «Мелатонин и здоровье» представлен в статье P.P. Posadzki и соавт. [1]. Поиск в PubMed, Web of Science, Scopus и Google показал недостаток информации на тему клинического исследования М как адъюванта в терапии опухолей с преобладанием старых публикаций, тогда как количество публикаций о влиянии М на опухолевые клетки и на опухоли у животных «зашкаливает» и продолжает неуклонно расти. В некоторых современных обзорах приведены оптимистические экспериментальные данные, накопленные за многие годы, и отмечается их неадекватность клиническим исследованиям [2].

Физиологические и фармакологические исследования

Физиологические концентрации М в сыворотке крови, измеренные в ночное время суток у пожилых людей, составляют 0,10–0,51 нМ. При употреблении М в фармакологических дозах 0,4 и 4 мг его уровень возрастает до 1,75 и 17,24 нМ соответственно. Уровень М в тканях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) превышает таковой в крови в 10–100 раз [3, 4]. Экзогенный М безопасен и нетоксичен при кратковременном использовании в больших дозах, например при внутривенном введении в дозе 100 мг [5, 6]. Побочные действия, ограничения и противопоказания М описаны в медицинских справочниках. В целом М считается безопасным и хорошо переносимым при суточных дозах 0,15–12 мг, основным побочным действием

является дневная сонливость [7]. При пероральном введении его биодоступность варьирует от 9 до 33 % и составляет приблизительно 15 %. М проникает через слизистые оболочки носа и рта, при этом способе введения его биодоступность значительно возрастает [8, 9].

Эпидемиологические исследования

Как известно, эпифиз вырабатывает М ночью, а свет тормозит продукцию М. Световое загрязнение и циркадные нарушения, связанные с работой или стилем жизни, могут быть одной из причин увеличения риска онкологических заболеваний [10, 11]. Исследования, показывающие связь низкого уровня М в сыворотке крови с риском развития рака, по большей части проводились для гормонозависимых опухолей. Так, было показано, что женщины с низким уровнем М ($\leq 0,17$ нМ), а также имеющие полиморфизм гена, кодирующего рецептор МТ₂, подвержены высокому риску развития рака молочной железы. Однако связь уровня М-метаболита (6-сульфатоксимелатонин) в моче и риска развития рака не подтвердилась. У мужчин низкий уровень М-метаболита в моче связан с повышенным риском рака предстательной железы. Эпидемиологические исследования нуждаются в унификации в связи с циркадным изменением уровня М [12]. Онкологические больные испытывают дистресс и нарушение циркадных ритмов, что способствует опухолевой прогрессии через механизмы нейроиммунорегуляции. Системное влияние дистресса на организм вызывает истощение его ресурсов и иммуносупрессию. М регулирует широкий спектр физиологических функций и противодействует стрессу, связанному с нарушением циркадных ритмов и изменением гормонального фона. Десинхронизация циркадных ритмов и нарушение сна негативно отражаются на суточных колебаниях уровня М. Уровень М в сыворотке крови значительно коррелировал с самооценкой качества сна и психометрическими профилями депрессии у пациентов с раком молочной железы [13]. У пациентов с раком полости рта значительно снижен уровень М в сыворотке крови, и это имеет прогностическое значение [14].

Клинические исследования

В литературе приведены результаты исследований, в основном при участии группы соавторов P. Lissoni, которые были выполнены на небольших группах пациентов с различной локализацией опухолей: немелкоклеточный рак легкого (НМКРЛ), рак ЖКТ, почки, предстательной железы, молочной железы, яичника, меланома и глиобластома. Их первые работы были опубликованы еще в 90-е годы прошлого века. В испытании принимали участие пациенты с метастатическими опухолями. Так, М совместно с химиотерапией (ХТ) был испытан на 370 пациентах с НМКРЛ и опухолями ЖКТ. Двух- и 5-летняя выживаемость пациентов достоверно увеличивалась по сравнению с ХТ без М [15, 16]. В опубликованных работах пациенты принимали М перорально в суточных дозах 10–40 мг, а в последних исследованиях – в дозе 100 мг, которая, по мнению авторов, является более эффективной [17]. Таким образом, вопрос об оптимальных дозах М остается открытым. Пероральный способ введения М не является оптимальным, так как имеет низкую биодоступность и индивидуальную вариабельность (см. выше о физиологических и фармакологических исследованиях).

Результаты предварительных и фрагментированных исследований, выполненных группой соавторов P. Lissoni, заслуживают всестороннего внимания. У авторов было мало последователей, которые могли бы подтвердить или опровергнуть их результаты своими публикациями. Так, в пилотном исследовании В. Negi и соавт. (гетерогенная группа из 31 пациента с прогрессирующими и устойчивыми к терапии солидными опухолями различной локализации) после назначения М отмечается стабилизация заболевания у 39 % испытуемых, улучшение общего самочувствия пациентов и снижение уровня циркулирующего интерлейкина-6 [18]. В других исследованиях отмечено, что М не оказывал положительного действия в группе пациентов с солидными опухолями и метастазами в мозг, получавших лучевую терапию (ЛТ) мозга. Распределение выживаемости не отличалось от такового исторического контроля пациентов. Медианы выживаемости были в пределах 2,8–4,1 мес [19]. А. Sookprasert и соавт. не подтвердили влияние М на выживаемость и частоту побочных эффектов у пациентов с распространенной формой НМКРЛ, получающих ХТ, хотя и наблюдали лучшие показатели качества жизни в группе, получавшей М. Авторы отмечают, что необходимы исследования на ранних стадиях рака и в течение более длительного периода времени с большим размером выборки, так как в их исследовании принимали участие пациенты с потенциально плохим прогнозом с медианой выживаемости 7,3 мес [20]. Результаты других испытаний (NCT01557478, NCT02454855) пока не опубликованы.

Подробнее о клинических исследованиях можно прочитать в обзорных метаанализах [21, 22]. Одной из причин противоречивых результатов исследований может быть значительная вариабельность биодоступности М при пероральном способе его применения, которая может быть еще более увеличенной у пациентов. Пероральное введение М через слизистую оболочку потенциально может быть клинически более значимым путем введения, если требуется системный эффект [8, 9]. В приведенных исследованиях пациенты принимали М вечером или в темное время суток, чтобы не нарушился циркадный ритм. Время суток также может иметь значение для проявления онкостатической активности М [19], особенно если исследуется комбинация с ХТ. Другие причины расхождений: гетерогенность исследований, краткосрочные наблюдения, обусловленные терминальными стадиями рака, и небольшие выборки.

Исследователи группы P. Lissoni рассматривают онкостатический эффект М с точки зрения влияния на иммунный статус пациентов через психонейроэндокринную регуляцию цитокинов и иммунокомпетентных клеток [23, 24]. Так, М, введенный совместно с интерлейкином-2, улучшает терапевтический эффект последнего, увеличивая количество лимфоцитов и эозинофилов. Эта комбинация увеличивает продолжительность жизни пациентов с устойчивыми к терапии метастатическими опухолями [25–28]. Кроме того, исследователи отмечают, что стандартная ХТ опухолей совместно с М вызывает регрессию опухолей в большей мере, чем без него [15, 16, 29]. М мог бы быть востребован как адъювант при ХТ, так как, по некоторым данным, он уменьшает частоту нейротоксичности, астении, тромбоцитопении, лимфоцитопении и других побочных эффектов; для реабилитации после ХТ и ЛТ, а также в поддерживающем и паллиативном лечении [21, 22, 30, 31]. Согласно результатам других авторов, М не уменьшал частоту нейтропении и инфекций и не влиял на уровень гемоглобина и количество тромбоцитов у пациентов с В-клеточной лимфомой, получающих ХТ [32]. Исследование на 20 пациентах с неоперабельным раком легкого, получающих ХТ, показало, что М в дозе 40 мг/сут в течение 21 дня не защищает от нейтропении и тромбоцитопении. К сожалению, в работе не представлены другие гематологические показатели [33]. Следует отметить, что позитивное влияние М на выживаемость пациентов при совместном использовании с ХТ требует более убедительных доказательств при длительных рандомизированных исследованиях более гомогенных групп и с большим числом испытуемых. В большинстве работ, выполненных группой P. Lissoni, оценивалась 1-летняя выживаемость, а испытания М на пациентах с более ранними стадиями рака не проводились.

Предварительные исследования показывают, что М снижает частоту побочных эффектов и осложнений ХТ и ЛТ. Так, у пациентов, получавших М во время ХТ таксанами, снижалась частота нейропатии [34]. При лучшей переносимости в комбинации с М могли бы быть назначены более эффективные дозы либо непрерывные и пролонгированные курсы терапии [29, 31, 35]. В этом отношении М рассматривается как альтернатива (или дополнение) кортикостероидам или опиоидам, которые, в отличие от М, оказывают иммуносупрессивное действие. Кроме того, М может быть альтернативой бензодиазепиновому анксиолитику алпразоламу при хирургических процедурах [36]. М также может быть востребован в качестве вспомогательной терапии, улучшающей качество жизни больных, так как бессонница, тревожность, беспокойство, депрессия, боль и другие симптомы сопутствуют онкологическим заболеваниям [37–39].

Мелатонин деацетируется в эпифизе, образуя 5-метокситриптамин (5-МТ). 5-МТ известен как радиозащитный фармпрепарат под названием мексамин. Совместно испытанные в клинике М и 5-МТ эффективнее задерживали прогрессию рака, чем М [40, 41]. Более того, как М, так и 5-МТ, значительно снижали связанные с ХТ токсические эффекты, а именно тромбоцитопению и нейротоксичность. Предполагается, что 5-МТ также может быть эффективным в сочетании с ХТ [42]. Совместно М (100 мг/сут), 5-МТ и пинолин были испытаны на 212 пациентах в качестве паллиативной терапии. Стабилизация болезни была достигнута у 45 % пациентов с объективной регрессией опухоли у 8 %. Одно- и 5-летняя выживаемость была достигнута у 46 и 11 % пациентов соответственно. Это предварительное исследование показывает, что эндокринная заместительная терапия гормонами эпифиза может представлять собой новую нетоксичную и недорогую терапию, улучшающую выживаемость и качество жизни пациентов [43].

Иммунорегуляторная роль мелатонина

Иммунокомпетентные клетки продуцируют М и экспрессируют его рецепторы, а сам М влияет на их кооперацию и продукцию цитокинов [44]. М может стимулировать иммунную систему или оказывать противовоспалительное действие в зависимости от условий [45, 46]. М участвует в активации и дифференцировке Т-клеток, таких как хелперы Th17, регуляторные Tregs и Т-клетки памяти. Влияние М на Т-клетки опосредовано через мембранные и ядерные рецепторы, а также через рецепторнезависимые пути [47]. М мало влияет на Treg-клетки в нормальных условиях, но снижает их количество при иммуносупрессии. М стимулирует функциональную активность эффекторных Т-клеток в иммуносупрессивных состояниях, но подавляет их активность при обострении иммунных ответов, усиливая ответы Treg-клеток [47].

Известно, что иммунный статус в опухолевом микроокружении влияет на дальнейшее развитие опухоли. Так, инфильтрация опухоли Т-клетками (Th1, цитотоксические CD8 и CD4, Т-клетки памяти) связана с благоприятным прогнозом, тогда как инфильтрацию клетками Th17 и Tregs связывают как с хорошим, так и с плохим прогнозом [48–50]. Онкостатический эффект М может быть опосредован активацией и дифференцировкой Т-клеток, а также ослаблением активности Tregs и опухолеассоциированных фибробластов. М может косвенно снижать продукцию Tregs при иммуносупрессии и воспалении, например ингибируя функцию макрофагов или другими путями [10, 24, 47, 51]. Регулирование статуса иммуносупрессии в опухолевом микроокружении М может быть также опосредовано через экзосомы опухолевого происхождения. Экзосомы увеличивают экспрессию на макрофагах лиганда запрограммированной смерти 1 (PD-L1) и продукцию воспалительных цитокинов, тогда как экзосомы, обработанные М, оказывают противоположное действие [52].

В зависимости от условий М может как усиливать, так и ослаблять воспаление, влияя на продукцию цитокинов макрофагами [46]. Как показывают предварительные клинические исследования, М увеличивает количество лимфоцитов и уменьшает количество моноцитов в крови, т.е. увеличивает прогностически значимое в онкологии отношение лимфоциты/моноциты. Это позитивное влияние может усиливать терапевтический потенциал при иммунотерапии опухолей [53, 54].

Таким образом, онкостатический эффект экзогенного М может быть обусловлен поддержанием гомеостаза иммунной системы и его влиянием на дисбаланс иммунокомпетентных клеток и продукцию цитокинов в опухолевом микроокружении, что препятствует условиям избегания иммунного надзора.

Экспериментальные исследования

Как известно, динамика опухолевой прогрессии связана с мутациями, геномной нестабильностью и нарушением регуляции сигнальных путей и метаболизма, а также с адаптацией к условиям оксидативного и метаболического стресса, гипоксии, ацидоза и энергетического дефицита. Высокая гетерогенность популяций, пластичность, способность к самообновлению и многочисленные механизмы адаптации помогают опухолевым клеткам избегать иммунного надзора, становиться резистентными к ХТ, ЛТ и апоптозу, а также распространяться по организму, создавая метастатические ниши. М способен тормозить рост опухолей, влияя на жизнеспособность опухолевых клеток. Онкостатическое действие М на различные опухолевые клетки при фармакологически приемлемых для человека концентрациях (1–100 нМ) является показателем его высокой активности *in vitro*,

но в экспериментах на животных вводимые дозы М в основном превышали приемлемые дозы [1, 2, 12]. Например, приемлемые для человека дозы М исследовали на мышах с трансгенной аденокарциномой предстательной железы. М понижал уровень маркеров пролиферации, подавлял рост и значительно увеличивал процент клеток умеренно и высокодифференцированной карциномы, уменьшая процент клеток низкодифференцированной карциномы [55]. М в наномолярных концентрациях ингибировал ангиогенез и замедлял рост ксенотрансплантата раковых клеток предстательной железы человека [56].

Исследования *in vitro* и *in vivo* показывают, что М ингибирует пролиферацию, ангиогенез и метастазирование разных видов опухолевых клеток человека и усиливает их апоптоз, влияя на сигнальные пути. В опухолях при гипоксии М ингибирует ангиогенез, тогда как при физиологических процессах и неопухолевых заболеваниях, например при язве желудка, М способствует ангиогенезу. Влияние М на неоваскуляризацию в основном связано с регуляцией фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) и его рецепторов [2, 57, 58]. Среди молекулярных механизмов, посредством которых М препятствует метастазированию, рассматривается его влияние на модуляцию межклеточного и клеточно-матриксного взаимодействия, ремоделирование внеклеточного матрикса матриксными металлопротеиназами, реорганизацию цитоскелета, эпителиально-мезенхимальный переход (epithelial-mesenchymal transition) и ангиогенез [57]. Ингибирование миграции, инвазивности и метастазирования отмечено также по его влиянию на экспрессию молекул клеточной адгезии и протеинкиназ [2, 59].

В некоторых работах отмечается онкостатический эффект М и его способность сохранять гомеостаз в нормальных клетках. Например, в исследованиях на различных клеточных линиях рака предстательной железы показано подавление пролиферации опухолевых клеток путем ингибирования SIRT1 (NAD-зависимая гистондеацетилаза) без влияния на нормальные клетки [55]. Интересно, что при хроническом воздействии на клетки рака предстательной железы низких концентраций М (10–100 nM) также наблюдался антипролиферативный эффект. В присутствии М в раковых клетках, в том числе и в резистентных к терапии, запускается программа апоптоза, при этом повышается их чувствительность к ХТ и ЛТ [2, 12]. Однако М может защищать нормальные клетки от апоптоза, например нейроны, Т-клетки и кардиомиоциты [1, 45, 59, 60]. М способен защищать нормальные клетки от токсического действия ХТ и ЛТ [2, 60]. Так, из результатов метаанализов следует, что М защищает от вызванной ХТ нефротоксичности и кардиотоксичности [61, 62]. Вместе с тем в некоторых исследованиях отмечается

повышенная эффективность противоопухолевых препаратов и ЛТ при их комбинации с М [63, 64].

Мелатонин ингибирует экспрессию генов и сигнальные пути, активирующие возникновение раковых стволовых клеток, способствуя их апоптозу и дифференцировке [65, 66]. Однако для мезенхимальных стволовых клеток он является защитным агентом, снижающим их гибель в условиях оксидативного стресса. М может стимулировать их пролиферацию, самообновление, а также высвобождение и экспрессию митогенных и ростовых факторов, например экспрессию VEGF. Кроме того, М влияет на дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток. Он стимулирует остеогенез, нейрогенез и ангиогенез, уменьшая апоптоз в условиях ишемии, но ингибирует адипогенез [67].

Как известно, в условиях оксидативного стресса отмечается повышенная пролиферация раковых клеток и уклонение от апоптоза. М противодействует оксидативному стрессу посредством разных механизмов, индуцируя активность антиоксидантных ферментов [59, 68]. Благодаря этим механизмам, М предотвращает генотоксическое и канцерогенное действие оксидативного стресса и поддерживает функцию и выживание нормальных клеток.

Одним из механизмов онкостатического эффекта М может быть его регуляторное влияние на часовые гены циркадного молекулярного осциллятора. Некоторые часовые гены описаны как опухолевые супрессоры. Дисбаланс в экспрессии часовых генов и десинхронизация ритмов связаны с возникновением и прогрессией опухолей, а также с негативным прогнозом больных раком. Этот малоизученный механизм регуляции поможет интерпретировать различное влияние М на функционирование нормальных и опухолевых клеток [69–71].

Заключение

Как известно, комбинированная онкотерапия с многоцелевым действием, по сравнению с монотерапией, имеет явные преимущества и большие перспективы. Некоторые фармпрепараты и их комбинации, перенацеленные на онкотерапию, действуют через эпигенетические механизмы на разные сигнальные и метаболические пути раковых клеток, вызывая состояние покоя, дифференцировку или коммуникативное перепрограммирование (anakoinesis) [72]. В результате в опухолевом микроокружении может быть изменен гомеостатический дисбаланс, способствующий развитию опухоли, и тем самым приостановлено ее развитие. М участвует во многих жизненно важных клеточных функциях и влияет на эпигенетические механизмы, экспрессию генов и сигнальные пути, связанные с возникновением и прогрессией опухолей, и рассматривается как один из модуляторов транскрипции,

способных влиять на опухолевый гомеостаз [73, 74]. Совместно с другими препаратами природного происхождения, нацеленными на опухолевые мишени, М имеет высокую комплементарность [75].

Суммируя вышеизложенное, можно охарактеризовать актуальность дальнейших клинических исследований М в качестве вспомогательного средства для онкотерапии на основании опубликованных результатов:

- Стимулирование защитной функции организма при побочном токсическом действии ХТ и повреждающем действии ЛТ (клинические испытания, *in vivo*).
- Противовоспалительное действие, регуляторное влияние на иммунную систему и использование М в комбинации с иммунотерапией (клинические испытания, *in vivo*).
- Позитивное влияние на психоэмоциональное состояние пациентов, улучшение сна и качества жизни, нормализация циркадного ритма (клинические испытания).
- Усиление эффекта ХТ и ЛТ, повышение чувствительности к терапии резистентных опухолевых клеток (*in vitro*, *in vivo*).
- Влияние М на гематологические и биохимические параметры, включая уровень опухолевых маркеров (клинические испытания).

Таким образом, благодаря многофакторному положительному влиянию на организм и отсутствию токсичности, М заслуживает дальнейших клинических испытаний в качестве адъюванта. М увеличивал продолжительность жизни и ее качество в предварительных исследованиях на относительно небольших группах пациентов с терминальными стадиями (фазы испытаний I–II).

Остается неизученным прогностическое влияние М в более гомогенных группах со стадиями рака II–III, а также при его длительном употреблении после основного лечения в индивидуально подобранных повышенных дозах. М мог бы назначаться пациентам при нарушении сна с последующей регистрацией возможного эффекта на динамику заболевания. Некоторые пациенты, принимающие безрецептурный М самостоятельно для улучшения засыпания, также могут соответствовать критериям включения в исследования. Автор этих строк охотно примет участие как в описании индивидуальных клинических наблюдений, так и в создании выборок для статистического анализа влияния М на клинические параметры и выживаемость. Автор планирует в будущем опубликовать клинический случай длительного постоперационного использования М с описанием его влияния на клинические параметры и качество жизни пациента.

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

1. Posadzki P.P., Bajpai R., Kyaw B.M. et al. Melatonin and health: an umbrella review of health outcomes and biological mechanisms of action. *BMC Med* 2018;16(1):18. DOI: 10.1186/s12916-017-1000-8. PMID: 29397794.
2. Reiter R.J., Rosales-Corral S.A., Tan D.X. et al. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* 2017;18(4):843. DOI: 10.3390/ijms18040843. PMID: 28420185.
3. Gooneratne N.S., Edwards A.Y., Zhou C. et al. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults. *J Pineal Res* 2012;52(4):437–45. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2011.00958.x. PMID: 22348451.
4. Esteban-Zubero E., López-Pingarrón L., Alatorre-Jiménez M.A. et al. Melatonin's role as a co-adjutant treatment in colonic diseases. *Life Sci* 2017;170:72–81. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.11.031. PMID: 27919824.
5. Andersen L.P., Gögenur I., Rosenberg J. The Safety of Melatonin in Humans. *Clin Drug Investig* 2016;36(3):169–75. DOI: 10.1007/s40261-015-0368-5. PMID: 26692007.
6. Andersen L.P., Werner M.U., Rosenkilde M.M. et al. Pharmacokinetics of high-dose intravenous melatonin in humans. *J Clin Pharmacol* 2016;56(3):324–9. DOI: 10.1002/jcph.592. PMID: 26184078.
7. Besag F.M.C., Vasey M.J., Lao K.S.J. et al. Adverse Events Associated with Melatonin for the Treatment of Primary or Secondary Sleep Disorders: A Systematic Review. *CNS Drugs* 2019;33:1167–86. DOI: 10.1007/s40263-019-00680-w. PMID: 31722088.
8. Harpsøe N.G., Andersen L.P., Gögenur I. et al. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol* 2015;71(8):901–9. DOI: 10.1007/s00228-015-1873-4. PMID: 26008214.
9. Zetner D., Andersen L.P., Rosenberg J. Pharmacokinetics of alternative administration routes of melatonin: a systematic review. *Drug Res (Stuttg)* 2016;66(4):169–73. DOI: 10.1055/s-0035-1565083. PMID: 26514093.
10. Giudice A., Crispo A., Grimaldi M. et al. The Effect of Light Exposure at Night (LAN) on Carcinogenesis via Decreased Nocturnal Melatonin Synthesis. *Molecules* 2018;23(6):1308. DOI: 10.3390/molecules23061308. PMID: 29844288.
11. Liu W., Zhou Z., Dong D. et al. Sex Differences in the Association between Night Shift Work and the Risk of Cancers: A Meta-Analysis of 57 Articles. *Dis Markers* 2018;2018:7925219. DOI: 10.1155/2018/7925219. PMID: 30598709.
12. Li Y., Li S., Zhou Y. et al. Melatonin for the prevention and treatment of cancer. *Oncotarget* 2017;8(24):39896–921. DOI: 10.18632/oncotarget.16379. PMID: 28415828.
13. Zaki N.F., Sabri Y.M., Farouk O. et al. Depressive Symptoms, Sleep Profiles and Serum Melatonin Levels in a Sample of Breast Cancer Patients. *Nat Sci Sleep* 2020;12:135–49. DOI: 10.2147/NSS.S206768. PMID: 32104121.
14. Stanciu A.E., Zamfir-Chiru-Anton A., Stanciu M.M. et al. Clinical significance of serum melatonin in predicting the severity of oral squamous cell carcinoma.

- Oncol Lett 2020;19(2):1537–43.
DOI: 10.3892/ol.2019.11215.
PMID: 31966079.
15. Lissoni P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms. *Pathol Biol (Paris)* 2007;55(3–4):201–4. DOI: 10.1016/j.patbio.2006.12.025. PMID: 17446010.
 16. Lissoni P., Chillelli M., Villa S. et al. Five years survival in metastatic non-small cell lung cancer patients treated with chemotherapy alone or chemotherapy and melatonin: a randomized trial. *J Pineal Res* 2003;35(1):12–5. DOI: 10.1034/j.1600-079x.2003.00032.x. PMID: 12823608.
 17. Lissoni P., Messina G., Lissoni A. et al. The psychoneuroendocrine-immunotherapy of cancer: Historical evolution and clinical results. *J Res Med Sci* 2017;22:45. DOI: 10.4103/jrms.JRMS_255_16. PMID: 28567065.
 18. Neri B., de Leonardi V., Gemelli M.T. et al. Melatonin as biological response modifier in cancer patients. *Anticancer Res* 1998;18(2B):1329–32. PMID: 9615811.
 19. Berk L., Berkey B., Rich T. et al. Randomized phase II trial of high-dose melatonin and radiation therapy for RPA class 2 patients with brain metastases (RTOG 0119). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68(3):852–7. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2007.01.012. PMID: 17418968.
 20. Sookprasert A., Johns N.P., Phunmanee A. et al. Melatonin in patients with cancer receiving chemotherapy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Anticancer Res* 2014;34(12):7327–37. PMID: 25503168.
 21. Seely D., Wu P., Fritz H. et al. Melatonin as adjuvant cancer care with and without chemotherapy: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Integr Cancer Ther* 2012;11(4):293–303. DOI: 10.1177/1534735411425484. PMID: 22019490.
 22. Wang Y., Wang P., Zheng X., Du X. Therapeutic strategies of melatonin in cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Oncotargets Ther* 2018;11:7895–908. DOI: 10.2147/OTT.S174100. PMID: 30510430.
 23. Lissoni P. A reinterpretation of the pathogenesis and cure of cancer according to the psychoneuroimmunological discoveries. *Methods Mol Biol* 2012;934:183–92. DOI: 10.1007/978-1-62703-071-7_10. PMID: 22933147.
 24. Vigoré L., Messina G., Brivio F. et al. Psychoneuroendocrine modulation of regulatory T lymphocyte system: in vivo and in vitro effects of the pineal immunomodulating hormone melatonin. *In Vivo* 2010;24(5):787–9. PMID: 20952751.
 25. Lissoni P., Barni S., Tancini G. et al. A randomised study with subcutaneous low-dose interleukin 2 alone vs interleukin 2 plus the pineal neurohormone melatonin in advanced solid neoplasms other than renal cancer and melanoma. *Br J Cancer* 1994;69(1):196–9. DOI: 10.1038/bjc.1994.34. PMID: 8286206.
 26. Lissoni P., Rovelli F., Porro G. et al. Treatment of Advanced Cancer related Lymphocytopenia: Comparison among the Effects of Subcutaneous Low-dose Interleukin-2, High-dose Pineal Hormone Melatonin and Checkpoint Inhibitors. *J Cancer Res Oncobiol* 2018;1(3):112. DOI: 10.31021/jc.ro.20181112.
 27. Lissoni P. Modulation of anticancer cytokines IL-2 and IL-12 by melatonin and the other pineal indoles 5-methoxytryptamine and 5-methoxytryptophol in the treatment of human neoplasms. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:560–7. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05421.x. PMID: 11268384.
 28. Lissoni P., Brivio F., Fumagalli L. et al. Neuroimmunomodulation in medical oncology: application of psychoneuroimmunology with subcutaneous low-dose IL-2 and the pineal hormone melatonin in patients with untreatable metastatic solid tumors. *Anticancer Res* 2008;28(2B):1377–81. PMID: 18505083.
 29. Cerea G., Vaghi M., Ardizzoia A. et al. Biomodulation of cancer chemotherapy for metastatic colorectal cancer: a randomized study of weekly low-dose irinotecan alone versus irinotecan plus the oncostatic pineal hormone melatonin in metastatic colorectal cancer patients progressing on 5-fluorouracil-containing combinations. *Anticancer Res* 2003;23(2C):1951–4. PMID: 12820485.
 30. Lissoni P., Barni S., Mandalà M. et al. Decreased toxicity and increased efficacy of cancer chemotherapy using the pineal hormone melatonin in metastatic solid tumour patients with poor clinical status. *Eur J Cancer* 1999;35(12):1688–92. DOI: 10.1016/s0959-8049(99)00159-8. PMID: 10674014.
 31. Lissoni P. Is there a role for melatonin in supportive care? *Support Care Cancer* 2002;10(2):110–6. DOI: 10.1007/s005200100281. PMID: 11862501.
 32. Sarma A., Rodriguez M.A., Cabanillas F. et al. A randomized trial of CHOP chemotherapy with or without melatonin in patients with favourable prognosis large B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2004;22(14):8066. DOI: 10.1200/jco.2004.22.90140.8066.
 33. Ghielmini M., Pagani O., de Jong J. et al. Double-blind randomized study on the myeloprotective effect of melatonin in combination with carboplatin and etoposide in advanced lung cancer. *Br J Cancer* 1999;80(7):1058–61. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690463. PMID: 10362116.
 34. Nahleh Z., Pruemmer J., Lafollette J., Sweany S. Melatonin, a promising role in taxane-related neuropathy. *Clin Med Insights Oncol* 2010;4:35–41. DOI: 10.4137/cmo.s4132. PMID: 20567633.
 35. Onsen K., Johns N.P., Khuayjarepanishk T. et al. Beneficial Effects of Adjuvant Melatonin in Minimizing Oral Mucositis Complications in Head and Neck Cancer Patients Receiving Concurrent Chemoradiation. *J Altern Complement Med* 2017;23(12):957–63. DOI: 10.1089/acm.2017.0081. PMID: 28657801.
 36. Khare A., Thada B., Jain N. et al. Comparison of Effects of Oral Melatonin with Oral Alprazolam used as a Premedicant in Adult Patients Undergoing Various Surgical Procedures under General Anesthesia: A Prospective Randomized Placebo-Controlled Study. *Anesth Essays Res* 2018;12(3):657–62. DOI: 10.4103/aer.AER_90_18. PMID: 30283171.
 37. Innominato P.F., Lim A.S., Palesh O. et al. The effect of melatonin on sleep and quality of life in patients with advanced breast cancer. *Support Care Cancer* 2016;24(3):1097–105. DOI: 10.1007/s00520-015-2883-6. PMID: 26260726.
 38. Palmer A.C.S., Zortea M., Souza A. et al. Clinical impact of melatonin on breast cancer patients undergoing chemotherapy; effects on cognition, sleep and depressive symptoms: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *PLoS One* 2020;15(4):e0231379. DOI: 10.1371/journal.pone.0231379. PMID: 32302347.
 39. Palmer A.C.S., Souza A., Dos Santos V.S. et al. The Effects of Melatonin on the Descending Pain Inhibitory System and Neural Plasticity Markers in Breast Cancer Patients Receiving Chemotherapy: Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Trial. *Front Pharmacol* 2019;10:1382. DOI: 10.3389/fphar.2019.01382. PMID: 31824318.
 40. Lissoni P., Rovelli F., Frassinetti A. et al. Oncostatic activity of pineal neuroendocrine treatment with the pineal indoles melatonin and 5-methoxytryptamine in untreatable metastatic cancer patients progressing on melatonin alone. *Neuro Endocrinol Lett* 2000;21(4):319–23. PMID: 11455367.

41. Lissoni P, Messina G., Rovelli F. Cancer as the main aging factor for humans: the fundamental role of 5-methoxy-tryptamine in reversal of cancer-induced aging processes in metabolic and immune reactions by non-melatonin pineal hormones. *Curr Aging Sci* 2012;5(3):231–5. DOI: 10.2174/1874609811205030010. PMID: 23451999.
42. Lissoni P. Biochemotherapy with immunomodulating pineal hormones other than melatonin: 5-methoxytryptamine as a new oncotoxic pineal agent. *Pathol Biol (Paris)* 2007;55(3–4):198–200. DOI: 10.1016/j.patbio.2006.12.008. PMID: 17451889.
43. Lissoni P, Rovelli F, Brivio F et al. Five year-survivals with high-dose melatonin and other antitumor pineal hormones in advanced cancer patients eligible for the only palliative therapy. *Res J Oncol* 2018;2(1):2.
44. Moradkhani F, Moloudizargari M., Fallah M. et al. Immunoregulatory role of melatonin in cancer. *J Cell Physiol* 2020;235(2):745–57. DOI: 10.1002/jcp.29036. PMID: 31270813.
45. Carrillo-Vico A., Lardone P.J., Alvarez-Sánchez N. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci* 2013;14(4):8638–83. DOI: 10.3390/ijms14048638. PMID: 23609496.
46. Hardeland R. Aging, Melatonin, and the pro- and anti-inflammatory networks. *Int J Mol Sci* 2019;20(5). DOI: 10.3390/ijms20051223. PMID: 30862067.
47. Ren W., Liu G., Chen S. et al. Melatonin signaling in T cells: Functions and applications. *J Pineal Res* 2017;62(3):10.1111/jpi.12394. DOI: 10.1111/jpi.12394. PMID: 28152213.
48. Guo L., Wang C., Qiu X. et al. Colorectal Cancer Immune Infiltrates: Significance in Patient Prognosis and Immunotherapeutic Efficacy. *Front Immunol* 2020;11:1052. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01052. PMID: 32547556.
49. Najafi S., Mirshafiey A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2019;41(1):16–24. DOI: 10.1080/08923973.2019.1566925. PMID: 30714422.
50. Zhuo C., Xu Y., Ying M. et al. FOXP3+ Tregs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer. *Immunol Res* 2015;61(3):338–47. DOI: 10.1007/s12026-014-8616-y. PMID: 25608795.
51. Mortezaee K., Potes Y., Mirtavoos-Mahyari H. et al. Boosting immune system against cancer by melatonin: A mechanistic viewpoint. *Life Sci* 2019;238:116960. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116960. PMID: 31629760.
52. Cheng L., Liu J., Liu Q. et al. Exosomes from Melatonin Treated Hepatocellularcarcinoma Cells Alter the Immunosuppression Status through STAT3 Pathway in Macrophages. *Int J Biol Sci* 2017;13(6):723–34. DOI: 10.7150/ijbs.19642. PMID: 28655998.
53. Guo Y.H., Sun H.F., Zhang Y.B. et al. The clinical use of the platelet/lymphocyte ratio and lymphocyte/monocyte ratio as prognostic predictors in colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(12):20011–24. DOI: 10.18632/oncotarget.15311. PMID: 28212553.
54. Lissoni P, Messina G., Borsotti G. et al. Modulation of Immune and Anti-Tumor Effects of Cancer Immunotherapy With Anti-Pd-1 Monoclonal Antibodies by the Pineal Hormone Melatonin: Preliminary Clinical Results. *J Immuno Allerg* 2020;1(1):1–6. DOI: 10.37191/Mapsci-2582-6549-1(1)-005.
55. Jung-Hynes B., Schmit T.L., Reagan-Shaw S.R. et al. Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts antiproliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and *in vivo* in TRAMP model. *J Pineal Res* 2011;50(2):140–9. DOI: 10.1111/j.1600-079X.2010.00823.x. PMID: 21062352.
56. Paroni R., Terraneo L., Bonomini F. et al. Antitumor activity of melatonin in a mouse model of human prostate cancer: relationship with hypoxia signalling. *J Pineal Res* 2014;57(1):43–52. DOI: 10.1111/jpi.12142. PMID: 24786921.
57. Su S.C., Hsieh M.J., Yang W.E. et al. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. *J Pineal Res* 2017;62(1):10. DOI: 10.1111/jpi.12370. PMID: 27706852.
58. Ma Q., Reiter R.J., Chen Y. Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions. *Angiogenesis* 2020;23(2):91–104. DOI: 10.1007/s10456-019-09689-7. PMID: 31650428.
59. Lo Sardo F., Muti P., Blandino G., Strano S. Melatonin and Hippo Pathway: Is There Existing Cross-Talk? *Int J Mol Sci* 2017;18(9):1913. DOI: 10.3390/ijms18091913. PMID: 28878191.
60. Li H.R., Wang C., Sun P. et al. Melatonin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity through preservation of YAP expression. *J Cell Mol Med* 2020;24(6):3634–46. DOI: 10.1111/jcmm.15057. PMID: 32068341.
61. Haghi-Aminjan H., Farhood B., Rahimifard M. et al. The protective role of melatonin in chemotherapy-induced nephrotoxicity: a systematic review of non-clinical studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2018;14(9):937–50. DOI: 10.1080/17425255.2018.1513492. PMID: 30118646.
62. Najafi M., Hooshangi Shayesteh M.R., Mortezaee K. et al. The role of melatonin on doxorubicin-induced cardiotoxicity: A systematic review. *Life Sci* 2020;241:117173. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.117173. PMID: 31843530.
63. Ma Z., Xu L., Liu D. et al. Utilizing Melatonin to Alleviate Side Effects of Chemotherapy: A Potentially Good Partner for Treating Cancer with Ageing. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:6841581. DOI: 10.1155/2020/6841581. PMID: 32566095.
64. Farhood B., Goradel N.H., Mortezaee K. et al. Melatonin as an adjuvant in radiotherapy for radioprotection and radiosensitization. *Clin Transl Oncol* 2019;21(3):268–79. DOI: 10.1007/s12094-018-1934-0. PMID: 30136132.
65. Maroufi N.F., Vahedian V., Hemati S. et al. Targeting cancer stem cells by melatonin: Effective therapy for cancer treatment. *Pathol Res Pract* 2020;216(5):152919. DOI: 10.1016/j.prp.2020.152919. PMID: 32171553.
66. Koçak N., Dönmez H., Yildirim İ.H. Effects of melatonin on apoptosis and cell differentiation in MCF-7 derived cancer stem cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2018;64(12):56–61. PMID: 30301504.
67. Hu C., Li L. Melatonin plays critical role in mesenchymal stem cell-based regenerative medicine *in vitro* and *in vivo*. *Stem Cell Res Ther* 2019;10(1):13. DOI: 10.1186/s13287-018-1114-8. PMID: 30635065.
68. Friend J., Reiter R.J. The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. *Mol Cell Endocrinol* 2015;401:213–20. DOI: 10.1016/j.mce.2014.12.013. PMID: 25528518.
69. Chuffa L., Seiva F., Cuciolo M. et al. Clock genes and the role of melatonin in cancer cells: an overview. *Melatonin Research* 2019;2(2):133–57. DOI: 10.32794/mr11250026.
70. Zhang J., Lv H., Ji M. et al. Low circadian clock genes expression in cancers: A meta-analysis of its association with clinicopathological features and prognosis. *PLoS One* 2020;15(5):e0233508. DOI: 10.1371/journal.pone.0233508. PMID: 32437452.
71. Sulli G., Lam M.T.Y., Panda S. Interplay between Circadian Clock and Cancer:

- New Frontiers for Cancer Treatment. Trends Cancer 2019;5(8):475–94. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.07.002. PMID: 31421905.
72. Heudobler D., Lüke F, Vogelhuber M. et al. Anakinosis: Correcting Aberrant Homeostasis of Cancer Tissue-Going Beyond Apoptosis Induction. Front Oncol 2019;9:1408. DOI: 10.3389/fonc.2019.01408. PMID: 31921665.
73. Heudobler D., Rechenmacher M., Lüke F. et al. Clinical Efficacy of a Novel Therapeutic Principle, Anakinosis. Front Pharmacol 2018;9:1357. DOI: 10.3389/fphar.2018.01357. PMID: 30546308.
74. Bondy S.C., Campbell A. Mechanisms Underlying Tumor Suppressive Properties of Melatonin. Int J Mol Sci 2018;19(8):2205. DOI: 10.3390/ijms19082205. PMID: 30060531.
75. Block K.I., Gyllenhaal C., Lowe L. et al. Designing a broad-spectrum integrative approach for cancer prevention and treatment. Semin Cancer Biol 2015;35 Suppl(Suppl):S276–S304. DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.09.007. PMID: 26590477.

ORCID автора / ORCID of author

Е.П. Смородин / E.P.Smorodin: <https://orcid.org/0000-0003-3002-2684>

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 18.11.2020. Принята к публикации: 24.12.2020.

Article submitted: 18.11.2020. Accepted for publication: 24.12.2020.

DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-33-41



Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор)

В.С. Горбик¹, З.С. Шпрах^{1,2}, Ж.М. Козлова¹, В.Г. Салова¹

¹ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

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

Контакты: Валентина Сергеевна Горбик valya.gorbik.1998@mail.ru

Достичь эффективной концентрации в клетке-мишени при различных патологических состояниях позволяет адресная доставка лекарственных препаратов с помощью липосом. Основным преимуществом липосомальных частиц является их способность к биодegradации и иммунологическая нейтральность, что позволяет улучшить профиль безопасности лекарственных средств (ЛС). В обзоре приведены сведения о составе липосом: основным компонентом липосомальной мембраны являются фосфолипиды, которые обеспечивают ее прочность и защиту от механических воздействий. Липосомальные частицы различают по размеру и количеству бислоевых оболочек, образующих везикулы, также выделяют липосомы с неламеллярной организацией. Состав и размер липосом выбирают в зависимости от поставленных целей, включая в мембрану вспомогательные вещества, влияющие на свойства и функции липосом, в том числе на скорость высвобождения содержимого везикул, средство липосом к ткани-мишени и др. В обзоре рассмотрены основные методы получения липосом и особенности их использования, преимущества и недостатки. Создание липосом, чувствительных к различным внешним или внутренним физико-химическим стимулам, позволяет реализовать эффективность ЛС, локализовать место его действия и уменьшить количество и серьезность побочных явлений. В настоящее время лекарственные препараты на основе липосом успешно используют в различных областях медицины – дерматологии, кардиологии, онкологии, неврологии и др. Наиболее активно проводятся доклинические и клинические исследования липосомальных ЛС для лечения злокачественных новообразований. Особое внимание в статье уделено работам российских исследователей в области направленной доставки ЛС. Показано, что на сегодняшний день липосомы являются открытой для изучения и совершенствования системой таргетной доставки ЛС.

Ключевые слова: липосомы, строение и состав, методы получения, липосомальные лекарственные средства

Для цитирования: Горбик В.С., Шпрах З.С., Козлова Ж.М., Салова В.Г. Липосомы как система таргетной доставки лекарственных средств (обзор). Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):33–41.

Liposomes as a targeted delivery system of drugs (review)

Valentina S. Gorbik¹, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Zhanna M. Kozlova¹, Valentina G. Salova¹

¹I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

²N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Valentina Sergeevna Gorbik valya.gorbik.1998@mail.ru

Liposomal targeted drug delivery makes it possible to achieve effective concentration in the target cell under various pathological conditions. The main advantage of liposomal particles is their biodegradability and immunological neutrality, which improves the safety profile of drugs. The review provides information on the composition of liposomes: the main component of the liposomal membrane is phospholipids, which provide its strength and protect from mechanical impacts. Liposomal particles are distinguished by the size and number of bilayer membranes, also secreted liposomes with a non-lamellar organization. The composition and size of liposomes are selected depending on the purpose, including excipients in the membrane that affect the properties and

functions of liposomes, including the rate of release of the components, the affinity of liposomes for the target tissue, etc. The review considers the main methods for obtaining liposomes and the features of their use, advantages and disadvantages. The creation of liposomes that are sensitive to various external or internal physico-chemical factors makes it possible to realize drugs effects, localize the site of its action and reduce the number and severity of side effects. Currently, liposome-based drugs are successfully used in various fields of medicine – dermatology, cardiology, oncology, neurology, etc. The most active conduct preclinical and clinical studies of liposomal drugs for the treatment of malignant neoplasms. Particular attention is paid to the work of Russian researchers in the field of targeted drug delivery. It is shown that today liposomes are an open for study and improvement system for targeted drug delivery.

Key words: liposomes, structure and composition, production methods, liposomal drugs

For citation: Gorbik V.S., Shprakh Z.S., Kozlova Z.M., Salova V.G. Liposomes as a targeted delivery system of drugs (review). *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):33–41. (In Russ.).

Введение

Терапевтическая активность лекарственного препарата (ЛП) определяется достижением нужной концентрации действующего вещества в клетке-мишени, органе или ткани. Борьба со многими заболеваниями требует длительного приема лекарственных средств (ЛС), некоторые из них кумулируются в организме. Кроме того, ряд ЛП характеризуется неудовлетворительным фармакокинетическим профилем наряду с неспецифическим распределением в органах и тканях, что вызывает серьезные побочные явления и системную токсичность [1]. Актуальным решением вопроса повышения безопасности и эффективности лекарственной терапии является разработка транспортных систем, позволяющих обеспечить направленную доставку ЛП к клетке-мишени, снизив при этом общее токсическое действие на организм [2–4].

Впервые адресная доставка упоминается в 1906 г. немецким ученым Паулем Эрлихом, целью работы которого было найти ЛС, действующее точно на рецепторы клеток бактерий и паразитов [5]. Созданная им «теория боковых цепей» позволила понять механизмы взаимодействия биологически активных веществ с клеткой и способствовала возникновению новых идей и возможностей в осуществлении таргетной доставки ЛП.

Одним из наиболее изученных и успешно применяемых средств доставки ЛП являются липосомы, впервые описанные в 1963 г. А. Бэнгхемом. Им была обнаружена способность фосфолипидов (ФЛ) самостоятельно образовывать в воде замкнутые оболочки, внутри которых создается заполненное водой пространство с растворенным ЛС [6]. Инкапсуляция многих ЛС в липосомы может помочь в терапии заболеваний, требующих длительного и агрессивного лечения, поскольку появляется возможность защиты от деградации в биологических средах организма [7, 8] и преодоления множественной лекарственной устойчивости [9]. Включение ЛС в липосомальные везикулы позволяет повысить биодоступность труднорастворимых веществ и терапевтический индекс

ЛП [10, 11]. Например, антрациклины могут вызывать тяжелую сердечную недостаточность, что ограничивает диапазон доз, используемых при лечении данной группой препаратов. Применение липосом для доставки доксорубина предотвращает накопление препарата в тканях миокарда и снижает его кардиотоксичность [12–14]. В доклинических исследованиях для липосомального доксорубина летальная доза (LD_{50}) выше примерно в 2 раза у мышей и в 1,5 раза у собак породы бигль по сравнению с доксорубином в свободной форме [15, 16]. Особо следует отметить биodeградируемость и иммунологическую нейтральность липосомальных частиц [17, 18]. Это является преимуществом в профиле безопасности препаратов с адресной доставкой.

Целью настоящей работы является обзор научных данных о структуре липосом, их составе и классификации. В статье приведены краткие сведения о методах получения липосом, а также информация о последних достижениях российских исследователей в области разработки ЛС с липосомальной доставкой.

Структура и классификация липосом

Липосомы – полые гетерофазные везикулы, водная фаза которых окружена амфифильными ФЛ мембраны (рис. 1) [20]. Такие частицы обладают достаточно большой механической прочностью и способностью сохранять целостность при различных механических воздействиях [21]. Гидрофильные ЛП (например, доксорубин) инкапсулируют в водную фазу везикулы, а гидрофобные (амфотерицин В, паклитаксел, доцетаксел и др.) – в билипидный слой мембраны липосом [22–24].

Помимо ФЛ в состав мембраны липосом могут входить молекулы полиэтиленгликоля, создающие избыточное осмотическое давление на поверхности наночастиц. Пегилированная везикула становится невидимой для ретикулоэндотелиальной системы, что увеличивает время циркуляции частицы в кровотоке [18, 25]. Еще одним важным компонентом липидного бислоя является холестерин, обеспечивающий

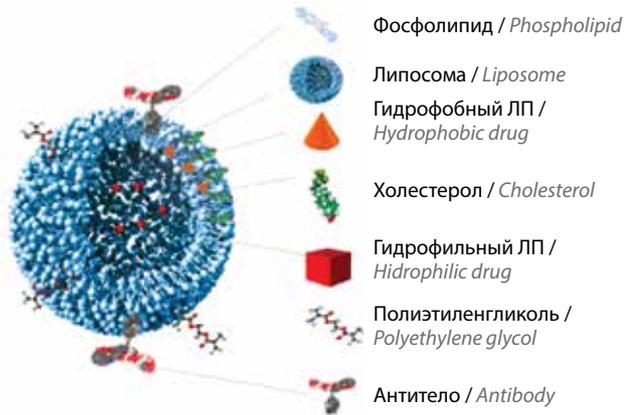


Рис. 1. Схематическая структура липосомы, содержащей гидрофобные и гидрофильные лекарственные препараты (ЛП) (адаптировано из [19])

Fig. 1. Schematic structure of liposome containing hydrophobic and hydrophilic drugs (adapted from [19])

микровязкость плазматической мембраны. Повышение концентрации холестерина приводит к увеличению размера и проницаемости липосомальных частиц, что дает возможность регулировать высвобождение ЛП [26].

Для стабилизации и улучшения кинетики высвобождения ЛП возможно включение липосомы в гидрогель. Это помогает решить проблему поглощения липосом макрофагами и позволяет обеспечить длительное хранение липосомальных ЛП без лиофилизации [27]. В связи с этим было предложено вводить цитостатики цисплатин и проспидин в гидрогель на основе фосфата декстрана [28].

В зависимости от размера частиц и количества бислоев, образующих везикулы (ламеллярность), липосомы можно разделить на следующие группы: малые однослойные везикулы, большие однослойные везикулы, гигантские однослойные везикулы, двухслойные везикулы, многослойные везикулы (табл. 1) [29]. Существуют также липосомы с неламеллярной организацией – спонгосомы и кубосомы. Спонгосомы имеют случайную трехмерную мембранную организацию, а кубосомы характеризуются периодически упорядоченными мембранными структурами кубической решетки с различными симметриями: двойной алмаз, гироид или примитивные кубические типы. Было показано, что кубосомы представляют собой более стабильную липидную систему, чем липосомы, а также имеют больше возможностей для инкапсуляции химиотерапевтических агентов за счет их жидкокристаллической двунепрерывной мембранной структуры [30].

Состав и размер липосом могут быть выбраны в зависимости от целей, поставленных исследователем. Путем включения в мембрану везикул специфических белков возможны уменьшение скорости деградациии, контроль высвобождения содержимого

липосомальных частиц, увеличение сродства липосомы к ткани [31].

Таблица 1. Классификация липосом в зависимости от размера частиц и количества бислоев

Table 1. The liposome classification depends on the size of the particles and the number of bilayers

Структурный параметр Structure parameter	Размер, нм Size, nm
Малые однослойные везикулы Small unilamellar vesicle	20–100
Большие однослойные везикулы Large unilamellar vesicle	>100
Гигантские однослойные везикулы Giant unilamellar vesicle	>1000
Двухслойные везикулы Oligolamellar vesicle	>500
Многослойные везикулы Multi lamellar vesicle	1000–10 000

Достижения в области доставки лекарств побудили исследователей рассмотреть 2 важные стратегии при разработке новых многофункциональных липосомальных частиц: стратегию пассивного и активного нацеливания. При пассивном нацеливании инкапсулированное в липосому вещество за счет физических свойств наноконтейнера способно накапливаться в определенном пораженном участке организма и селективно взаимодействовать с анатомическими структурами сосудов ткани-мишени, реализуя при этом свое фармакологическое действие [30]. Другим вариантом доставки лекарственного вещества (ЛВ) в пораженный орган или ткань является транспорт с помощью направляющего вектора, в качестве которого могут выступать моноклональные антитела, лиганды рецепторов, ферменты, гликопротеины [27]. Такой вид транспорта получил название активного метода адресной доставки.

Способы получения липосом

Действующее вещество может быть инкапсулировано в липосому различными методами: метод Бэнгхема, метод обращения фаз, метод удаления детергента. С помощью данных методов преимущественно образуются мультиламеллярные везикулы [17]. Для получения однослойных липосом применяют метод мембранной экструзии и ультразвуковую обработку [32].

Метод Бэнгхема (метод гидратации липидной пленки) является универсальным и широко используется для получения мультиламеллярных везикул [17]. Данный метод основан на получении растворов липидов и субстанции ЛВ с последующим

перемешиванием и упариванием, которое рекомендуется проводить при температуре выше температуры фазового перехода липидов (Тф.п.) или выше Тф.п. самого высококипящего компонента смеси (37–43 °С). Затем пленку гидратируют в буферном растворе для получения везикул. Например, по методике Бэнгхема было получено ЛС, содержащее в билипидном слое мембраны липосом убихинон (Q10), восстановленная форма которого проявляет антиоксидантные свойства. Липосомальная форма позволила доставлять субстанцию Q10, имеющую низкую растворимость в воде, в более глубокие слои дермы при лечении различных кожных заболеваний [33].

Метод обращения фаз обеспечивает максимальное включение водной фазы в структуру липосом. Водный раствор ЛВ растворяют в органическом растворе липидов с последующей звуковой обработкой. При этом образуется эмульсия (капли воды в органическом растворителе), которая высушивается до полутвердого геля на роторном испарителе [34].

При использовании метода детергентного диализа липиды растворяют в водном растворе детергента (неионного, анионного или катионного сурфактанта) и ЛВ, подлежащих инкапсуляции. Детергент должен иметь высокую концентрацию мицеллообразования. Это необходимо для более легкого удаления детергента диализом или колоночной хроматографией [35].

Метод мембранной экструзии заключается в пропускании липидных дисперсий под давлением через поликарбонатные фильтры с различным диаметром пор. Возможно использование фильтров из других материалов, если они совместимы с ЛВ. Преимуществом данного метода является получение гомогенных малых однослойных везикул. Метод экструзии применим для получения стабильных липосом с различным составом [36].

Метод ультразвуковой обработки представляет собой озвучивание многослойных везикул с помощью пульсирующих волн высокой частоты. Для получения гомогенной дисперсии однослойных липосом применение метода ультразвуковой обработки ограничено, поскольку он имеет ряд недостатков: при использовании данного метода происходит денатурация или инактивация термочувствительных веществ (ДНК, белков), гидролиз ФЛ, полученные этим методом везикулы недостаточно устойчивы при хранении [37].

Влияние физико-химических стимулов на высвобождение действующего вещества из липосом

Особый интерес для ученых представляют липосомы, которые чувствительны к разным физико-химическим стимулам. Стимулы могут быть внешними (температура, свет, магнитное поле, ультразвук) и внутренними (активность фермента, изменение pH) [38].

Так, механизм действия термочувствительных липосом реализуется путем разрушения мембраны везикулы при нагревании до Тф.п. липидов. Обычно термолипосомы используют в комбинации с локальной гипертермией. Применение гипертермии увеличивает скорость кровотока в сосудах, снабжающих опухоль питательными веществами, обеспечивая при этом накопление липосом в прогреваемом органе [39, 40]. Исследования В. Tiwari Sandip и соавт. показали эффективность использования термолипосом с метотрексатом в комбинации с локальным нагреванием опухоли до 42 °С, при этом наблюдалось максимальное (83 %) высвобождение метотрексата [41]. К. Коно и соавт. синтезировали термочувствительные липосомы с целевой специфичностью. Пегилированные липосомы были модифицированы термочувствительными цепями и конъюгированы с моноклональным антителом трастузумабом (герцептином), распознающим рецептор HER2. Сверхэкспрессия этого рецептора происходит при некоторых видах рака молочной железы [38].

Клинический и научный интерес представляют фоточувствительные липосомы, принцип действия которых основан на высвобождении действующего вещества под влиянием ультрафиолетового света. Фоточувствительность создается путем включения в состав везикул фотоизомеризуемой липидной молекулы (1,2-(4'-н-бутилфенилазо-4'-(γ-фенилбутироил))глицеро-3-фосфохолина (Bis-Azo PC) в низких концентрациях [42]. В клинической практике терапия заболеваний сетчатки глаза осуществляется с помощью фоточувствительной липосомальной формы ЛВ вертепорфина (ЛП – визудин) [43].

Появилась возможность влиять на высвобождение ЛС из липосом с помощью ультразвука и магнитных полей, используемых ранее лишь в диагностике заболеваний. Дестабилизация липосомальных частиц происходит под действием волн, которые излучает специальный датчик в месте злокачественного новообразования. При поглощении энергия волны преобразуется в тепло, что позволяет создать локальную гипертермию. А. Schroeder и соавт. продемонстрировали, что терапию липосомальными препаратами (Doxil, Stealth™ Cisplatin и метилпреднизолона гемисукцинатом) целесообразно применять в сочетании с низкочастотными волнами (20 кГц) [44].

Известно, что внеклеточное значение pH в опухолях равно 7,0, в то время как в здоровых тканях аналогичный показатель составляет в среднем 7,4 [45]. В связи с этим были разработаны pH-чувствительные липосомы, которые селективно высвобождают действующее вещество в месте злокачественного новообразования [46]. Первая pH-чувствительная липосомальная система была представлена М.В. Yatvin и соавт. и состояла из фосфатидилхолина и n-пальмитоилгемосукцината [45].

L.O.F. Monteiro совместно с группой исследователей разработали рН-чувствительную липосомальную форму, содержащую паклитаксел. В кислой среде опухолевого окружения (рядом с опухолевой клеткой) такие липосомы подвергаются дестабилизации и высвобождают инкапсулированное ЛС [24].

Y. Li и соавт. создали липосому, чувствительную как к изменению рН, так и к активности эстеразы, для доставки камптотецина и мРНК к месту новообразования. Данная система также является многообещающей моделью для лечения онкологических заболеваний [47].

Современные достижения российских исследователей в области разработки лекарственных средств с липосомальной доставкой

Липосомальные формы ЛВ активно применяются в терапии инфекционных заболеваний, онкологии, неврологии, дерматологии, эндокринологии и других областях медицины [48]. В табл. 2 представлены некоторые препараты на основе липосом, которые широко используются в клинической практике.

Д.С. Третьяковой и соавт. была разработана липосомальная форма противоопухолевого ЛС мелфалана. Липосомы диаметром 100 нм были получены методом мембранной экструзии и лиофилизированы. Доклинические исследования показали снижение острой токсичности липосомальной формы в 2 раза по сравнению с оригинальным ЛП. В связи с этим появляется возможность расширения перечня показаний к терапии мелфаланом [57].

М.Б. Лапенкова с коллегами инкапсулировали в липосомы микобактериофаг D29 и исследовали эффективность полученной системы. Эксперименты на клеточных моделях туберкулезной инфекции показали выраженное преимущество липосомальной формы микобактериофага, поскольку появилась возможность увеличить эффективность терапии данной патологии в условиях приобретенной резистентности к противотуберкулезным препаратам [58].

Исследователи под руководством А.С. Селищевой изучили действие липосом, содержащих ФЛ кардиолипина и нагруженных левофлоксацином, на рост *Micobacterium tuberculosis*. В результате изменения состава липидной оболочки липосомы и использования

Таблица 2. Некоторые липосомальные формы лекарственных препаратов, используемые в клинической практике

Table 2. Some liposomal forms of drugs used in clinical practice

МНН INN	Торговые наименования Trade names	Регистрация в РФ Registration in Russian Federation	Показания к применению Application	Источники литературы References
Доксорубин Doxorubicin	Доксил Doxil Келикс Caelyx	Есть Yes Есть Yes	Рак яичников, рак легкого, рак пищевода, рак поджелудочной железы, инсулинома Ovarian cancer, lung cancer, esophageal cancer, pancreatic cancer, insulinoma	[14, 49]
Даунорубин Daunorubicin	DaunoXome	Нет No	Острый лейкоз, лимфогранулематоз Acute leukemia, lymphogranulomatosis	[50]
Амфотерицин В Amphotericin B	Abelcet Амбизом Ambisom Амфоцил Amphocil	Нет No Есть Yes Есть Yes	Грибковые инфекции Fungal infections	[22]
Винкристин Vincristine	Onco TCS	Нет No	Неходжкинские лимфомы Non-Hodgkin lymphoma	[38, 51]
Цитарабин Cytarabine	Depocyt	Нет No	Неопластический менингит и лимфоматозный менингит Neoplastic meningitis and lymphomatous meningitis	[52]
Нистатин Nystatin	Nyotran	Нет No	Грибковые инфекции Fungal infections	[53, 54]
Вертепорфин Verteporphin	Визудин Visudine	Есть Yes	Влажная дегенерация желтого пятна Wet macular degeneration	[55]
Тербуталин Terbutaline	Торех-Вr	Нет No	Астма Asthma	[56]

Примечание. МНН – международное непатентованное наименование лекарственного средства.

Note. INN – international non-proprietary names for pharmaceutical substances.

комбинации кардиолипина с фосфатидилхолином и холестеринном удалось снизить минимальную подавляющую концентрацию антибиотика до 2 мкг/мл [59].

А. В. Ланцовой и соавт. изучена специфическая противоопухолевая активность липосомального препарата на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксида алюминия (липофталоциана), предназначенного для фотодинамической терапии онкологических заболеваний. *In vivo* липофталоциан показал противоопухолевую активность на различных трансплантируемых мышечных опухолях (эпидермоидная карцинома легкого Льюиса, саркома S37 и аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ). Оптимальная доза составила 6 мг/кг. Данные исследований свидетельствуют о возможности использования данного ЛС для фотодинамической терапии опухолей поверхностной локализации [60].

Терапия сосудистых патологий головного мозга включает применение препаратов, обеспечивающих защиту нейронов от действия повреждающих факторов. Липолевая кислота является одним из универсальных антиоксидантов, применяемых в комплексной терапии ишемии головного мозга. В. А. Шелкогоновым и соавт. разработаны липосомальные формы липолевой кислоты на основе фосфатидилхолина, входящие в состав наноэмульсий. Данные частицы имеют размер 145 нм, характеризуются высокой степенью включения липолевой кислоты и стабильны при хранении. В результатах исследования *in vivo* отмечено, что степень агрегации тромбоцитов уменьшается при увеличении концентрации препарата липолевой кислоты в липосомальной форме [61].

А. С. Алексеева и соавт. исследовали альтернативный путь включения водорастворимых антибиотиков антрациклинового ряда в липосомы. Было предложено включение доксорубина в билипидный слой везикулы в виде конъюгата с пальмитоил-олеилфосфатидилхолином и димиристоилфосфатидилхолином (липофильные пролекарства). Включение происходит за счет образования водородных связей между агликоном доксорубина и фосфатными группами липидов. Обнаруженные свойства производных доксорубина способствовали появлению возможности включения антибиотика в мембрану липосом [62, 63].

В ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработана липосомальная лекарственная форма для инъекций аналога соматостатина цифетрилина [64, 65]. Исследования противоопухолевой активности данной лекарственной формы продемонстрировали эффективность действия при подкожном введении в дозах 10 и 20 мг/кг (торможение роста опухоли составило 87–65 % и 87–62 % соответственно) [66, 67].

Также липосомальные везикулы применяются для коррекции ишемических повреждений миокарда. Успешно завершена I фаза клинических исследований липосомального алпростадилла для инъекций, который применяется в терапии сердечно-сосудистых заболеваний. Доля включения ЛП в липосому составляет $95 \pm 1,2$ % до и после лиофилизации. Липосомальная форма алпростадилла стабильна при длительном хранении [68].

Научный интерес представляют препараты на основе иммунолипосом, принцип направленного транспорта которых основывается на связывании молекулы с моноклональными антителами [26]. На сегодняшний день иммунолипосомальная конструкция разработана для противоопухолевых ЛС различных классов: доксорубина, митоксантрона, лизомустина [69, 70]. А. Хашем и соавт. разработали иммунолипосомы диаметром 120 ± 5 нм, содержащие 6 мг/мл фотосенса. Включение фотосенса в липосомы составило 61 %. После инкубации Her2-положительных клеток молочной железы человека линии SK-BR-3 с иммунолипосомальным фотосенсом регистрировали 95 % связывание иммунолипосом с клетками-мишенями [71].

Наиболее широко исследуют липосомальные формы препаратов для лечения онкологических заболеваний. Это обусловлено прежде всего неблагоприятным фармакокинетическим профилем большинства противоопухолевых ЛС и их неспецифическим распределением в органах и тканях, что приводит к серьезным побочным явлениям и системной токсичности [26]. Клинические исследования проводятся для липосомальных форм препаратов, применяемых в онкологии: Atragen (третиноин), Stimuvax (циклофосфамид), ThermoDox (доксорубин), Lipoplatin (цисплатин), Aroplatin (препарат платины) и др. [72].

Заключение

Многие ЛП, имеющие высокую частоту возникновения нежелательных побочных эффектов различной степени выраженности (от головной боли до цитотоксичности для нормальных тканей), стали доступны для применения в клинической практике благодаря инкапсуляции действующего вещества в липосомы. Использование липосомальных везикул также увеличивает время циркуляции и биодоступность ЛС, защищает его от деградации в биологических средах организма. Характеристики липосом и их чувствительность к разным физико-химическим стимулам (температура, свет, pH и др.) могут быть направленно изменены при включении в состав липосомальной мембраны различных вспомогательных веществ. Поверхность липосом может быть функционализирована использованием направляющих векторов, обеспечивающих адресную доставку ЛС к клетке,

ткани или органу-мишени. Преимущества ЛС на основе липосом позволяют использовать их в различных областях медицины, прежде всего в онкологии. Поскольку многие липосомальные ЛС находятся

на разных стадиях доклинических и клинических исследований, липосомы являются открытой для дальнейшего изучения системой таргетной доставки ЛС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Danhier F., Feron O., Préat V. To exploit the tumor microenvironment: passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2010;148(2):135–46. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.08.027.
- Arantseva D.A., Vodovozova E.L. Platinum-based antitumor drugs and their liposomal forms in clinical trials. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2018;44(6):619–30. DOI: 10.1134/S0132342318060040.
- Allen T.M., Martin F.J. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines. *Semin Oncol* 2004;31(13):5–15. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.08.001.
- Sriraman S.K., Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as drug carriers. *Advanced Biomaterials and Biodevices* 2014;2:79–119. DOI: 10.1002/9781118774052.ch3.
- Valent P., Groner B., Schumacher U. et al. Paul Ehrlich (1854–1915) and his contributions to the foundation and birth of translational medicine. *J Innate Immun* 2016;8(2):111–20. DOI: 10.1159/000443526. PMID: 26845587.
- Bangham A.D. Physical structure and behavior of lipids and lipid enzymes. *Advances in lipid research* 1963;1:65–104. DOI: 10.1016/b978-1-4831-9937-5.50008-9. PMID: 14248958.
- Cristiano M.C., Cosco D., Celia C. et al. Anticancer activity of all-trans retinoic acid-loaded liposomes on human thyroid carcinoma cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2017;150:408–16. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.10.052.
- Park K., Kwon I.C. Oral protein delivery: Current status and future prospect. *Reactive and Functional Polymers* 2011;71(3):280–7. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2010.10.002.
- Matsuo H., Wakasugi M., Takanada H. et al. Possibility of the reversal of multidrug resistance and the avoidance of side effects by liposomes modified with MRK-16, a monoclonal antibody to P-glycoprotein. *J Control Release* 2001;77(2):77–86. DOI: 10.1016/s0168-3659(01)00460-6. PMID: 11689261.
- Mohammed A.R., Weston N., Coombes A.G.A. et al. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int J Pharm* 2004;285(2):23–34. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.07.010.
- Wang C.X., Li C.L., Zhao X. et al. [Pharmacodynamics, pharmacokinetics and tissue distribution of liposomal mitoxantrone hydrochloride] [Article in Chinese]. *Yao Xue Xue Bao* 2010;45(12):1565–9. PMID: 21351498.
- Inglut C.T., Sorrin A.J., Kuruppu T. et al. Immunological and toxicological considerations for the design of liposomes. *Nanomaterials* 2020;10(2):190. DOI: 10.3390/nano10020190. PMID: 31978968.
- Khan A.A., Allemailem K.S., Almatroodi S.A. Recent strategies towards the surface modification of liposomes: an innovative approach for different clinical applications. *Biotech* 2020;10(4):163. DOI: 10.1007/s13205-020-2144-3. PMID: 32206497.
- Skubitz K.M., Blaes A.H., Konety S.H. et al. Cardiac safety profile of patients receiving high cumulative doses of pegylated-liposomal doxorubicin: use of left ventricular ejection fraction is of unproven value. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;80(4):787–98. DOI: 10.1007/s00280-017-3420-8. PMID: 28856562.
- Kanter P.M., Klaich G., Bullard G.A. et al. Preclinical toxicology study of liposome encapsulated doxorubicin (TLC D-99): Comparison with doxorubicin and empty liposomes in mice and dogs. *In Vivo* 1994;8(6):975–82. PMID: 7772749.
- Solomon R., Gabizon A.A. Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma* 2008;8(1):21–32. DOI: 10.3816/clm.2008.n.001. PMID: 18501085.
- Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S. et al. Liposome: classification, preparation, and application. *Nano-scale Research Letters* 2013;8(1):102. DOI: 10.1186/1556-276X-8-102. PMID: 23432972.
- Mohamed M., Lila A.S.A., Shimizu T. et al. PEGylated liposomes: immunological responses. *Sci Technol Adv Mater* 2019;20(1):710–24. DOI: 10.1080/14686996.2019.1627174. PMID: 31275462.
- Beltrán-Gracia E., Lopez A., Higuera-Ciajara I. et al. Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications. *Cancer Nanotechnology* 2019;10(1):1–40. DOI: 10.1186/s12645-019-0055-y.
- Saraf S., Jain A., Tiwari A. et al. Advances in liposomal drug delivery to cancer: An overview. *J Drug Deliv Sci Tech* 2020;56:101549. DOI: 10.1016/j.jddst.2020.101549.
- Lamichhane N., Udayakuma T.S., D'Souza W.D. et al. Liposomes: Clinical Applications and Potential for Image-Guided Drug Delivery. *Molecules* 2018;23(2):288. DOI: 10.3390/molecules23020288. PMID: 29385755.
- Groll A.H., Rijnders B.J.A., Walsh T.G. et al. Clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and efficacy of liposomal amphotericin B. *Clin Infect Dis* 2019;68(4):260–74. DOI: 10.1093/cid/ciz076. PMID: 31222253.
- Matsumura Y., Gotoh M., Muro K. et al. Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer. *Ann Oncol* 2004;15(3):517–25. DOI: 10.1093/annonc/mdh092. PMID: 14998859.
- Monteiro L.O.F., Malachias A., Pound-Lana G. et al. Paclitaxel-loaded pH-sensitive liposome: new insights on structural and physicochemical characterization. *Langmuir* 2018;34(20):5728–37. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00411.
- Shen Z., Fisher A., Liu W.K., Li Y. PEGylated “stealth” nanoparticles and liposomes. In: *Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol*. Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Elsevier Inc, 2018. pp.1–26. DOI: 10.1016/B978-0-08-101750-0.00001-5.
- Olusanya T.O.B., Ahmad R.R.H., Ibegbu D.M. et al. Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules* 2018;23(4):907. DOI: 10.3390/molecules23040907. PMID: 29662019.
- Олгаржевская Н.Д., Кричевский Г.И., Коровина М.А. и др. Методы доставки лекарств при лечении онкологических заболеваний. *Biomedical*

- Chemistry: Research and Methods 2019;2(1):1–11. [Oltarzhetskaja N.D., Krichevskij G.I., Korovina M.A. et al. Methods of Delivery of Medications for the Treatment of Oncological Diseases. Biomedical Chemistry: Research and Methods 2019;2(1):1–11 (In Russ.)]. DOI: 10.18097/bmcrm00089.
28. Yurkshovich T.L., Solomevich S.O., Bychkovsky P.M. et al. Investigation of the sorption interactions of the anti-cancer drug Prospidin with the gel-forming quick-swellable dextran phosphate. Transactions of the Belarusian State University. Ser. Physiological, Biochemical and Molecular Basis of the Functioning of Biosystems. 2013;8(1):260–5.
 29. Nkanga C.I., Bapolisi A.M., Okafor N.I., Krause R.W.M. General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. In: Liposomes – Advances and Perspectives. Ed. by A. Catala. IntechOpen: London, 2019. DOI: 10.5772/intechopen.84255.
 30. Rideau E., Dimova R., Schwille P. et al. Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking. Chem Soc Rev 2018;47(23): 8572–610. DOI: 10.1039/c8cs00162f. PMID: 30177983.
 31. Dianat-Moghadam H., Heidarifard M., Jahanban-Esfahla R. et al. Cancer stem cells-emanated therapy resistance: implications for liposomal drug delivery systems. J Control Release 2018;288:62–83. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.08.043. PMID: 30184466.
 32. Choudhury A., Ahmed F.R.S., Hossen M.N. et al. Liposome: a carrier for effective drug delivery. Journal of Applied Pharmaceutical Research 2020;8(1):22–8. DOI: 10.3923/pjbs.2006.1181.1191.
 33. Gokce E.H., Korkmaz E., Tuncay-Tanriverdi S. et al. A comparative evaluation of coenzyme Q10-loaded liposomes and solid lipid nanoparticles as dermal antioxidant carriers. Int J Nanomedicine 2012; 7:5109–17. DOI: 10.2147/IJN.S34921.
 34. Szoka F., Papahadjopoulos D. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse phase. Proc Natl Acad Sci U S A 1978;75:4194–8.
 35. Brunner J., Skrabai P., Hauser H. Single bilayer vesicles prepared without sonication. Physicochemical properties. Biochim Biophys Acta 1976;455:322–31.
 36. Новикова А.А., Кезимана П., Станишевский Я.М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор). Разработка и регистрация лекарственных средств 2017;2:134–8. [Novikova A.A., Kezimana P., Stanishevskiy Y.M. Methods of obtaining liposomes, used as drug delivery systems (review). Razrabotka i Registratsia Lekarstvennikh Sredstv = Drug Development & Registration 2017;(2):134–8 (In Russ.)].
 37. Шахмаев А.Е., Краснополянский Ю.М., Волчик И.В. и др. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов. Украинский биофармацевтический журнал 2012;4(21):4–11. [Shahmaev A.E., Krasnopolskiy Yu.M., Volchik I.V. et al. Technological principles of obtaining liposomal drugs. Ukrainskiy Biopharmatsevticheskiy Zhurnal = Ukrainian Biopharmaceutical Journal 2012;4(21):4–11. (In Russ.)].
 38. Kono K., Takashima M., Yuba E. et al. Multifunctional liposomes having target specificity, temperature-triggered release, and near-infrared fluorescence imaging for tumor-specific chemotherapy. J Control Release 2015;216:69–77. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.08.005.
 39. Douer D. Efficacy and safety of vincristine sulfate liposome injection in the treatment of adult acute lymphocytic leukemia. The Oncologist 2016; 21(7):840–7. DOI: 10.1634/theoncologist. PMID: 27328933.
 40. Тазина Е.В., Мещерикова В.В., Игнатьева Е.В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубина. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(1):40–7. [Tazina E.V., Mescherikova V.V., Ignatieva E.V. et al. Biopharmaceutical investigations of thermosensitive liposomes loaded with doxorubicin. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2009;8(1):40–7 (In Russ.)].
 41. Tiwari Sandip B., Udupa N., Rao B.S.S. et al. Thermosensitive liposomes and localised hyperthermia – an effective bimodality approach for tumour management. Indian Journal of Pharmacology 2000;32(3):214–20.
 42. Bisby R.H., Mead C., Morgan C.G. Active Uptake of Drugs into Photosensitive Liposomes and Rapid Release on UV Photolysis. Photochem Photobiol 2000;72(1):57–61. DOI: 10.15690/vramn.v67i3.181.
 43. Puri A. Phototriggerable liposomes: current research and future perspectives. Pharmaceutics 2014;6(1):1–25. DOI: 10.3390/pharmaceutics6010001. PMID: 24662363.
 44. Schroeder A., Avnir Y., Weisman S. et al. Controlling Liposomal Drug Release with Low Frequency Ultrasound: Mechanism and Feasibility. Langmuir 2007;23:4019–25. DOI: 10.1021/la0631668.
 45. Yatvin M.B., Kreutz W., Horwitz B.A., Shinitzky M. pH-sensitive liposomes: possible clinical implications. Science 1980;210(4475):1253–5. DOI: 10.1126/science.7434025.
 46. Ropert C. Liposomes as a gene delivery system. Braz J Med Biol Res 1999;32(2):163–9. DOI: 10.1590/S0100-879X1999000200004.
 47. Li Y., Liu R., Yang J. et al. Dual sensitive and temporally controlled camptothecin prodrug liposomes codelivery of siRNA for high efficiency tumor therapy. Biomaterials 2014;35(36):9731–45. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.022.
 48. Krasnopolskii Y.M., Grigoreva A.S., Katsai O. et al. Technologies and perspectives of liposomal drug application in clinical practice. Nanotechnologies in Russia 2017;12(7–8):461–70. DOI: 10.1134/S1995078017040139.
 49. Safra T. Cardiac safety of liposomal anthracyclines. The Oncologist 2003;8: 17–24. DOI: 10.1634/theoncologist.8-suppl_2-17. PMID: 13679592.
 50. Krauss A.C., Gao X., Li L. et al. FDA approval summary: (daunorubicin and cytarabine) liposome for injection for the treatment of adults with high-risk acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res 2019;25(9):2685–90. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2990. PMID: 30541745.
 51. Said R., Tsimberidou A.M. Pharmacokinetic evaluation of vincristine for the treatment of lymphoid malignancies. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2014;10(3):483–94. DOI: 10.1517/17425255.2014.885016.
 52. Blair H.A. Daunorubicin/Cytarabine Liposome: A review in acute myeloid leukaemia. Drugs 2018;78(18):1903–10. DOI: 10.1007/s40265-018-1022-3. PMID: 30511323.
 53. Larson J.L., Wallace T.L., Tyl R.W. et al. The reproductive and developmental toxicity of the antifungal drug Nyotran® (liposomal nystatin) in rats and rabbits. Toxicol Sci 2000;53(2):421–9. DOI: 10.1093/toxsci/53.2.421.
 54. Wang Y., Grainger D.W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: Reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. Adv Drug Deliv Rev 2019;151:56–71. DOI: 10.1016/j.addr.2019.03.003.
 55. Rizvi I., Nath S., Obaid G. et al. A combination of visudyne and a lipid anchored liposomal formulation of benzoporphyrin derivative enhances photodynamic therapy efficacy in a 3D model for ovarian cancer. Photochem Photobiol 2019;95(1): 419–29. DOI: 10.1111/php.13066. PMID: 30499113.
 56. Gupta A.Z., Mandal M.K., Singh B. et al. Liposomes: Current Approaches for Development and Evaluation. International Journal of Drug Delivery Technology 2017;7(4):269–75. DOI: 10.25258/ijddt.v7i04.10649.
 57. Tretiakova D., Svirshchevskaya E., Onishchenko N. et al. Liposomal Formulation of a Melphalan Lipophilic Prodrug: Studies of Acute Toxicity, Tolerability, and Antitumor Efficacy.

- Curr Drug Deliv 2020;17(4):312–23. DOI: 10.2174/1567201817666200214105357.
58. Lapenkova M.B., Alyapkina Yu.S., Vladimirovsky M.A. Bactericidal Activity of Liposomal Form of Lytic Mycobacteriophage D29 in Cell Models of Tuberculosis Infection *In Vitro*. Bull Exp Biol Med 2020;169(3):361–4. DOI: 10.1007/s10517-020-04887-6. PMID: 32743783.
59. Гайдукевич С.К., Микулович Ю.Л., Смирнова Т.Г. и др. Антибактериальное действие липосом, содержащих фосфолипид кардиолипин и фторхинолон левофлоксацин, на *Mycobacterium tuberculosis* с широкой лекарственной устойчивостью. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015;160(11):626–30. [Gaydukevich S.K., Mikulovich Y.L., Smirnova T.G. et al. Antibacterial action of liposomes containing phospholipid cardiolipin and fluoroquinolone levofloxacin on *Mycobacterium tuberculosis* with broad drug-resistant. Bulletin Eksperimentalnoy Biologii i Meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2015;160(11):626–30. (In Russ.)].
60. Lantsova A.V., Borisova L.M., Meerovich G. et al. Analysis of Antitumor Activity of the Liposomal Photosensitizer Lipophthalocyan. Bull Exp Biol Med 2020;168(3):361–5. DOI: 10.1007/s10517-020-04709-9.
61. Shchelkoganov V.A., Alyaseva S.O., Lotosh N.Yu. Lipic acid nanoforms based on phosphatidylcholine: production and characteristics. Eur Biophys J 2020;49(1):95–103. DOI: 10.1007/s00249-019-01415-x.
62. Alekseeva A.A., Moiseeva E.V., Onishchenko N.R. et al. Liposomal formulation of a methotrexate lipophilic prodrug: assessment in tumor cells and mouse T-cell leukemic lymphoma. Int J Nanomedicine 2017;12:3735–49. DOI: 10.2147/IJN.S145516. PMID: 28553111.
63. Tretiakova D.S., Khaidukov S.V., Babayants A.A. et al. Lipophilic Prodrug of Methotrexate in the Membrane of Liposomes Promotes Their Uptake by Human Blood Phagocytes. Acta Naturae 2020;12(1):99–109. DOI: 10.32607/actanaturae.10946. PMID: 32477604.
64. Shprakh Z.S., Yartseva I.V., Ignateva E.V. et al. Synthesis and chemico-pharmaceutical characteristics of somatostatin analog with antitumor activity. Pharmaceut Chem J 2014;3:159–62. DOI: 10.1007/s11094-014-1069-8.
65. Дмитриева М.В., Санарова Е.В., Смирнова Л.И. и др. Средство для лечения гормонозависимых опухолей и способ его получения. Патент № 2703533 С1 от 18.09.2018 г. [Dmitrieva M.V., Sanarova E.V., Smirnova L.I. et al. Agent for treating hormone-dependent tumors and the method of production thereof. RU 2703533 C1 (In Russ.)].
66. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Михайлич Е.И. и др. Перспективность создания лекарственной формы отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина для лечения гормонозависимых опухолей (обзор). Биофармацевтический журнал 2016;8(2):13–8. [Sanarova E.V., Lantsova A.E., Michayevich E.I. et al. The prospect of the creation of a dosage form of domestic analogue of hypothalamic hormone somatostatin in the treatment of hormone-dependent tumors. Biofarmatsevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biopharmaceuticals 2016;8(2):13–8 (In Russ.)].
67. Sanarova E., Lantsova A., Oborotova N. et al. Development of a Liposomal Dosage Form for a New Somatostatin Analogue. Indian J Pharmaceut Sci 2019;81(1):146–9. DOI: 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000490.
68. Mukhamadiyarov R.A., Senokosova E.A., Krutitsky S.S. et al. Size-Dependent Ability of Liposomes to Accumulate in the Ischemic Myocardium and Protect the Heart. J Cardiovasc Pharmacol 2018;72(3):143–52. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000606. PMID: 29927783.
69. Соколова Д.В., Тазина Е.В., Кортава М.А. и др. Анти-CD20 и анти-HLA-DR иммунолипосомальные формы доxorубина: технология получения и антигенспецифичность *in vivo*. Российский биотерапевтический журнал 2010;9(2):90. [Sokolova D.V., Tazina E.V., Kortava M.A. et al. Anti-CD20 and anti-HLA-DR immunoliposomal forms of doxorubicin: production technology and antigen specificity *in vivo*. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2010;9(2):90 (In Russ.)].
70. Eloy J.O., Petrilli R., Trevizan L.N.F., Chorilli M. Immunoliposomes: A review on functionalization strategies and targets for drug delivery. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2017;159:454–67. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.07.085. PMID: 28837895.
71. Хашем А., Матюшин А.А., Райков А.О. и др. Разработка иммунолипосом, нагруженных фотосенсом. Российский биотерапевтический журнал 2016; 15(1):113. [Hashem A., Matyushin A.A., Raikov A.O. et al. Development of immunoliposomes loaded with photosens. Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):113 (In Russ.)].
72. Database of privately and publicly funded clinical studies conducted around the world. Available at: <https://clinicaltrials.gov>.

Вклад авторов

В.С. Горбик, З.С. Шпрах, Ж.М. Козлова, В.Г. Салова: анализ данных литературы, написание текста статьи и ее обсуждение.

Authors' contributions

V.S. Gorbik, Z.S. Shprakh, Zh.M. Kozlova, V.G. Salova: analysis of the literature data, writing the text of the review and its discussion.

ORCID авторов/ORCID of authors

З.С. Шпрах / Z.S. Shprakh: <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>

В.Г. Салова / V.G. Salova: <https://orcid.org/0000-0003-4210-2315>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 13.10.2020. **Принята к публикации:** 24.12.2020.

Article submitted: 13.10.2020. **Accepted for publication:** 24.12.2020.

Диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль у детей: МРТ и молекулярно-генетические характеристики, клинические особенности и исход заболевания. Описание 4 клинических случаев

Э.Ф. Валиахметова^{1,2}, Л.И. Папуша¹, А.В. Артёмов¹, Г.В. Терещенко¹, Е.А. Сальникова¹, Л.А. Ясько¹, А.Е. Друй¹, А.П. Шехтман¹, Г.А. Новичкова¹, А.И. Карачунский¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева» Минздрава России; Россия, 117198 Москва, ул. Саморы Машела, 1;

²ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России; Россия, 125047 Москва, ул. 4-я Тверская Ямская, 16

Контакты: Эндже Фаварисовна Валиахметова andgeval@gmail.com

Введение. Диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль (ДЛГО) является чрезвычайно редким новообразованием, впервые включенным в классификацию Всемирной организации здравоохранения для опухолей центральной нервной системы в 2016 г. При проведении магнитно-резонансной томографии (МРТ) при данной опухоли обычно визуализируется диффузное поражение оболочек центральной нервной системы с накоплением контрастного вещества с наличием множественных контрастнегативных кист небольшого размера, видимых преимущественно в режиме T2. Основным молекулярным маркером ДЛГО является химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF*, мутация в гене *BRAF V600E* встречается реже. **Цель исследования.** Описание манифестации ДЛГО, ее нейровизуализационных и молекулярно-генетических характеристик, опыта применения анти-BRAF и анти-МЕК терапии.

Материалы и методы. В статье описаны 4 случая ДЛГО. Первый пациент с наличием химерного транскрипта *KIAA1549-BRAF* в ткани опухоли получил полный курс химиотерапии (карбоплатин и винкристин) по схеме протокола SIOP-LGG/2004, на протяжении 4 лет после завершения лечения по данным МРТ сохраняется стабилизация заболевания. У 2-го пациента был обнаружен химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF* и назначен траметиниб в 1-й линии терапии, на протяжении 2 лет при контрольных МРТ сохраняется стабилизация заболевания. Третьему пациенту с наличием мутации в гене *BRAF V600E* после прогрессии заболевания на стандартной химиотерапии (карбоплатин и винкристин) по схеме протокола SIOP-LGG/2004 была назначена анти-BRAF терапия препаратом вемурафениб. Через 10 мес лечения при МРТ был зарегистрирован полный ответ, который сохраняется на протяжении приема препарата в течение 2,5 лет. У 4-го пациента не было обнаружено молекулярно-генетических aberrаций, отмечается рефрактерное/прогрессирующее течение заболевания, на сегодняшний день зафиксирована стабилизация заболевания на терапии 4-й линии (эверолимус и темозоломид).

Заключение. Учитывая редкость этой опухоли и отсутствие консенсуса относительно терапии, несмотря на ограниченное число наблюдений, наш опыт позволяет рекомендовать молекулярное тестирование ДЛГО для выявления активирующих событий в гене *BRAF*, а также рассмотрение анти-BRAF/МЕК терапии, если обнаружена либо мутация V600E в гене *BRAF*, либо химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF*.

Ключевые слова: диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль, дети, химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF*, *BRAF V600E*

Для цитирования: Валиахметова Э.Ф., Папуша Л.И., Артёмов А.В. и др. Диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль у детей: МРТ и молекулярно-генетические характеристики, клинические особенности и исход заболевания. Описание 4 клинических случаев. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):42–55.

Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor in children: MR characteristics, clinical features and outcome. Four clinical cases

Andge F. Valiakhmetova^{1,2}, Lyudmila I. Papusha¹, Anton V. Artemov¹, Galina V. Tereshchenko¹, Ekaterina A. Sal'nikova¹, Lyudmila A. Yasko¹, Aleksandr E. Druy¹, Anastasia P. Shekhtman¹, Galina A. Novichkova¹, Aleksandr I. Karachunsky¹

¹D. Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117198, Russia;

²N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of Russia; 16 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow 125047, Russia

Contacts: Andge Favarisovna Valiakhmetova andgeval@gmail.com

Background. Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor (DLGNT) is an extremely rare entity first officially recognized in 2016 WHO classification of tumors of the central nervous system. Magnetic resonance imaging (MRI) of this tumor usually visualizes diffuse meningeal infiltration with contrast enhancement, with the presence of multiple small contrast-negative cysts, visible mainly in the T2 images. The main molecular markers of DLGNTs include the *KIAA1549-BRAF* fusion gene, *BRAF* V600E substitution is less common.

The aim of this work is to describe the manifestation of DLGNT, its neuroimaging and molecular genetic characteristics, and the experience of using anti-BRAF and anti-MEK therapy.

Materials and methods. In this article are described four cases of DLGNT. The first patient with the presence of the *KIAA1549-BRAF* fusion in the tumor tissue received a full course of SIOP-LGG/2004 chemotherapy (carboplatin and vincristine), the stabilization of the disease on the MRI remains for 4 years after completion of treatment. Second patient with *KIAA1549-BRAF* fusion gene in tumour tissue received MEK inhibitor trametinib as first line of treatment with the stabilization of the disease on control MRI which last for 2 years. A third patient with a mutation in the *BRAF* V600E gene. After disease progression on standard chemotherapy (carboplatin and vincristine) according to the SIOP-LGG/2004 protocol, anti-BRAF therapy with vemurafenib was prescribed. After 10 months on MRI a complete response was recorded, which persists during the drug intake for 2.5 years. In the fourth patient, no molecular genetic aberrations were detected; a refractory/progressive course of the disease was noted. To date, the stabilization of the disease is recorded on the fourth line of chemotherapy (everolimus and temozolomide).

Conclusion. Given the rarity of this tumor and the lack of consensus about therapy, despite the limited number of observations, our experience allows us to recommend molecular testing of DLGNT to detect activating events in the *BRAF* gene, as well as consideration of anti-BRAF/MEK therapy if either the *BRAF* V600E mutation is detected or *KIAA1549-BRAF* fusion.

Key words: diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor, children, *KIAA1549-BRAF* fusion, *BRAF* V600E

For citation: Valiakhmetova A.F., Papusha L.I., Artemov A.V. et al. Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor in children: MR characteristics, clinical features and outcome. Four clinical cases. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):42–55. (In Russ.).

Введение

Диффузная лептоменингеальная глионеурональная опухоль (ДЛГО) является редкой опухолью центральной нервной системы (ЦНС), которую включили в классификацию Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) для опухолей ЦНС только в 2016 г. [1]. Большинство ДЛГО представляют собой нейроэпителиальные опухоли низкой степени злокачественности, которые проявляют различные характеристики нейрональной/нейроцитарной и глиальной дифференцировки [2]. Тем не менее в литературе описаны злокачественные варианты ДЛГО [3]. Из-за малого количества клинических случаев с хорошо охарактеризованной нейропатоморфологией степень злокачественности этого новообразования не определена в классификации ВОЗ. Опухоль преиму-

щественно диагностируется у детей, средний возраст на момент постановки диагноза составляет 5 лет, однако есть описания ДЛГО у взрослых в возрасте до 46 лет [4]. Среди пациентов с ДЛГО преобладают мальчики [4]. Магнитно-резонансная (МР) картина новообразования включает: диффузное лептоменингеальное поражение ЦНС, проявляющееся накоплением контрастного вещества (КВ) оболочками ЦНС; небольшие гиперинтенсивные в режиме T2, не накапливающие КВ кисты; иногда выявляется утолщение спинного мозга, интрапаренхимальный компонент в спинном мозге или в головном мозге [5–7]. Патогенез ДЛГО не изучен до конца, тем не менее недавние исследования показали активацию MAPK-сигнального пути в клетках опухоли: было выяснено, что химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF* присутствует

в 75 % случаев ДЛГО [7]. Потеря 1p хромосомы является частой находкой – М.У. Deng и соавт. показали, что она присутствует в 100 % случаев [4], также обнаруживаются и другие генетические аберрации, такие как делеция 1p или коделеция 1p/19q [5]. Мутация в гене *BRAF* V600E является менее распространенной находкой [6], тем не менее может происходить, так же как и другие изменения, ведущие к аномальной передаче сигналов MAPK/ERK, такие как слияния NTRK1/2/3 и TRIM33:RAF1 [4]. На сегодняшний день не существует стандартов терапии ДЛГО. В отечественной

литературе отсутствует описание данного новообразования.

Целью настоящей работы является представление 4 случаев ДЛГО, ее нейровизуализационных и молекулярно-генетических характеристик и опыта применения таргетной терапии.

Описание клинических случаев

Клинические характеристики пациентов представлены в табл. 1, МР-характеристики представлены в табл. 2.

Таблица 1. Клинические сведения о пациентах

Table 1. Clinical data of patients

Параметр Parameter	Пациент 1 Patient 1	Пациент 2 Patient 2	Пациент 3 Patient 3	Пациент 4 Patient 4
Пол Sex	Муж. Male	Муж. Male	Муж. Male	Муж. Male
Возраст на момент постановки диагноза Age at the time of diagnosis	1 год 9 мес 1 year 9 months	2 года 3 мес 2 years 3 months	8 лет 8 years	3 года 3 years
Локализация опухоли Localization of the tumor	Диффузное распространение с интрамедуллярным компонентом Diffuse spread with intramedullary component	Диффузное распространение Diffuse spread	Диффузное распространение Diffuse spread	Диффузное распространение с интрамедуллярным компонентом Diffuse spread with intramedullary component
Гистология Histology	1. Опухолевой ткани не обнаружено 1. No tumor tissue was found 2. ДЛГО 2. DLGNT	ДЛГО DLGNT	ДЛГО DLGNT	1. Пилоидная астроцитома 1. Pilocytic astrocytoma 2. ДЛГО 2. DLGNT
Хирургическое вмешательство Surgery	Биопсия Biopsy	Биопсия Biopsy	Биопсия Biopsy	Частичное удаление Partial resection
1-я линия терапии 1 st line of therapy	Карбоплатин и винкристин Carboplatin and vincristine	Траметиниб 0,032 мг/кг Trametinib 0.032 mg/kg	Карбоплатин и винкристин Carboplatin and vincristine	Карбоплатин и винкристин Carboplatin and vincristine
Противорецидивное лечение Anti-relapse treatment	Нет No	Нет No	Вемурафениб 700 мг/м ² Vemurafenib 700 mg/m ²	Цисплатин и этопозид; бевацизумаб и винбластин; траметиниб; эверолимус и темозоломид Cisplatin and etoposide; bevacizumab and vinblastine; trametinib; everolimus and temozolomide
Аберрация в MAPK-пути Aberration in the MAPK pathway	Слияние <i>KIAA1549-BRAF</i> <i>KIAA1549-BRAF</i> fusion	Слияние <i>KIAA1549-BRAF</i> <i>KIAA1549-BRAF</i> fusion	Мутация в гене <i>BRAF</i> V600E Mutation in the <i>BRAF</i> V600E gene	Не обнаружено Not found
Ответ на лечение Response to treatment	Стабилизация заболевания Stabilization of disease	Стабилизация заболевания Stabilization of disease	Полный ответ Complete response	Рецидивирующее течение Recurrent course

Окончание табл. 1
End of table 1

Параметр Parameter	Пациент 1 Patient 1	Пациент 2 Patient 2	Пациент 3 Patient 3	Пациент 4 Patient 4
Нежелательные эффекты Side effects	Гематологическая токсичность Grade IV по СТСАЕ Hematological toxicity Grade IV according to CTCAE	Кожная токсичность Grade II (паронихия) по СТСАЕ Skin toxicity Grade II (paronychia) according to CTCAE	Гематологическая токсичность Grade IV по СТСАЕ Hematological toxicity Grade IV according to CTCAE Кожная токсичность Grade I (сыпь) по СТСАЕ Skin toxicity (rash) Grade I according to CTCAE	Гиперлипидемия Grade I по СТСАЕ Hyperlipidemia Grade I according to CTCAE Гематологическая токсичность Grade III–IV по СТСАЕ Hematological toxicity Grade III–IV according to CTCAE

Примечание. ДЛГО – диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль.
Note. DLGNT – diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor.

Таблица 2. МР-характеристики пациентов с ДЛГО

Table 2. MR characteristics of patients with DLGNTs

МР-параметр MR parameter	Пациент 1 Patient 1	Пациент 2 Patient 2	Пациент 3 Patient 3	Пациент 4 Patient 4
Диффузное лептоменингеальное поражение в режиме T1 с контрастным усилением Diffuse leptomeningeal lesion at T1 with contrast enhancement	Да Yes	Да Yes	Да Yes	Да Yes
Микрокисты в режиме T2 Microcysts in the T2 mode	Да Yes	Да Yes	Нет No	Да Yes
Интрапаренхимальный компонент в головном мозге Intraparenchymal component in the brain	Нет No	Нет No	Да Yes	Да Yes
Интрапаренхимальный компонент в спинном мозге Intraparenchymal component in the spinal cord	Да Yes	Нет No	Нет No	Да Yes

Примечание. ДЛГО – диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль; МР – магнитно-резонансный.
Note. DLGNT – diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor; MR – magnetic resonance.

Клинический случай 1

Пациент Б. Заболевание манифестировало в возрасте 1 года 9 мес (2013 г.) головными болями, через 2 мес к клинической симптоматике присоединились косоглазие и рвота. Пациент был госпитализирован в инфекционную больницу с подозрением на менингоэнцефалит, получал антимикробную терапию, лечение положительного эффекта не оказало. При компьютерной и магнитно-резонансной томографии (МРТ) выявлены гидроцефалия, признаки венрикулита, арахноидита. Были выполнены тривентрикулостомия и венрикуло-перитонеальное шунтирование (ВПШ), состояние ребенка улучшилось, симптомы внутричерепной гипертензии регрессировали. В структуре спинного мозга при МРТ с контрастным усилением (КУ) на уровне С5–С6 позвонков определяется кистозный участок 18 × 6 мм, с уровня С6 до Тн6 – образования размерами 93 × 15 мм неоднородной структуры,

определяется накопление КВ в терминальном отделе дурального мешка размерами 72 × 12 мм.

В октябре 2014 г. выполнена биопсия образования на уровне L3, но опухолевой ткани в биоптате обнаружено не было. При МРТ ЦНС в феврале 2015 г. до и после КУ в головном мозге определяется накопление КВ по оболочкам с распространением на IV желудочек, в области таламусов слева и справа определяются кистозные изменения вещества головного мозга, в патологически утолщенном спинном мозге от краниоцервикального перехода до поясничного уровня определяется тотальное контрастирование по оболочкам спинного мозга и конскому хвосту (рис. 1, 2).

В марте 2015 г. в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России выполнена повторная биопсия опухоли. Гистологическое заключение с учетом клинических данных после иммуногистохимии: экспрессия глиофибрилярного кислого белка, синапто-

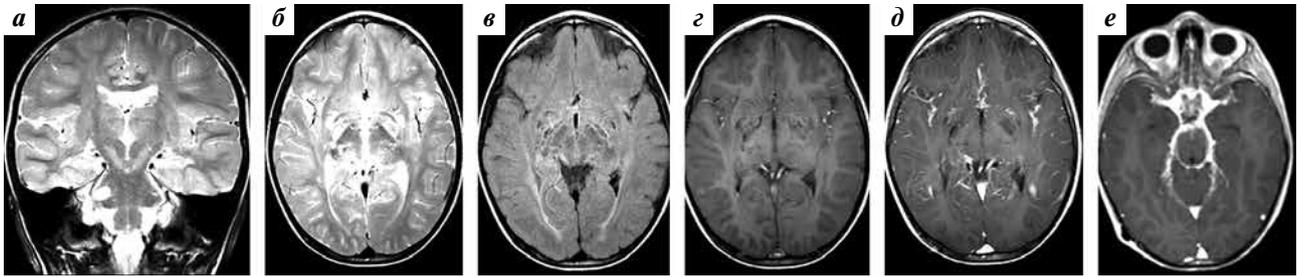


Рис. 1. На серии магнитно-резонансных томограмм головного мозга определяются диффузные мелкокистозные изменения в проекции подкорковых структур, ликворная киста в средней ножке мозжечка справа, а также визуализируется диффузное патологическое накопление парамагнетика по оболочкам мозга, преимущественно в задней черепной ямке и по базальным отделам полушарий мозга; в супраселлярной и ретроселлярной областях – с формированием сплошного массива патологической ткани: а – T2-ВИ в коронарной плоскости; б – T2-ВИ в аксиальной плоскости; в – FLAIR в аксиальной плоскости; з – T1-ВИ в аксиальной плоскости; д, е – T1-ВИ в аксиальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 1. On a series of magnetic resonance imaging of the brain, diffuse small cystic changes in the projection of the subcortical structures, a cerebrospinal fluid cyst in the middle cerebellar pedicle on the right are determined, and a diffuse pathological contrast enhancement is visualized along the membranes of the brain, mainly in the posterior cranial fossa and along the basal parts of the cerebral hemispheres; in the suprasellar and retrosellar regions – with the formation of a continuous array of pathological tissue: a – T2WI in the coronal plane; б – T2WI in the axial plane; в – FLAIR in the axial plane; з – T1WI in the axial plane, д, е – T1WI in the axial plane using contrast



Рис. 2. На серии магнитно-резонансных томограмм позвоночника и спинного мозга на всем протяжении визуализируются выраженные диффузные изменения неоднородного кистозного характера с положительным объемным эффектом, на фоне которых на уровне от межпозвоночного диска C5–C6 до позвонка Th7 сохраняется зона выраженного внутримозгового накопления парамагнетика протяженностью около 11 см. Также определяется выраженное диффузное накопление контрастного вещества по оболочкам спинного мозга и оболочкам корешков конского хвоста на всем протяжении, с практически полным заполнением просвета позвоночного канала на уровне L2–S3: а – T1-ВИ в сагиттальной плоскости; б – T2-ВИ в сагиттальной плоскости; в – T1-ВИ в сагиттальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 2. On a series of magnetic resonance imaging of the spinal cord, pronounced diffuse changes of a heterogeneous cystic nature with a positive volumetric effect are visualized along the entire length, against which, at the level from the intervertebral disc C5–C6 to the vertebra Th7, a zone of pronounced intracerebral accumulation of paramagnetism is about 11 cm long. A pronounced diffuse accumulation of contrast along the meninges of the spinal cord and the meninges of the cauda equina roots is determined throughout, with almost complete filling of the lumen of the spinal canal at the L2–S3 level: a – T1WI in the sagittal plane; б – T2WI in the sagittal plane; в – T1WI in the sagittal plane using contrast

физина, CD56, в большей степени можно говорить об опухоли глиального или глионейронального ряда с повышенным Ki-67 до 6–8 %. Гистопрепараты были пересмотрены в DKFZ (г. Хайделберг, Германия): диссеминированная олигодендроглиомоподобная опухоль мягких мозговых оболочек.

В динамике к клинической симптоматике присоединилась неловкость пальцев рук, пальцы приняли согнутое в покое положение, появились жалобы на нарастание слабости в ногах, периодические боли в спине, купирующиеся самостоятельно. МРТ ЦНС от июня 2015 г. до и после КУ выявила отрицательную

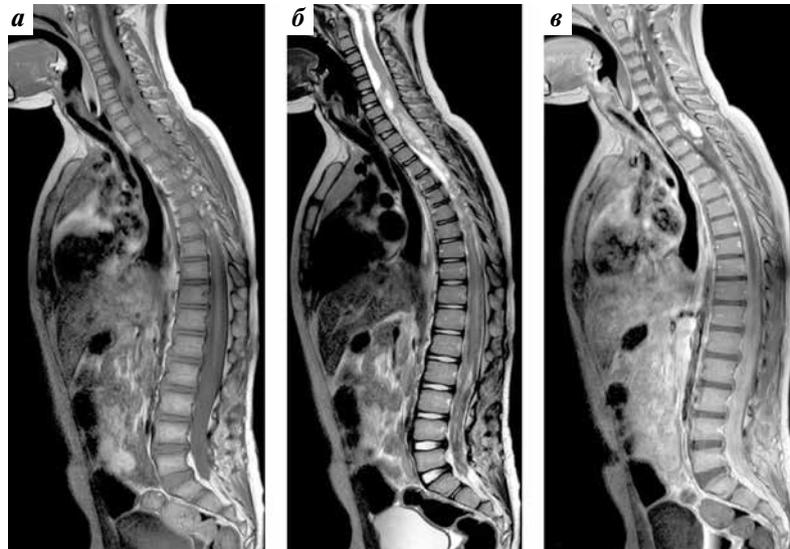


Рис. 3. На серии магнитно-резонансных томограмм позвоночника и спинного мозга сохраняются выраженные изменения в спинном мозге с деформацией его контуров, резким нарушением структуры за счет наличия кистозно-солидного образования на уровне С7–Th4. После контрастного усиления сохраняется неоднородное интенсивное узловое накопление контрастного вещества в пределах образования. Помимо этого, сохраняется выраженное диффузное накопление парамагнетика по оболочкам спинного мозга, оболочкам корешков конского хвоста с практически полным заполнением просвета позвоночного канала на уровне L2–S3: а – T1-ВИ в сагиттальной плоскости; б – T2-ВИ в сагиттальной плоскости; в – T1-ВИ в сагиттальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 3. On a series of magnetic resonance imaging scans of the spinal cord, pronounced changes in the spinal cord with deformation of its contours, a sharp violation of the structure due to the presence of a cystic-solid formation at the C7–Th4 level are preserved. After contrast enhancement, an inhomogeneous intense nodal accumulation of contrast remains within the lesion. In addition, there is a pronounced diffuse accumulation of paramagnet along the meninges of the spinal cord, the meninges of the cauda equina roots with almost complete filling of the lumen of the spinal canal at the L2–S3 level: а – T1WI in the sagittal plane; б – T2WI in the sagittal plane; в – T1WI in the sagittal plane using contrast

динамику: по оболочкам мозжечка, ствола и вдоль медиальных отделов лобных и височных долей, а также в проекции базальных цистернальных пространств определяются зоны гиперинтенсивного МР-сигнала (FLAIR), при внутривенном контрастировании интенсивно накапливающие парамагнетик. В спинном мозге имеются выраженные кистозные изменения, на фоне которых на уровне С4–Th5 позвонков определяется образование, неоднородно накапливающее парамагнетик.

С июня 2015 по май 2016 г. в полном объеме проведена двухкомпонентная паллиативная химиотерапия (ПХТ) (карбоплатин и винкристин) по схеме протокола SIOP-LGG/2004. По данным контрольной МРТ ЦНС по завершении специализированного лечения до и после КУ зарегистрирована стабилизация заболевания (С3). Клинически на фоне лечения сохранялись: смешанный тетрапарез, преимущественно нижних конечностей, вплоть до пlegии в стопах; проявления лекарственной полинейропатии, атактического синдрома, миоклонии; эмоциональное лабильное расстройство.

В 2016 г. проведен повторный пересмотр гистопрепаратов с добавлением молекулярно-генетического исследования ткани опухоли в DKFZ (г. Хайдельберг, Германия): выставлен диагноз ДЛГО, выявлены коделеция *1p/19q* и химерный транскрипт *K1AA1549-BRAF*.

С мая 2016 г. по сегодняшний день по данным МРТ в динамике сохраняется С3 (рис. 3 соответствует

МРТ-исследованию от декабря 2020 г.). Клинически сохраняются проявления тяжелого неврологического дефицита в виде смешанного тетрапареза, преимущественно нижних конечностей, вплоть до пlegии в стопах; выраженное эмоциональное лабильное расстройство.

Клинический случай 2

Пациент П. Заболевание манифестировало в возрасте 2 лет 3 мес (декабрь 2016 г.) с атаксии и рвоты. При МРТ ЦНС в январе 2017 г. отмечается диффузное накопление контраста по оболочкам головного и спинного мозга и субарахноидальным пространствам, гидроцефалия. Из-за подозрения на бактериальный менингит по месту жительства в течение 1,5 мес проводилась антибактериальная терапия без клинического улучшения. Далее были выполнены последовательно 2 операции (тривентрикулостомия и ВПШ), состояние после операций улучшилось, симптомы внутричерепной гипертензии регрессировали, после чего по месту жительства было рекомендовано динамическое наблюдение.

В ноябре 2017 г. появились аксиальные спазмы, в связи с чем был назначен препарат вальпроевой кислоты. По данным МРТ ЦНС в ноябре 2017 г. отмечается отрицательная динамика: по ходу мозговых оболочек визуализируются мелкокистозные изменения, распространяющиеся вглубь серого вещества, а также в сторону субарахноидального пространства, заполняя

все цистерны, заходя в мелкие борозды коры большого мозга и мозжечка, поражая мозолистое тело, ножки мозга, ствол мозга (рис. 4). Контуры ствола и ножек мозга нечеткие, неровные. После внутривенного контрастирования отмечается патологическое накопление КВ оболочками головного мозга в задней и средней черепной ямках, височных долей с обеих сторон, базальных отделов лобных долей, по ходу передних и средних отделов межполушарной щели. Мозговые оболочки утолщены. Визуализируется накопление контрастного препарата единичными кистозными очагами, максимальный размер до 6×5 мм, на уровне большого затылочного отверстия. Срединные структуры не смещены. В базальных ганглиях визуализируются расширенные периваскулярные пространства, мелкие кисты. Структура спинного мозга неоднородная на всем протяжении за счет множественных жидкостных включений различных размеров с фокусом накопления КВ в стенке на уровне Th12, также имеется деформация дурального мешка из-за выраженного утолщения оболочек спинного мозга в позвоночном канале с выраженным патологическим накоплением КВ и определяется патологическое очаговое накопление КВ в веществе спинного мозга на уровне Th8–Th9, Th9–Th10 до 3 мм.

В феврале 2018 г. в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России проведена открытая биопсия опухоли из нижних отделов спинального субарахноидального пространства (уровень L5). Гистологическое заключение: *in situ*-биопсии фрагменты фиброзной ткани с участками опухоли, состоящей из мноморфных круглых клеток с круглыми ядрами, без признаков малигнизации. Дополнительный материал представлен мелкими фрагментами с разрастанием фиброзной ткани с включенными нервными волокнами. Иммуногистохимическое исследование: положительная

экспрессия S-100, слабopоложительная экспрессия синаптофизина, фоновая экспрессия CD56. Отрицательная экспрессия глиофибриллярного кислого белка, EMA, HMB45, MelA, NSE, CD45. Тотальная ядерная экспрессия INI1. Индекс пролиферации Ki-67 низкий. Заключение: ДЛГО без признаков малигнизации. В ткани опухоли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскриптазой был обнаружен химерный транскрипт KIAA1549-BRAF (экзоны 15–9).

С учетом возраста пациента, обширного распространения опухоли с поражением как головного, так и спинного мозга, отсутствия эффективных стандартных опций терапии, наличия химерного транскрипта KIAA1549-BRAF в ткани опухоли консиллиумом было принято решение о назначении MEK-ингибитора траметиниба в 1-й линии лечения. С мая 2018 г. ребенок ежедневно перорально получает траметиниб в дозе 0,032 мг/кг/сут (0,5 мг/сут). На протяжении всего периода лечения сохраняется СЗ. Помимо редких головных болей, головокружений и паронихии II степени, пациента ничего не беспокоило, он посещал детский сад весь период лечения.

Клинический случай 3

Пациент Е. Заболевание манифестировало в возрасте 8 лет (сентябрь 2016 г.) с приступов замирания длительностью несколько секунд. Первоначально приступы происходили 2–3 раза в неделю. К началу февраля 2017 г. приступы стали ежедневными, повторяясь 3–4 раза в сутки, что послужило поводом для выполнения МРТ головного мозга, на которой было выявлено диффузное накопление КВ по оболочкам головного мозга. После этого по месту жительства была назначена противоэпилептическая терапия (финлепсин ретард и топирамат). С марта 2017 г. к клинической симптоматике присоединились ежедневная утренняя рвота,

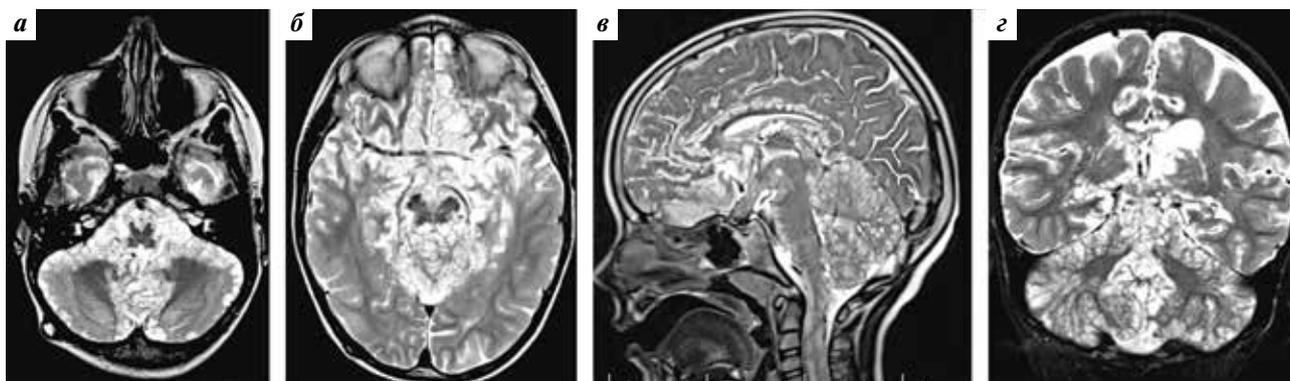


Рис. 4. На аксиальных срезах (а, б) в режиме T2 визуализируются мелкокистозные изменения по ходу мозговых оболочек, распространяющиеся вглубь серого вещества, а также в сторону субарахноидального пространства, заполняя все цистерны, заходя в мелкие борозды коры большого мозга и мозжечка. На сагитальных и коронарных срезах (в, з) в режиме T2 визуализируются мелкокистозные изменения, поражающие мозолистое тело, ножки мозга, ствол мозга, шейный отдел спинного мозга

Fig. 4. On axial images (a, b) in the T2 mode, small cystic changes are visualized along the meninges, extending deep into the gray matter, as well as towards the subarachnoid space, filling all the cisterns, entering the small sulcus of the cerebral cortex and cerebellum. Small cystic changes affecting the corpus callosum, cerebral peduncle, brain stem, cervical spinal cord are visualized on sagittal and coronary images (v, z) in T2

с июля 2017 г. — ежедневная головная боль, с начала ноября 2017 г. — быстрое снижение остроты зрения; с февраля 2017 г. похудел на 5 кг.

При поступлении в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России в конце ноября 2017 г. в клинической симптоматике преобладал синдром выраженной внутричерепной гипертензии. Последовательно были проведены операция ВПШ (после чего регрессировали головные боли, тошнота, рвота, улучшилась острота зрения) и биопсия опухоли из правой височной области. При МРТ ЦНС в ноябре 2017 г. на фоне послеоперационных изменений в правой височной области после введения КВ визуализируется его накопление по медиальному контуру в области операции с распространением в хиазму, в области кавернозных синусов с обеих сторон и по оболочкам, преимущественно синиевой щели справа, также визуализируется накопление по оболочкам в области мозжечка, больших полушарий головного мозга, ствола мозга, ножек мозга,

хиазмы, перивентрикулярно боковыми желудочками. В спинном мозге отмечается выраженное утолщение оболочек с выраженным патологическим накоплением КВ. Гистологическое заключение: фрагменты мозговой ткани, в которой отмечается диффузное распространение полиморфноклеточной опухоли с большим количеством ганглиозных клеток, наличием эозинофильных телец. Заключение: ДЛГО (рис. 5).

С декабря 2017 по март 2018 г. была проведена индуктивная фаза ПХТ по схеме протокола SIOP-LGG/2004 (карбоплатин и винкристин). При МРТ всех отделов ЦНС в марте 2018 г. отмечалась отрицательная динамика по сравнению с МРТ от ноября 2017 г. в виде увеличения размеров и количества опухолевых очагов. При молекулярно-генетическом исследовании в гене BRAF была обнаружена замена с.1799 T>A (V600E). Учитывая отрицательную динамику по данным МРТ (рис. 6) после химиотерапии (ХТ) 1-й линии, обширное распространение опухоли с поражением как головного,



Рис. 5. В субарахноидальном пространстве определяется ткань опухоли, четко отграниченная от прилегающей глиальной ткани (H&E, $\times 50$) (а). Ткань опухоли сформирована клетками вытянутой формы, с умеренно выраженным клеточным полиморфизмом. Клетки содержат обильную эозинофильную цитоплазму и округлые ядра с глыбчатым хроматином. Митотическая активность не определяется (H&E, $\times 400$) (б). Иммуногистохимическое (ИГХ) исследование с anti-synaptophysin, $\times 100$. В клетках опухоли выявлена экспрессия synaptophysin (в). ИГХ-исследование с anti-NF, $\times 200$. Часть неопластических элементов экспрессирует NF (г). ИГХ-исследование с Ki-67, $\times 50$. Проллиферативная активность низкая, до 3 % (д)

Fig. 5. Normal brain tissue with well demarcated subarachnoid tumor mass (H&E, $\times 50$) (a). Tumor cells are pleomorphic, vary in shape and size, with abundant eosinophilic cytoplasm. Neoplastic cells contain round or ovoid nuclei with salt-pepper chromatin. Mitotic figures are absent (H&E, $\times 400$) (b). Immunohistochemistry (IHC) study with anti-synaptophysin, $\times 100$. Tumor cells show strongly positive expression of synaptophysin (в). IHC study with anti-NF, $\times 200$. Some of neoplastic elements exhibit NF-positivity (г). IHC study with Ki-67, $\times 50$. According to Ki-67 proliferative activity is low about 3 % (д)

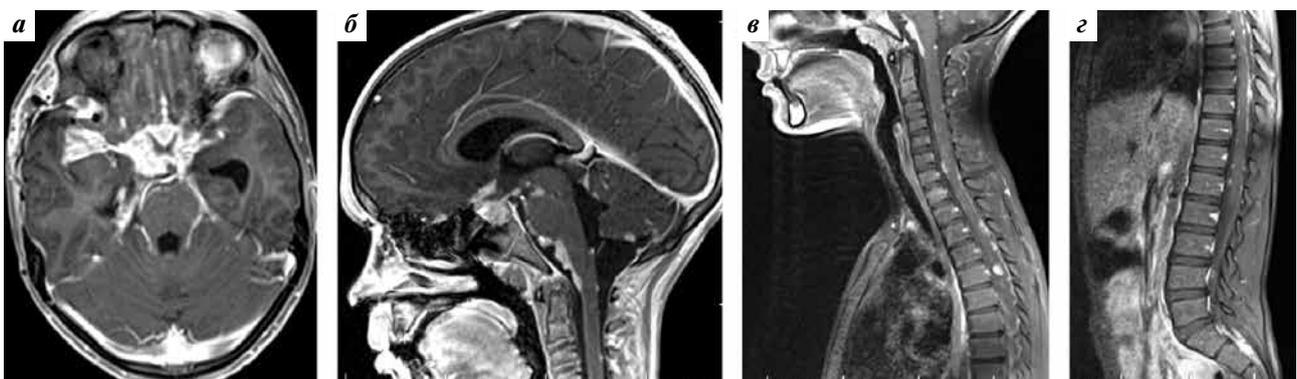


Рис. 6. На серии магнитно-резонансных томограмм головного и спинного мозга с контрастным усилением до анти-BRAF терапии визуализируется выраженное диффузное накопление парамагнетика по оболочкам головного и спинного мозга: а, б — T1-ВИ головного мозга в аксиальной и сагиттальной плоскости с применением контрастного вещества; в, г — T1-ВИ спинного мозга в сагиттальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 6. On a series of magnetic resonance imaging with contrast of the brain and spinal cord before anti-BRAF therapy, a pronounced diffuse accumulation of paramagnet in the meninges of the brain and spinal cord is visualized: а, б — T1WI of the brain in the axial and sagittal planes using contrast; в, г — T1WI of the spinal cord in the sagittal plane using contrast

так и спинного мозга, наличие мутации V600E в гене BRAF в ткани опухоли, консилиумом было принято решение о назначении анти-BRAF терапии препаратом вемурафениб в дозе 700 мг/м² (720 мг/сут). С мая 2018 г. в течение 2 лет ребенок получал вемурафениб. На МРТ, проведенной через 8 мес после начала таргетной терапии (рис. 7), был зафиксирован полный ответ, который сохраняется по сегодняшний день. Ребенок переносил лечение удовлетворительно, единственным нежелательным явлением была кожная токсичность I степени (сыпь на запястьях). На протяжении всего периода лечения эпилептических припадков не повторялось. Мальчик посещал общеобразовательную школу в течение всего периода терапии.

Клинический случай 4

Пациент Л. Заболевание манифестировало в возрасте 3 лет (ноябрь 2013 г.) с жалоб на головные боли, боли в шее, рвоту. При МРТ ЦНС в январе 2014 г. до и после КУ выявлена интрамедуллярная опухоль на уровне С2–С3 позвонков, диссеминация по субарахноидальным пространствам в головной и спинной мозг (хиазмальные и охватывающие цистерны, по вентральному контуру ствола и крыше IV желудочка). При исследовании спинного мозга отмечалось его утолщение на уровне С2–С3 и интрамедуллярные изменения на уровне С2–С3 без накопления КВ. При КУ отмечалось контрастирование по оболочкам в шейном, грудном отделах спинного мозга и мелкие участки в корешках конского хвоста.

В январе 2014 г. в ФГАУ «НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко» Минздрава России выполнено частичное удаление объемного образования на уровне С2–С3. Гистологическое заключение: пилоидная астроцитома с фокальным повышением Ki-67 до 8%. В феврале 2014 г. выполнена операция ВПШ. При МРТ ЦНС в феврале 2014 г. по сравнению с МР-исследованием от января 2014 г. отрицательной динамики не выявлено.

С марта 2014 по февраль 2015 г. получал ПХТ по схеме протокола SIOP-LGG/2004 (карбоплатин и винкристин). МРТ ЦНС в марте 2015 г.: С3. С марта по июль 2015 г. получал монокимиотерапию препаратом винбластин (до 52-й недели включительно) из-за аллергической реакции на карбоплатин. Наблюдался ортопедами в связи с нестабильностью шейного отдела позвоночника на уровне С2–С3.

С июля 2015 по февраль 2016 г. находился на динамическом наблюдении. При МРТ ЦНС от ноября 2015 г. до и после КУ отмечаются: увеличение площади множественных небольших кистозных очагов поражения в базальной цистерне вокруг ножки мозга латерально; увеличение размера очага поражения дорзально преддверно-улиткового нерва справа; увеличение площади поражения латерально IV желудочка мозга; увеличение площади поражения вокруг перекреста зрительных нервов, во внутривентрикулярной цистерне в медиальном отделе височной доли кортикально, а также внутри желудочка в задних рогах бокового желудочка головного мозга (рис. 8), а также в височных рогах, как и на высоте С3 и С2 интраспинально. При КУ отмечается постоянно возрастающее неравномерное контрастирование твердой мозговой оболочки с очагом поражения на уровне тела поясничного позвонка L1, заполняющим весь позвоночный канал. Обнаружено незначительное увеличение размеров множественных внутрижелудочковых очагов поражения.

Дважды выполнялась позитронная-эмиссионная томография головного и спинного мозга с ¹¹C-метионином, признаков метаболически активной опухолевой ткани обнаружено не было.

С февраля по декабрь 2016 г. получил 10 циклов ПХТ по схеме: цисплатин и этопозид в 1–3-й дни каждого 28-дневного цикла. При МРТ ЦНС в динамике отмечалась С3. С января 2017 г. находился на динамическом наблюдении.

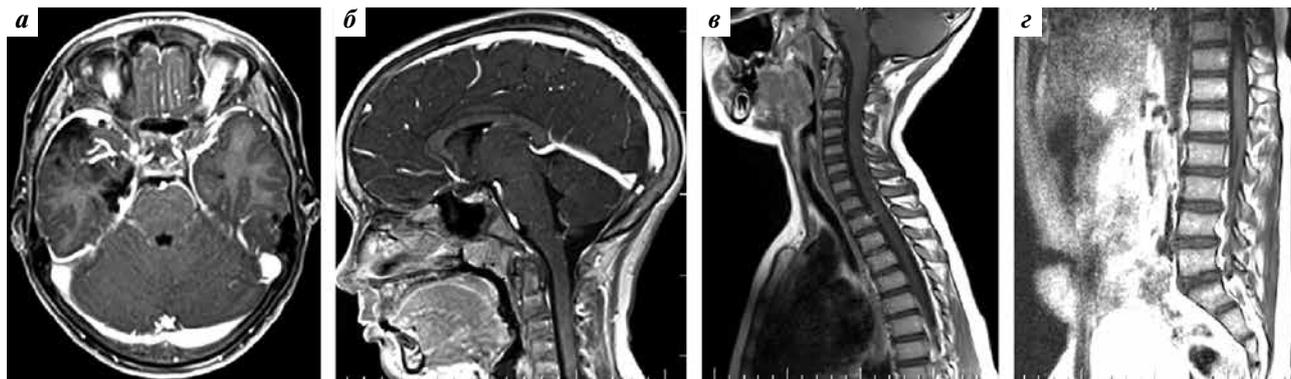


Рис. 7. На серии магнитно-резонансных томограмм головного и спинного мозга с контрастным усилением во время проведения анти-BRAF терапии отмечается регресс опухолевых очагов: а, б – T1-ВИ головного мозга в аксиальной и сагиттальной плоскости с применением контрастного вещества; в, г – T1-ВИ спинного мозга в сагиттальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 7. On a series of magnetic resonance imaging with contrast of the brain and spinal cord during anti-BRAF therapy, regression of tumor foci is noted: а, б – T1WI of the brain in the axial and sagittal planes using contrast; в, г – T1WI of the spinal cord in the sagittal plane using contrast

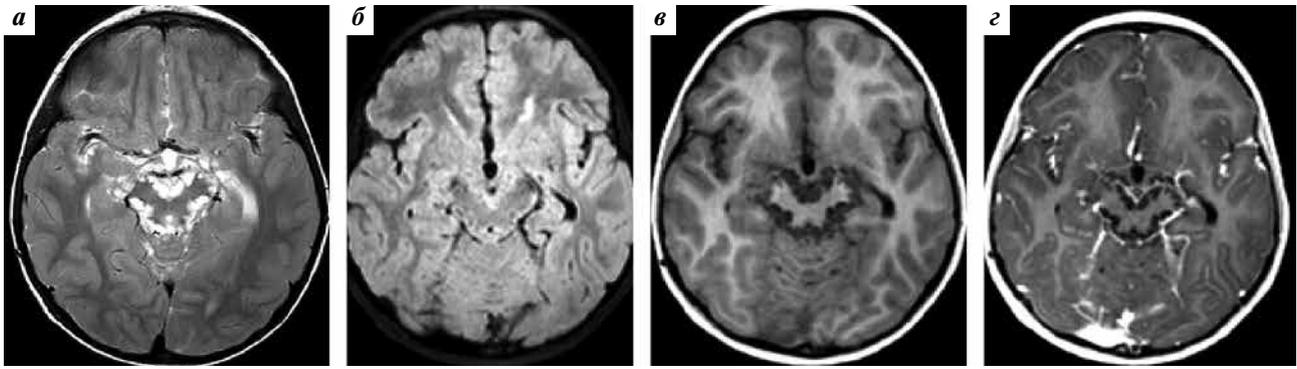


Рис. 8. На серии магнитно-резонансных томограмм визуализируются множественные ликворокистозные участки перивентрикулярно и в области базальных ликворных цистерн вокруг ножек мозга (с умеренной их атрофией) и мозжечка без признаков накопления парамагнетика: а – T2-ВИ в аксиальной плоскости; б – FLAIR в аксиальной плоскости; в – T1-ВИ в аксиальной плоскости; з – T1-ВИ в аксиальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 8. On a series of magnetic resonance imaging multiple cerebrospinal fluid cystic areas are visualized periventricularly and in the area of the basal cisterns around the cerebral peduncles (with moderate atrophy) and cerebellum without signs of contrast accumulation: а – T2WI in the axial plane; б – FLAIR in the axial plane; в – T1WI in the axial plane; з – T1WI in the axial plane using contrast

При МРТ ЦНС до и после КУ в июле 2019 г. отмечается отрицательная динамика в виде появления новых очагов и увеличения накопления КВ по оболочкам головного мозга (рис. 9), увеличения размера очага в спинном мозге.

При позитронной-эмиссионной/компьютерной томографии головного мозга с ^{11}C -метионином в июле 2019 г. выявлена отрицательная динамика поражения церебральных структур в виде появления множества очагов гиперфиксации радиофармацевтического препарата (индекс накопления от 1,4 до 2,26), связанных с оболочками.

В августе 2019 г. проведена операция: удаление опухоли полюса правой височной доли. Гистологическое заключение: морфологическая картина в большей степени соответствует ДЛГО.

С конца августа по ноябрь 2019 г. проводилась терапия препаратами бевацизумаб и винбластин.

При МРТ ЦНС в декабре 2019 г. выявлена минимальная отрицательная динамика.

При молекулярно-генетическом исследовании мутаций в гене BRAF и 3 наиболее часто встречающихся химерных транскриптов KIAA1549-BRAF обнаружено не было. Тем не менее, учитывая высокую частоту встречаемости (до 75 %) химерного транскрипта KIAA1549-BRAF, консиллиумом было принято решение о попытке проведения анти-МЕК терапии препаратом траметиниб.

С середины декабря 2019 г. была начата терапия траметинибом в дозе 0,025 мг/кг/сут (1 мг/сут), однако при 1-й контрольной МРТ была визуализирована прогрессия заболевания. Учитывая гистологический диагноз, возраст пациента, объем проведенного ранее лечения, прогрессирование болезни на предшествующих линиях ПХТ, распространенность патологического процесса

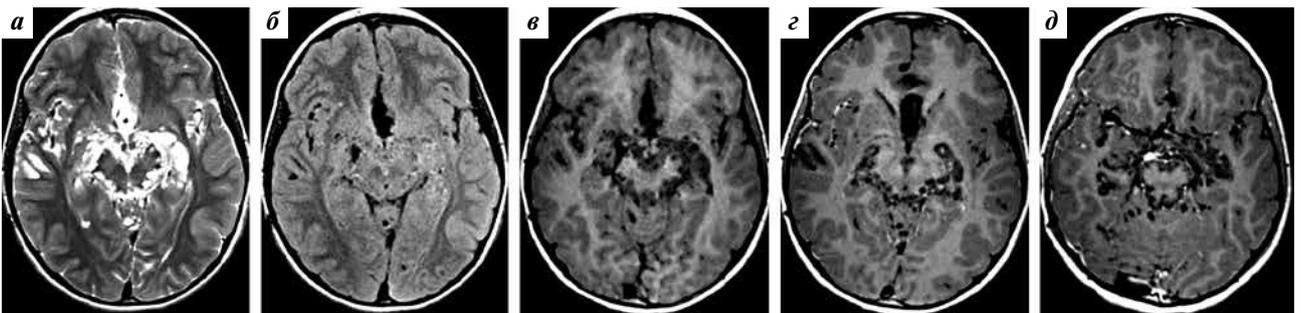


Рис. 9. На серии магнитно-резонансных томограмм отмечается диффузное поражение мягких мозговых оболочек супра- и инфратенториальных структур и эпендимы желудочков множественными кистозно-солидными узловыми образованиями, преимущественно по медиальным отделам височной доли слева, по ходу передних отделов серпа мозга с появлением участков контрастирования в данных областях: а – T2-ВИ в аксиальной плоскости; б – FLAIR в аксиальной плоскости; в – T1-ВИ в аксиальной плоскости; з, д – T1-ВИ в аксиальной плоскости с применением контрастного вещества

Fig. 9. A series of magnetic resonance imaging shows a diffuse lesion of the pia mater of the supra- and infratentorial structures and ventricular ependyma by multiple cystic-solid nodules, mainly along the medial temporal lobe on the left, along the anterior sections of the falx cerebri with the appearance of contrast enhancement in this areas: а – T2WI in the axial plane; б – FLAIR in the axial plane; в – T1WI in the axial plane; з, д – T1WI in the axial plane using contrast

и предполагаемую в связи с этим высокую токсичность лучевой терапии (ЛТ), на основании анализа данных литературы о лечении пациентов с аналогичным диагнозом, а также учитывая фокально повышенный до 30 % индекс пролиферативной активности Ki-67, т.е. предполагая высокий пролиферативный потенциал опухоли, консилиумом принято решение о проведении ПХТ 4-й линии в составе Эверолимуса 5 мг/м²/сут (разовая доза 5 мг/сут) перорально и Темозоломида (150 мг/м²/сут (разовая доза 150 мг/сут) в 1-м цикле, перорально 1–5-й дни, далее – перерыв до 28-го дня; при удовлетворительной переносимости 1-го цикла – увеличение дозы Темозоломида до 200 мг/м²/сут, начиная со 2-го цикла терапии). Терапию 4-й линии получает в течение 20 нед, при МРТ зафиксирована СЗ. Из нежелательных явлений отмечается гиперлипидемия Grade I по СТСАЕ, рекомендована диета.

Обсуждение

Диффузная лептоменингеальная глионейрональная опухоль является редчайшей опухолью ЦНС без установленной степени злокачественности. Со времени 1-й статьи, опубликованной D.J. K. Beck и D.S. Russell в 1942 г., в научной литературе описано всего 115 случаев, которые бы соответствовали диагностическим критериям ДЛГО [5, 6, 8–13]. Ранее ее описывали такими синонимами, как диссеминированное олигодендроглиомоподобное лептоменингеальное новообразование или первичный лептоменингеальный олигодендроглиоматоз [5, 7, 9].

Как правило, ДЛГО манифестирует незаметно, головной болью, далее могут присоединиться симптомы внутричерепной гипертензии, пароксизмальная симптоматика. Грубый неврологический дефицит встречается редко, несмотря на массивную инфильтрацию мозговых оболочек опухолевыми клетками и иногда наличие интрапаренхиматозного компонента в спинном и/или головном мозге [2, 6, 10]. Клинические симптомы на момент постановки диагноза у представленных выше пациентов включали головную боль, рвоту, пароксизмальную симптоматику наряду с диффузной инфильтрацией мозговых оболочек по данным нейровизуализации, что согласуется с данными литературы [5, 6, 10]. Из-за неспецифических клинических проявлений и неспецифических МР-характеристик медленно прогрессирующую ДЛГО можно спутать с менингитом/менингоэнцефалитом, как это произошло у первых 2 наших пациентов. Случаи, когда ДЛГО мимикрировала под менингит, также описаны в зарубежной литературе [13].

Наиболее типичным проявлением ДЛГО на МР-томограммах является диффузное поражение арахноидальных оболочек спинного мозга и корешков конского хвоста, а также оболочек головного мозга – чаще в наружных ликворных пространствах (преимущественно в задней черепной ямке, в области ствола мозга

и по базальным поверхностям полушарий мозга), реже в желудочковой системе. При этом отмечается интенсивное, диффузное, патологическое накопление КВ, иногда с формированием видимого солидного компонента (в том числе с заполнением дурального мешка на уровне корешков конского хвоста). Данные изменения присутствуют почти у всех пациентов с ДЛГО (по данным литературы, отсутствуют у единичных пациентов) [5], однако их нельзя достоверно отличить на МР-томограммах от проявлений лептоменингита. Часто у пациентов с ДЛГО по оболочкам определяются множественные, преимущественно небольшие, не накапливающие КВ кисты, реже – небольшие солидные узлы [6]. Иногда определяется интрапаренхимальный компонент – чаще в спинном мозге, реже в головном мозге. Интрапаренхимальный компонент может быть как контраст-позитивным (чаще), так и контрастнегативным [14]. Нередко при МРТ головного мозга определяется внутренняя гидроцефалия (как осложнение поражения оболочек желудочковой системы, вызывающее затруднение оттока ликвора из нее) [11].

В целом при ДЛГО МРТ ЦНС в типичных случаях позволяет выявить распространенное поражение спинальных и интракраниальных мозговых оболочек, множественные кисты, иногда – с наличием интрапаренхимального компонента в веществе спинного или головного мозга. Данная картина дает возможность предположить наличие опухолевого поражения ЦНС (но в большинстве случаев не позволяет однозначно дифференцировать от менингита) и выбрать оптимальную область для проведения биопсии. Также МРТ незаменима для контроля динамики и определения эффективности проводимого лечения.

Биопсия имеет решающее значение, если подозревается опухолевое происхождение лептоменингеальной инфильтрации. До включения ДЛГО в классификацию ВОЗ при обнаружении данного новообразования морфологи выставляли диагноз: диссеминированная олигодендроглиомоподобная опухоль мягких мозговых оболочек (как это было у нашего 1-го пациента), пилоидная астроцитома (как у нашего 4-го пациента) или глиома низкой степени злокачественности (ГНСЗ) без дополнительных уточнений.

Также обязательно выполнение молекулярно-генетического анализа для выявления специфических aberrаций, которые могут как подтвердить диагноз, так и обеспечить дополнительные варианты лечения. Наиболее распространенные молекулярные находки при ДЛГО – активирующие события в гене *BRAF*. Генетическая перестройка, приводящая к образованию химерного транскрипта *KIAA1549-BRAF*, встречается в 75 % случаев, в то время как аминокислотная замена в гене *BRAF* V600E является менее распространенной

находкой [6, 7]. У 2 наших пациентов был обнаружен химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF*, у 1 – мутация V600E в гене *BRAF*.

Стандартных терапевтических опций для детей с ДЛГО не существует. Для лечения проводят как ХТ, так и ЛТ. Обширное распространение опухоли по оболочкам ЦНС требует краниоспинального облучения, однако для контроля глионейрональной опухоли необходимы большие дозы ЛТ, что может привести к тяжелым отдаленными последствиями, учитывая, что средний возраст на момент постановки диагноза ДЛГО составляет 5 лет [15]. D. Aguilera и соавт. описали клиническое улучшение у 6 детей с ДЛГО, получавших ХТ с карбоплатином и винкристином. Однако авторы отметили, что по данным нейровизуализации не было зарегистрировано ни полного, ни частичного ответа, у всех пациентов была СЗ, медиана длительности ответа составила 20 мес [8]. В большинстве работ на сегодняшний день описано лечение стандартными схемами ХТ для ГНСЗ с достижением малого частичного ответа или СЗ [8, 12, 16]. Несмотря на то что большинство ДЛГО – это ГНСЗ, таким пациентам обычно требуется проведение нескольких линий ХТ в течение жизни [8, 12].

Следует отметить, что на сегодняшний день не зарегистрировано достижения ни большого частично, ни полного ответа на ХТ у пациентов с ДЛГО по данным МРТ [6, 8, 12, 15]. У нашего 1-го пациента сохраняется СЗ на фоне 1-й линии ХТ карбоплатином и винкристином, у 3-го пациента развилась прогрессия заболевания после индукционной фазы вышеуказанной ХТ, а 4-й пациент получил несколько линий ХТ из-за неоднократной прогрессии заболевания.

В последнее десятилетие терапия ГНСЗ у детей была коренным образом изменена благодаря успешному включению BRAF- и MEK-ингибиторов в схемы лечения [17–21]. F. Del Bufalo и соавт. описали успешный опыт применения вемурафениба у 7 детей с ГНСЗ с мутацией *BRAF*V600E. Полный ответ был зарегистрирован у 1 ребенка, у 3 задокументирован частичный ответ [16]. C. Miller и соавт. описали 2 пациентов с неоперабельными химиорезистентными пилоидными астроцитомами, достигших большого частичного ответа на терапию траметинибом [19]. Из 6 детей с рефрактерными пилоидными астроцитомами, описанными M. Kondyli и соавт., у 5 был обнаружен химерный транскрипт

KIAA1549-BRAF и зафиксирован полный/частичный ответ на лечение траметинибом [17]. В I/II фазе клинического исследования применения траметиниба у детей с ГНСЗ с наличием химерного транскрипта *KIAA1549-BRAF* 4 из 23 детей достигли частичного ответа, 14 – СЗ на момент публикации работы [22].

Насколько нам известно, мы представляем первый успешный опыт таргетной терапии ДЛГО. Более того, первый случай полной регрессии ДЛГО во время проведения терапии. Следует отметить, что наши пациенты хорошо переносили таргетную терапию. Единственным нежелательным эффектом лечения была кожная токсичность I–II степени. В I фазе клинического исследования вемурафениба у 19 детей с рецидивирующими/рефрактерными ГНСЗ токсичность III–IV степени включала: вторичную кератоакантому – у 1 пациента; сыпь – у 16; гипонатриемию – у 1; повышение уровня печеночных ферментов – у 4; лихорадку – у 5 пациентов [21]. Использование MEK-ингибиторов у детей с ГНСЗ в I фазе клинического исследования было связано с кожной и желудочно-кишечной токсичностью, а также, редко, с кардиомиопатией и ангиомиопатией сетчатки [22]. Отдаленные последствия таргетной терапии, особенно с учетом решающей роли пути RAS-MAPK в нормальном развитии ЦНС, требуют тщательного наблюдения и изучения.

Заключение

Клиницисты должны знать о чрезвычайно редком новообразовании – ДЛГО и задумываться о проведении биопсии при обнаружении на МР-томограмме интенсивного диффузного патологического накопления КВ и множественных небольших кист по оболочкам ЦНС.

Учитывая редкость этой опухоли и отсутствие консенсуса относительно терапии, несмотря на ограниченное количество наблюдений, наш опыт позволяет рекомендовать молекулярное тестирование ДЛГО для выявления активирующих событий в гене *BRAF*, а также рассмотрение анти-BRAF/MEK терапии, если обнаружена либо мутация V600E в гене *BRAF*, либо химерный транскрипт *KIAA1549-BRAF*. Необходимы дальнейшие исследования для улучшения терапии этих пациентов и понимания биологии ДЛГО.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Louis D.N., Perry A., Reifenberger G. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol* 2016;131(6):1–18. DOI: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- Reifenberger G., Rodriguez F., Burger P.C. et al. Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour. In: Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K. eds. *World Health Organization classification of tumours of the central nervous system*. 4th ed. Lyon: IARC, 2016. Pp. 152–155.
- Schweteye K.E., Kansagra A., Mceachern J. et al. Unusual high-grade features in pediatric diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor: comparison with a typical low-grade example. *Hum Pathol* 2017;(70):105–12. DOI: 10.1016/j.humpath.2017.06.004.
- Deng M.Y., Sill M., Chiang J. et al. Molecularly defined diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor (DLGNT) comprises two subgroups with distinct clinical and genetic features. *Acta Neuropathol* 2018;2(136):239–53. DOI: 10.1007/s00401-018-1865-4.
- Rodriguez F.J., Perry A., Rosenblum M.K. et al. Disseminated oligodendroglial-like leptomeningeal tumor of childhood: A distinctive clinicopathologic entity. *Acta Neuropathol* 2012;124(5):627–41. DOI: 10.1007/s00401-012-1037-x.
- Dodgshun A.J., SantaCruz N., Hwang J. et al. Disseminated glioneuronal tumors occurring in childhood: treatment outcomes and BRAF alterations including V600E mutation. *J Neurooncol* 2016;128(2):293–302. DOI: 10.1007/s11060-016-2109-x.
- Rodriguez F.J., Schniederjan M.J., Nicolaides T. et al. High rate of concurrent *BRAF-KIAA1549* gene fusion and 1p deletion in disseminated oligodendroglioma-like leptomeningeal neoplasms (DOLN). *Acta Neuropathol* 2015;2(129):609–10. DOI: 10.1007/s00401-015-1400-9.
- Aguilera D., Castellino R.C., Janss A. et al. Clinical responses of patients with diffuse leptomeningeal glioneuronal tumors to chemotherapy. *Child's Nerv Syst* 2017;2(34):329–34. DOI: 10.1007/s00381-017-3584-x.
- Beck D.J.K., Russell D.S. Oligodendrogliomatosis of the cerebrospinal pathway. *Brain* 1942;65(4):352–72.
- Schniederjan M.J., Alghamdi S., Castellano-Sanchez A. et al. Diffuse Leptomeningeal Neuroepithelial Tumor 9 Pediatric Cases With Chromosome 1p/19q Deletion Status and IDH1 (R132H) Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2013;37(5):763–71. DOI: 10.1097/PAS.0b013e31827bf4cc.
- Chen W., Kong Z., Fu J. et al. Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour (DLGNT) with hydrocephalus as an initial symptom: a case-based update. *Child's Nerv Syst* 2020;36(3):459–68. DOI: 10.1007/s00381-019-04481-w.
- Abongwa C., Cotter J., Tamrazi B. et al. Primary diffuse leptomeningeal glioneuronal tumors of the central nervous system: Report of three cases and review of literature. *Pediatr Hematol Oncol* 2020;37(3):248–58. DOI: 10.1080/08880018.2019.1711270.
- Quesada A.G., Roldan P.P., la Madrid A.M. et al. Diffuse Leptomeningeal Glioneuronal Tumour Simulating Tuberculous Meningitis in a 13-Year-Old Girl. *Pediatr Neurosurg* 2018;53(2):140–2. DOI: 10.1159/000485249.
- Tiwari N., Tamrazi B., Robison N. et al. Unusual radiological and histological presentation of a diffuse leptomeningeal glioneuronal tumor (DLGNT) in a 13-year-old girl. *Child's Nerv Syst* 2019;35(9):1609–14. DOI: 10.1007/s00381-019-04074-7.
- Kang J.H., Buckley A.F., Nagpal S. et al. A Diffuse Leptomeningeal Glioneuronal Tumor Without Diffuse Leptomeningeal Involvement: Detailed Molecular and Clinical Characterization. *J Neuropathol Exp Neurol* 2018;9(77):751–6. DOI: 10.1093/jnen/nly053.
- Del Bufalo F., Ceglie G., Cacchione A. et al. *BRAF*V600E Inhibitor (Vemurafenib) for *BRAF*V600E Mutated Low Grade Gliomas. *Front Oncol* 2018;8:526. DOI: 10.3389/fonc.2018.00526.
- Kondyli M., Larouche V., Saint C. et al. Trametinib for progressive pediatric low-grade gliomas. *J Neurooncol* 2018;2(140):435–44. DOI: 10.1007/s11060-018-2971-9.
- Wagner L.M., Myseros J.S., Lukins D.E. et al. Targeted therapy for infants with diencephalic syndrome: A case report and review of management strategies. *Pediatr Blood Cancer* 2018;5(65):e26917. DOI: 10.1002/pbc.26917.
- Miller C., Guillaume D., Dusenbery K. et al. Report of effective trametinib therapy in 2 children with progressive hypothalamic optic pathway pilocytic astrocytoma: documentation of volumetric response. *J Neurosurg Pediatr* 2017;3(19):319–24. DOI: 10.3171/2016.9.PEDS16328.
- Bouffet E., Kieran M., Hargrave D. et al. Trametinib therapy in pediatric patients with low-grade gliomas (LGG) with BRAF gene fusion; a disease-specific cohort in the first pediatric testing of trametinib. *Neuro Oncol* 2018;20(suppl_2):i114. DOI: 10.1093/neuonc/now059.387.
- Nicolaides T., Nazemi K., Crawford J. et al. A safety study of vemurafenib, an oral inhibitor of BRAFV600E, in children with recurrent/refractory BRAFV600E mutant brain tumor: PNOC-002. *Neuro Oncol* 2017;19(suppl_6):vi188. DOI: 10.1093/neuonc/now168.761.
- Banerjee A., Jakacki R.I., Onar-Thomas A. et al. A phase I trial of the MEK inhibitor selumetinib (AZD6244) in pediatric patients with recurrent or refractory low-grade glioma: a Pediatric Brain Tumor Consortium (PBTCC) study. *Neuro Oncol* 2017;19(8):1135–44. DOI: 10.1093/neuonc/now282.

Вклад авторов

Э.Ф. Валиахметова: получение клинических данных и их анализ, разработка дизайна исследования, анализ данных литературы по теме статьи, написание рукописи;

Л.И. Папуша, Е.А. Сальникова: получение клинических данных и их анализ, обсуждение и научное редактирование рукописи;

А.В. Артёмов, Г.В. Терещенко: анализ нейровизуализационных данных, анализ данных литературы по теме статьи;

Л.А. Ясько, А.Е. Друй: молекулярно-генетический анализ опухолей;

А.П. Шехтман: проведение гистологических исследований, редактирование текста рукописи;

Г.А. Новичкова, А.И. Карачунский: анализ научной работы, критический пересмотр с внесением ценного интеллектуального содержания.

Author's contributions

A.F. Valiakhmetova: clinical data obtaining and analysis, study design development, analysis of literature data on the subject, manuscript preparation;

L.I. Papusha, E.A. Sal'nikova: clinical data obtaining and analysis, manuscript discussing and assembling;

G.V. Tereshchenko, A.V. Artemov: analysis of neuroimaging data, analysis of literature data on the subject;

L.A. Yas'ko, A.E. Druy: molecular-genetic analysis of tumors;

A.P. Shekhtman: histopathologic analysis, editing of the manuscript;

G.A. Novichkova, A.I. Karachunskii: data analysis, critical review with valuable intellectual content.

ORCID авторов/ORCID of authors

Э.Ф. Валиахметова / A.F. Valiakhmetova: <https://orcid.org/0000-0002-2977-665X>

Л.И. Папуша / L.I. Papusha: <https://orcid.org/0000-0001-7750-5216>

А.В. Артёмов / A.V. Artemov: <https://orcid.org/0000-0002-0628-1726>

Г.В. Терешенко / G.V. Tereshchenko: <https://orcid.org/0000-0001-7317-7104>

Е.А. Сальникова / E.A. Sal'nikova: <https://orcid.org/0000-0002-9846-2793>

Л.А. Ясько / L.A. Yas'ko: <https://orcid.org/0000-0003-3007-3772>

А.Е. Друй / A.E. Druy: <https://orcid.org/0000-0003-1308-8622>

А.П. Шехтман / A.P. Shekhtman: <https://orcid.org/0000-0001-5461-7442>

Г.А. Новичкова / G.A. Novichkova: <https://orcid.org/0000-0002-2322-5734>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Родители всех пациентов подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. Parents of all patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 30.07.2020. Принята к публикации: 24.12.2020.

Article submitted: 30.07.2020. Accepted for publication: 24.12.2020.



Влияние интерлейкинов 2, 7, 15 на пролиферацию натуральных киллеров *in vitro*

А.О. Ситковская, Е.Ю. Златник, С.Ю. Филиппова, Е.С. Бондаренко, Л.Н. Ващенко, Э.Э. Кечеджиева, И.Р. Дашкова, Е.А. Андрейко, И.А. Новикова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63

Контакты: Анастасия Олеговна Ситковская grankina.anastasia@mail.ru

Введение. Актуальной задачей современной адоптивной иммунотерапии рака является подбор оптимального состава цитокинов для *ex vivo* стимуляции иммунокомпетентных клеток для последующего введения онкологическим больным.

Цель исследования. Изучение влияния интерлейкина (ИЛ) 2, 7, 15 и их комбинаций на пролиферацию натуральных киллеров больных раком молочной железы (РМЖ) *in vitro*.

Материалы и методы. Материалом исследования послужили натуральные киллеры, выделенные методом магнитной сепарации из мононуклеарных клеток периферической крови 10 больных местно-распространенным РМЖ (II стадия). После сепарации клетки культивировали в концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл в течение 10 сут в среде RPMI 1640 с добавлением цитокинов в концентрации 40 нг/мл каждого в 5 вариантах опыта: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-7/ИЛ-15, ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15. На 10-е сутки культивирования проводили исследования фенотипа клеток и клеточного цикла методом проточной цитофлуориметрии. Для иммунофенотипирования клеток использовали моноклональные антитела к антигенам: CD3, CD16/56, CD45, CD4, CD19 и CD8. Для оценки ДНК использовали окрашивание клеток пропидиум йодидом.

Результаты. По окончании культивирования количество живых клеток в процентах от первоначального было достоверно выше, чем в контроле (45,9 %), в образцах ИЛ-2 (86,8 %) и ИЛ-7/ИЛ-15 (85,6 %), ИЛ-15 (76,4 %), ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 (75,8 %). Доля натуральных киллеров (CD16⁺CD56⁺) достоверно отличалась от контроля (18,2 %) в образцах ИЛ-2 (45,6 %), ИЛ-15 (39,9 %), ИЛ-7/ИЛ-15 (36,2 %), ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 (35,9 %). Доля натуральных киллеров Т-клеток (CD3⁺CD16⁺CD56⁺) достоверно отличалась от контроля (0,4 %) в образцах ИЛ-2 (2,06 %), ИЛ-15 (2,2 %), ИЛ-7 (0,9 %), ИЛ-7/ИЛ-15 (1,26 %), ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 (2,46 %). Во всех опытных пробах также наблюдалось достоверное увеличение доли клеток в S-фазе и индекса пролиферации (G2/M + S).

Заключение. Максимальная стимуляция пролиферации натуральных киллеров, сепарированных из крови больных РМЖ, была получена при стимуляции *in vitro* ИЛ-15 и комбинациями γ с-цитокинов, включающих его.

Ключевые слова: натуральные киллеры, интерлейкины, рак молочной железы, иммуномагнитная сепарация, клеточный цикл

Для цитирования: Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Филиппова С.Ю. и др. Влияние интерлейкинов 2, 7, 15 на пролиферацию натуральных киллеров *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1): 56–66.

Effect of interleukins 2, 7, 15 on the proliferation of natural killers *in vitro*

Anastasia O. Sitkovskaya, Elena Yu. Zlatnik, Svetlana Yu. Filippova, Elena S. Bondarenko, Larisa N. Vaschenko, Emma E. Kechedzhieva, Irina R. Dashkova, Elena A. Andreiko, Inna A. Novikova

National Medical Research Centre for Oncology; 63, 14 Liniya St., Rostov-on-Don 344000, Russia

Contacts: Anastasia Olegovna Sitkovskaya grankina.anastasia@mail.ru

Introduction. The actual task of modern adoptive cancer immunotherapy is the selection of the optimal composition of cytokines for *ex vivo* stimulation of immunocompetent cells for subsequent administration to oncological patients.

The purpose of the study was to compare the effect of interleukin (IL) 2, 7, 15 and their combinations on the proliferation of natural killer cells in breast cancer (BC) patients *in vitro*.

Materials and methods. The research was conducted on natural killer cells isolated by magnetic separation from mononuclear cells of peripheral blood of ten patients with locally advanced BC (stage II). After separation, the cells were cultured at a concentration of 2.5×10^5 cells/ml for 10 days in RPMI 1640 medium supplemented with cytokines at a concentration of 40 ng/ml each in five experimental variants: IL-2; IL-7; IL-15; IL-7/IL-15; IL-2/IL-7/IL-15. On the 10th day of cultivation, the phenotype of cells and the cell cycle were studied by flow cytometry. For immunophenotyping of cells, we used monoclonal antibodies to antigens: CD3, CD16/56, CD45, CD4, CD19, and CD8. For cell cycle study cells were stained with propidium iodide.

Results. On the final 10th day of cultivation the number of living cells expressed as percentage of the seeding numbers were significantly different from control (45.9 %) in samples IL-2 (86.8 %) and IL-7/IL-15 (85.6 %), IL-15 (76.4 %), IL-2/IL-7/IL-15 (75.8 %). The proportion of natural killers (CD16⁺CD56⁺) significantly differed from the control (18.2 %) in samples IL-2 (45.6 %), IL-15 (39.9 %), IL-7/IL-15 (36.2 %), IL-2/IL-7/IL-15 (35.9 %). The proportion of natural killer T cells (CD3⁺/CD16⁺CD56⁺) significantly differed from the control (0.4 %) in samples incubated with IL-2 (2.06 %), IL-15 (2.2 %), IL-7 (0.9 %), IL-7/IL-15 (1.26 %), IL-2/IL-7/IL-15 (2.46 %). All experimental tests also showed a significant increase in the proportion of cells in the S-phase and increase in the proliferation index (G2/M + S).

Conclusion. The maximum stimulation of the proliferation of natural killer cells isolated from the blood of patients with BC *in vitro* was obtained by stimulation with IL-15 alone and in combinations with γ -cytokines.

Key words: natural killer cells, interleukins, breast cancer, immunomagnetic separation, cell cycle

For citation: Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Filippova S.Yu. et al. Effect of interleukins 2, 7, 15 on the proliferation of natural killers *in vitro*. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):56–66. (In Russ.).

Введение

Существуют различные способы терапии онкологических заболеваний, в том числе такие агрессивные, как применение химиотерапевтических препаратов и лучевая терапия [1]. Одним из шадящих методов является иммунотерапия, направленная на корректировку нарушений различных этапов иммунного ответа, возникающих при развитии злокачественной опухоли [2]. В настоящее время широко известна адоптивная иммунотерапия, в основе которой лежит применение аутологичных/аллогенных, стимулированных *ex vivo* иммунокомпетентных клеток (Т-, В- и НК-клеток) [3]. Подобные исследования проводятся и в нашем центре [4, 5].

Еще в 80-х годах XX в. в качестве терапии больных с солидными опухолями на терминальных стадиях, проявляющих резистентность к остальным видам лечения, применяли лимфокин-активированные киллеры (ЛАК) в сочетании с одномоментным введением интерлейкина (ИЛ) 2 [6, 7].

Одна из знаменательных работ по ЛАК-терапии проведена в 1997 г., когда в ходе III фазы рандомизированного клинического исследования с участием 174 первичных пациентов с карциномой легкого больным вводили аутологичные ЛАК ($1-5 \times 10^9$ клеток/инъекция) в сочетании с ИЛ-2 до или после стандартной противоопухолевой терапии в интервале 2–3 мес в течение 2 лет. По результатам исследования 5- и 9-летняя выживаемость больных составила 54,5

и 52,0 % соответственно в сравнении с 33,4 и 24,2 % в контрольной группе, где не применяли иммунотерапию ($p < 0,001$) [8].

Ранее мы изучили влияние различных концентраций ИЛ-2 и интерферона γ на пролиферацию и иммунофенотип лимфоцитов, полученных от больных местно-распространенным раком молочной железы (РМЖ) (II–III стадия) после иммуномагнитной деплеции Т-регуляторных клеток из общего пула лимфоцитов *in vitro* [9]. В итоге предварительное снижение доли Т-регуляторных клеток перед стимуляцией лимфоцитов не произвело должного эффекта, поэтому применение деплеции в подобном методическом режиме не привело к значимым результатам. Однако были обнаружены некоторые различия в динамике натуральных киллеров (НК) и натуральных киллеров Т-клеток (НКТ) в зависимости от цитокинов, воздействующих на клетки.

В работе М.В. Киселевского и соавт. [3] подробно раскрыты роль ряда ИЛ и перспективы их применения в иммунотерапии злокачественных новообразований. В частности, авторы обсуждают индукцию пролиферации и активации иммунных клеток через рецептор ИЛ-2, ссылаясь на исследование F. André и соавт., проведенное в 2012 г. [10]. Также рассматривается возможность применения в качестве компонента адоптивной иммунотерапии ИЛ-15, одиночно и в сочетании с ИЛ-2, как утверждают авторы, – в качестве инструмента для усиления как гуморальных,

так и адаптивных противоопухолевых иммунных реакций. Предполагается, что активация Т- и НК-клеток с использованием цитокинов может обладать синергизмом с эффектом ингибиторов контрольных точек иммунитета [3]. А применение ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15 для индукции PD-1 не приводит к угнетению жизнеспособности и пролиферации лимфоцитов, при этом может ограничивать некоторые эффектор-ные функции Т-клеток и в дальнейшем препятствовать иммуноопосредованному повреждению нормальных тканей [11].

Несмотря на то что первые исследования индукции ЛАК-клеток насчитывают более 30 лет, в настоящее время работы в данной области продолжают-ся, поскольку расширяются знания о функциях ИЛ. По современным представлениям, перспективным является использование для генерации ЛАК-клеток комплексов цитокинов. Поскольку ЛАК могут происходить не только из НК, но и из НКТ-клеток, кроме традиционного ИЛ-2 предложено использовать стимуляторы Т-лимфоцитов ИЛ-7 и НК-клеток ИЛ-15. ИЛ-2, ИЛ-7 и ИЛ-15 имеют общую γ -цепь (благодаря чему получили название семейства $\gamma\epsilon$), что позволяет им осуществлять свои функции через активацию сигнального пути JAK/STAT, вследствие этого активность данных цитокинов во многом перекрывается, тем не менее каждый из них играет свою биологическую роль [12]. Так, ИЛ-7 и ИЛ-15 играют важную, хотя и не исключительную, роль в формировании и выживании Т-клеток памяти. Гетерогенность субпопуляций НК также предполагает их различную чувствительность к разным цитокинам. Например, CD16⁻CD56⁺-НК-клетки могут вызывать экспрессию pSTAT5 в ответ как на ИЛ-7, так и на ИЛ-15 *in vitro*, тогда как CD16⁺CD56⁻-НК-клетки отвечают только на ИЛ-15. ИЛ-2 и ИЛ-15, действующие на один β -рецептор (CD122), участвуют в инициальном Т-клеточном ответе на антиген, а также вызывают активацию и пролиферацию НК-клеток и усиливают их цитолитическую активность, реализуемую перфорин и гранзимом В.

Важным этапом генерации ЛАК-клеток является экспансия, для которой предлагаются различные протоколы, в том числе без использования фидерных клеток, а с помощью обработки НК-лимфоцитов ИЛ-15 и ИЛ-21 [13]. Последний тоже относится к $\gamma\epsilon$ -цитокинам и не только вызывает увеличение количества НК, но и усиливает их созревание и функциональную активность.

Уточнение значения цитокинов, применяемых в комплексе для стимуляции, и их взаимодействия представляется важным для разработки методов противоопухолевой клеточной иммунотерапии.

Цель настоящей работы – изучить влияние ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и их комбинаций на пролиферацию НК

больных местно-распространенным РМЖ (II стадия) после иммуномагнитной сепарации данных клеток из общего пула лимфоцитов *in vitro*.

Материалы и методы

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (МНК). Материалом являлась периферическая кровь 10 больных РМЖ II стадии, проходивших лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России в отделении опухолей костей, кожи, мягких тканей и молочной железы. Забор крови проводили из локтевой вены в объеме 32 мл в пробирки с фикалом для выделения МНК (BD Vacutainer® СРТ™, США, градиент плотности 1.077). Далее выделяли МНК и обогащали клеточную суспензию НК путем иммуномагнитной сепарации колоночным методом, как описано ниже.

Негативная сепарация НК из МНК. Суспензию МНК центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Добавляли 3 мл буфера для сепарации (1 часть бычьего сывороточного альбумина + 20 частей промывочного раствора) к осадку клеток и считали их общее количество на автоматическом счетчике клеток EVE (NanoEnTek, Корея) с окрашиванием 0,4 % трипановым синим. После подсчета клеток центрифугировали клеточную суспензию при 300 g в течение 10 мин. В зависимости от количества клеток добавляли 40 мкл буфера для сепарации и 10 мкл связанных с биотином антител (NK Cell Biotin-Antibody Cocktail, human (кат. № 130-092-657), Miltenyi Biotec, США) на каждые 10^7 клеток. Ресуспендировали осадок клеток и инкубировали в течение 5 мин при температуре 2–8 °С. Добавляли 30 мкл буфера для сепарации и 20 мкл антибиотинных микрочастиц на каждые 10^7 клеток, пипетировали и инкубировали 10 мин при температуре 2–8 °С. Доводили общий объем суспензии до 500 мкл буфером для сепарации и переносили на предварительно промытую 3 мл буфера для сепарации LS-колонку (LS Columns (кат. № 130-042-401), Miltenyi Biotec, США), помещенную в магнитное поле сепаратора (Mini&MidiMACS Starting Kit (кат. № 130-042-501), Miltenyi Biotec, США). Под колонкой располагали коллектор для эффлюента, представляющий собой чистую пробирку объемом 15 мл. После прохождения суспензии однократно промывали колонку 3 мл буфера для сепарации. Эффлюент, содержащий немеченые клетки (фракция, обогащенная НК-клетками), центрифугировали при 300 g в течение 10 мин. Полученный осадок ресуспендировали в 500 мкл питательной среды RPMI 1640 («Биолот», Россия) и определяли общее количество клеток на автоматическом счетчике EVE. Часть клеток отбирали в отдельную микропробирку для дальнейшей точной цитометрии.

Культуральный этап. После сепарации клетки пасировали в равной посевной дозе по 5×10^5 клеток/лунка в 6-луночный планшет (Biofil, Китай). Клетки культивировали в питательной среде RPMI 1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки («Биолот», Россия) в течение 10 сут. В опытные лунки добавляли от 1 до 3 цитокинов в концентрации 40 нг/мл каждого: ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-7/ИЛ-15, ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15. Исследование проводилось с отрицательным контролем: НК после сепарации без воздействия цитокинами. Подсчет жизнеспособных клеток в опытных и контрольных образцах производили на 2, 3, 4, 5, 8, 9 и 10-е сутки после внесения цитокинов на автоматическом счетчике EVE с применением 0,4 % трипанового синего.

Имунофенотипирование клеток. Исследование фенотипа клеток проводили на этапе выделения МНК и на 10-е (итоговые) сутки после внесения цитокинов в опытные образцы на 6-цветном проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием панели моноклональных антител к человеческим антигенам: CD3 (FITC), CD16/56 (PE), CD45 (PerCP-Cy5-5), CD4 (PE-Cy7), CD19 (APC), CD8 (APC-Cy7) (Becton Dickinson, США).

Исследование клеточного цикла. Исследование клеточного цикла проводили на 10-е сутки после культивирования с цитокинами. Для оценки ДНК в исследуемых клетках использовали CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit (кат. № 340242, Becton Dickinson, США). Анализ образцов (не менее 20 000 клеток) после окрашивания пропидиум йодидом проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II, оборудованном модулем дискриминации дуплетов. Тестирование работы проточного цитофлуориметра проводили с использованием универсальных биологических частиц DNA QC Particles (кат. № 349523, Becton Dickinson, США). Данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ModFIT LT. Долю клеток с различным содержанием ДНК на гистограммах рассчитывали как процент от общего числа проанализированных клеток. Долю клеток в разных фазах клеточного цикла выражали в процентах.

Метод основан на растворении липидов клеточной мембраны неионным детергентом, разрушении клеточного цитоскелета и протеинов ядра трипсином, расщеплении клеточной РНК ферментом, и стабилизации ядерного хроматина спермином. Пропидиум йодид окрашивает хроматин; затем проводится измерение на проточном цитометре, обеспечивающем дискриминацию дуплетов. Ядра, окрашенные пропидиум йодидом, испускают свет с длиной волны от 580 до 650 нм. Детектор флуоресценции 2 (FL2) проточного цитофлуориметра, снабженный фильтром 585/42, используется для анализа эмиссии света,

испущенного окрашенными клетками в диапазоне от 564 до 606 нм.

Полученные гистограммы флуоресценции предоставляют информацию о клетках с анеуплоидным содержанием ДНК. ДНК-индекс определяется делением среднего значения относительного содержания ДНК анеуплоидной популяции клеток в фазе G₀/G₁ на среднее значение G₀/G₁ нормальной популяции. Коэффициент вариации для каждого пика G₀/G₁ отображается в отчете.

Статистический анализ. Оценку статистической достоверности различий в показателях между группами определяли по *t*-критерию Стьюдента. Данные выражали как средние значения ± ошибка среднего ($M \pm m$). Кратность выборки составила 16, так как некоторые образцы выполняли в нескольких повторах.

Результаты и обсуждение

Культуральный этап. Результаты, представленные в табл. 1, свидетельствуют о ряде статистически достоверных различий между опытными и контрольными пробами в разные сутки культивирования. Так, на 5-е сутки культивирования суспензии клеток под воздействием цитокинов количество клеток, выраженное в процентах от начального количества, было больше по сравнению с контролем (64,1 %) в образцах с ИЛ-2 (97,2 %) и ИЛ-7/ИЛ-15 (91,7 %) – в 1,5 и 1,4 раза соответственно ($p < 0,05$). После 9 сут культивирования статистически значимое превышение количества клеток по сравнению с контрольным образцом (54,9 %) наблюдали в образцах с ИЛ-2 (86,2 %) – в 1,6 раза; ИЛ-15 (84,1 %) и ИЛ-7/ИЛ-15 (84,4 %) – в 1,5 раза ($p < 0,05$).

В целом внесение цитокинов в образцы, обогащенные НК-клетками, приводило к повышению доли этих клеток, что, несомненно, связано с индукцией их пролиферации. При этом добавление ИЛ-7 в образцы с НК способствовало постепенному угнетению числа клеток и в последние 3 дня исследования показатели опускались ниже контрольных (рис. 1).

Таким образом, самостоятельное воздействие ИЛ-7 привело к негативному эффекту на пролиферацию НК. Сочетанное действие ИЛ-7/ИЛ-15 наряду с ИЛ-2 показало наилучшие результаты на 10-е сутки культивирования. Внесение остальных цитокинов в индивидуальном порядке либо в комбинации приводило к сходному стимулирующему эффекту.

Имунофенотипирование клеток. Анализ полученных данных выявил ряд различий в экспрессии мембранных рецепторов НК- и НКТ-клеток в опытных и контрольных образцах. Культивирование клеток с комбинацией цитокинов ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 приводило к увеличению в 1,9 раза доли CD16⁺CD56⁺-клеток (НК) (35,9 %) в сравнении с контролем (18,2 %). Добавление в опытные образцы ИЛ-7/ИЛ-15 повышало

Таблица 1. Влияние различных цитокинов на пролиферацию исследуемых клеток *in vitro*Table 1. The influence of various cytokines on the proliferation of the studied cells *in vitro*

Цитокины Cytokines	Доля от первоначально внесенных клеток ($M \pm m$), % Percentage of originally introduced cells ($M \pm m$), %						
	2-е сутки 2 nd day	3-и сутки 3 rd day	4-е сутки 4 th day	5-е сутки 5 th day	8-е сутки 8 th day	9-е сутки 9 th day	10-е сутки 10 th day
Контроль Control	117,7 ± 11,5	105,7 ± 13,4	88,8 ± 9,7	64,1 ± 8,4	65,9 ± 8,1	54,9 ± 7,2	45,9 ± 7,0
ИЛ-2 IL-2	118,6 ± 7,9	109,6 ± 10,0	113,2 ± 9,2	97,2 ± 5,4*	73,6 ± 6,9	86,2 ± 7,3*	86,8 ± 7,8*
ИЛ-7 IL-7	110,2 ± 6,5	99,8 ± 7,4	99,4 ± 6,2	71,6 ± 4,7	57,7 ± 7,9	42,7 ± 5,0	39,6 ± 7,6
ИЛ-15 IL-15	110,6 ± 7,6	99,7 ± 8,2	91,3 ± 6,4	78,8 ± 5,0	68,8 ± 6,2	84,1 ± 5,4*	76,4 ± 10,8*
ИЛ-7/ИЛ-15 IL-7/IL-15	110,9 ± 9,2	97,3 ± 6,7	91,8 ± 6,0	91,7 ± 5,2*	77,1 ± 6,5	84,4 ± 8,2*	85,6 ± 10,6*
ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 IL-2/IL-7/IL-15	102,7 ± 7,0	100,5 ± 8,6	89,5 ± 7,2	83,8 ± 6,5	77,1 ± 4,7	75,5 ± 9,2	75,8 ± 6,9*

*Достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$).

*Significant differences from the control sample ($p < 0.05$).

Примечание. Данные в таблице представлены в виде среднего значения (M) ± ошибка среднего значения (m). За 100 % принимали количество клеток при посеве – 5×10^5 клеток на лунку 6-луночного планшета.

Note. The data in the table are presented as an average value (M) ± error of the average (m). The number of cells at seeding was taken as 100 % – 5×10^5 cells per well of a 6-hole plate.

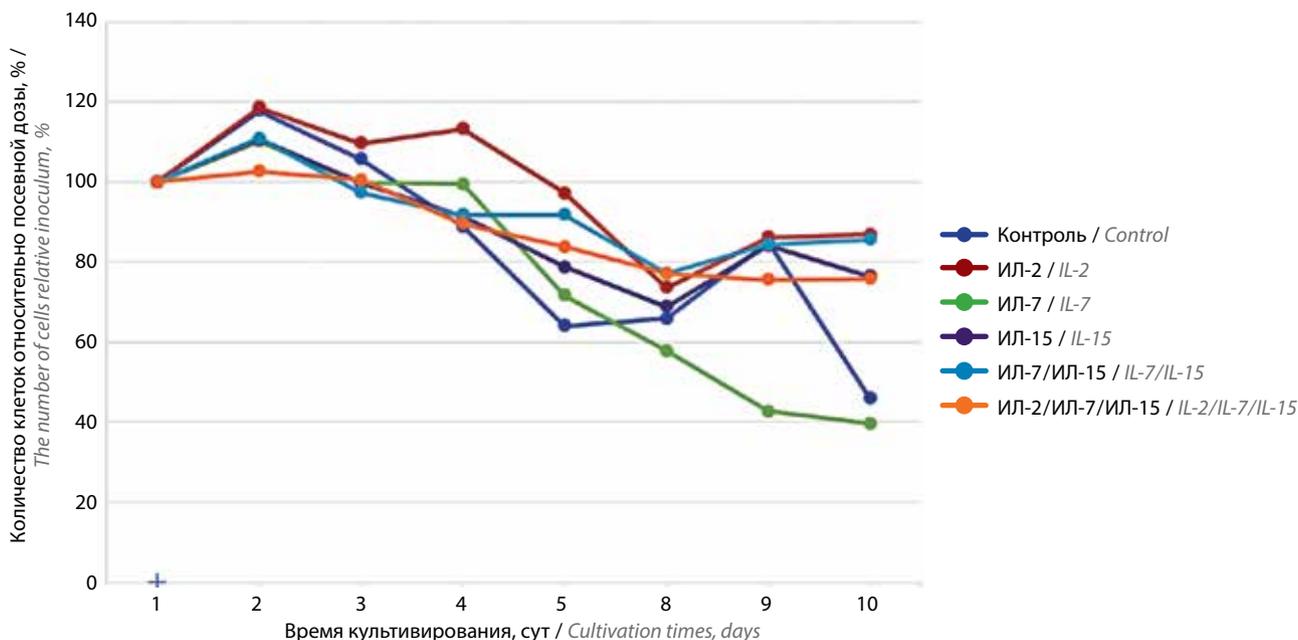


Рис. 1. Количество исследуемых клеток в процентах от первоначального значения по дням культивирования. Количество клеток в 1-й день культивирования соответствует посевной дозе и принимается за 100 %

Fig. 1. The number of studied cells as a percentage of the initial value for days of cultivation. The number of cells on the first day of cultivation corresponds to the inoculation dose and is taken as 100 %

уровень данной субпопуляции в 2 раза (36,2 %). Наибольшее количество CD16⁺CD56⁺-клеток, подтвержденное статистически, определяли в образцах с ИЛ-15

(39,9 %) – увеличение в 2,2 раза, и с ИЛ-2 (45,6 %) – увеличение в 2,5 раза ($p < 0,05$). При этом наличие в образце только ИЛ-7 приводило к уменьшению

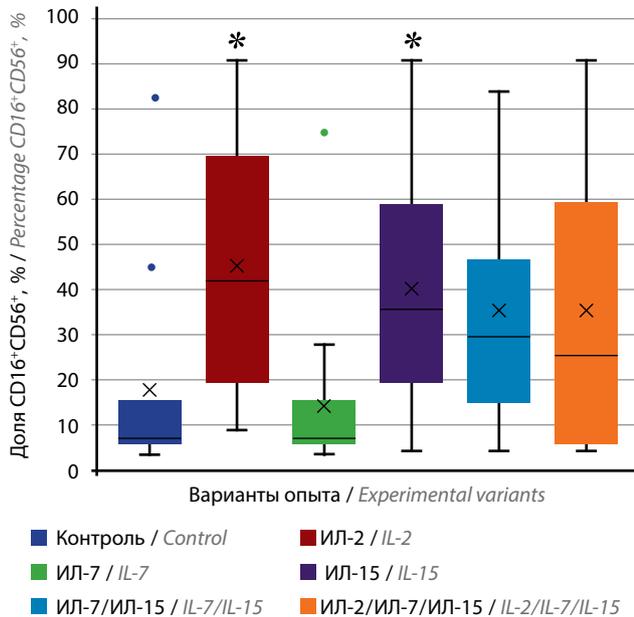


Рис. 2. Доля $CD16^+CD56^+$ -клеток через 10 сут сокультивирования с цитокинами. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$)

Fig. 2. The proportion of $CD16^+CD56^+$ -cells after 10 days of co-cultivation with cytokines. The asterisk marks significant differences from the control sample ($p < 0.05$)

уровня данных клеток (15,6 %) ниже контрольных значений в 1,2 раза (рис. 2).

Исследование уровня $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток (НКТ) выявило значительное повышение уровня данной субпопуляции в опытных образцах по сравнению с контролем, где он составлял 0,4 %. Так, при культивировании с ИЛ-7 доля клеток повышалась в 2,25 раза (до 0,9 %). Действие ИЛ-7/ИЛ-15 приводило к увеличению НКТ в 3,15 раза – до 1,26 % ($p < 0,05$). Как и при исследовании $CD16^+CD56^+$ -клеток, наиболее высокие значения $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток определялись при внесении ИЛ-2 и ИЛ-15. В 5,15 раза возрастала доля НКТ (2,06 %) после воздействия ИЛ-2 ($p < 0,05$), а добавление ИЛ-15 вызвало повышение их уровня до 2,2 %, т.е. в 5,5 раза ($p < 0,05$). Несмотря на слабое стимулирующее действие ИЛ-7 на пролиферацию НКТ, в комбинации с ИЛ-2 и ИЛ-15 (ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15) наблюдали прирост данных клеток (2,46 %) в 6,15 раза ($p < 0,05$) (рис. 3).

Различают 2 типа НКТ: инвариантные, выполняющие цитотоксическую функцию и распознающие гликолипидные антигены, связанные с молекулой CD1d – аналогом молекулы МНС; и НКТ II типа (большинство всех НКТ у человека) – продуценты цитокинов, осуществляющие регуляторную функцию при опухолевых и аутоиммунных заболеваниях [14]. Инвариантные НКТ экспрессируют только 1 вид Т-клеточного рецептора (TCR) α -цепи ($V\alpha 24J\alpha QTCR\alpha$),

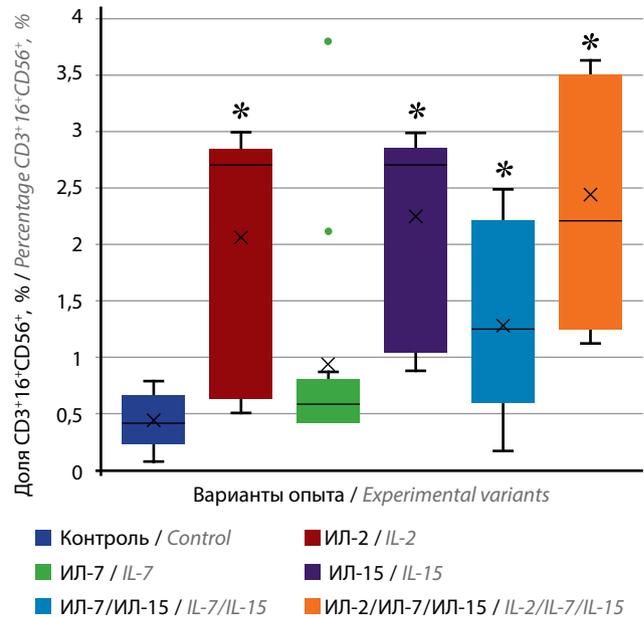


Рис. 3. Доля $CD3^+CD16^+CD56^+$ -клеток через 10 сут сокультивирования с цитокинами. Звездочкой отмечены достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$)

Fig. 3. The proportion of $CD3^+CD16^+CD56^+$ -cells after 10 days of co-cultivation with cytokines. The asterisk marks significant differences from the control sample ($p < 0.05$)

в отличие от НКТ II типа, экспрессирующих различные TCR α -цепи [15].

При острых тяжелых воспалительных процессах наблюдалось увеличение доли НКТ в периферической крови больных, которое сопровождалось снижением количества В-клеток и $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперных лимфоцитов, что свидетельствовало о переходе воспаления в хроническую форму [16].

Во время развития злокачественной опухоли у больных отмечается угнетение инвариантных НКТ, при этом повышается уровень НКТ II типа. Подавление активности инвариантных НКТ клетками НКТ II типа связывают с прогрессированием опухолевого роста [17, 18].

В исследовании А.А. Боруновой и соавт. у всех больных метастатической меланомой кожи с повышенным содержанием НКТ в ходе иммунотерапии отмечали прогрессирование в период до 2 лет, однако прогрессирование отмечалось и у больных с нормальным содержанием НКТ [15]. В противоположность этому, увеличение популяции НКТ при других нозологических формах и ином противоопухолевом лечении, например химиотерапии, являлось благоприятным прогностическим критерием, как было установлено при исследовании больных РМЖ [19].

Функциональная гетерогенность НКТ, в частности их способность активировать и подавлять противоопухолевый иммунный ответ, предполагает возможность использования данной клеточной

субпопуляции в качестве модели клеточной терапии, а также прогностического критерия течения заболевания [20]. Несомненно, изучение субпопуляций НК, в частности НКТ, и путей их активации является важным аспектом иммунологических исследований при онкологических заболеваниях.

Исследование клеточного цикла. При исследовании индекса ДНК обнаружено, что клетки во всех пробах являлись диплоидными, что и предполагалось, так как лимфоциты являются стандартом диплоидных клеток при проведении данного теста (рис. 4). Анализ распределения клеток по фазам клеточного

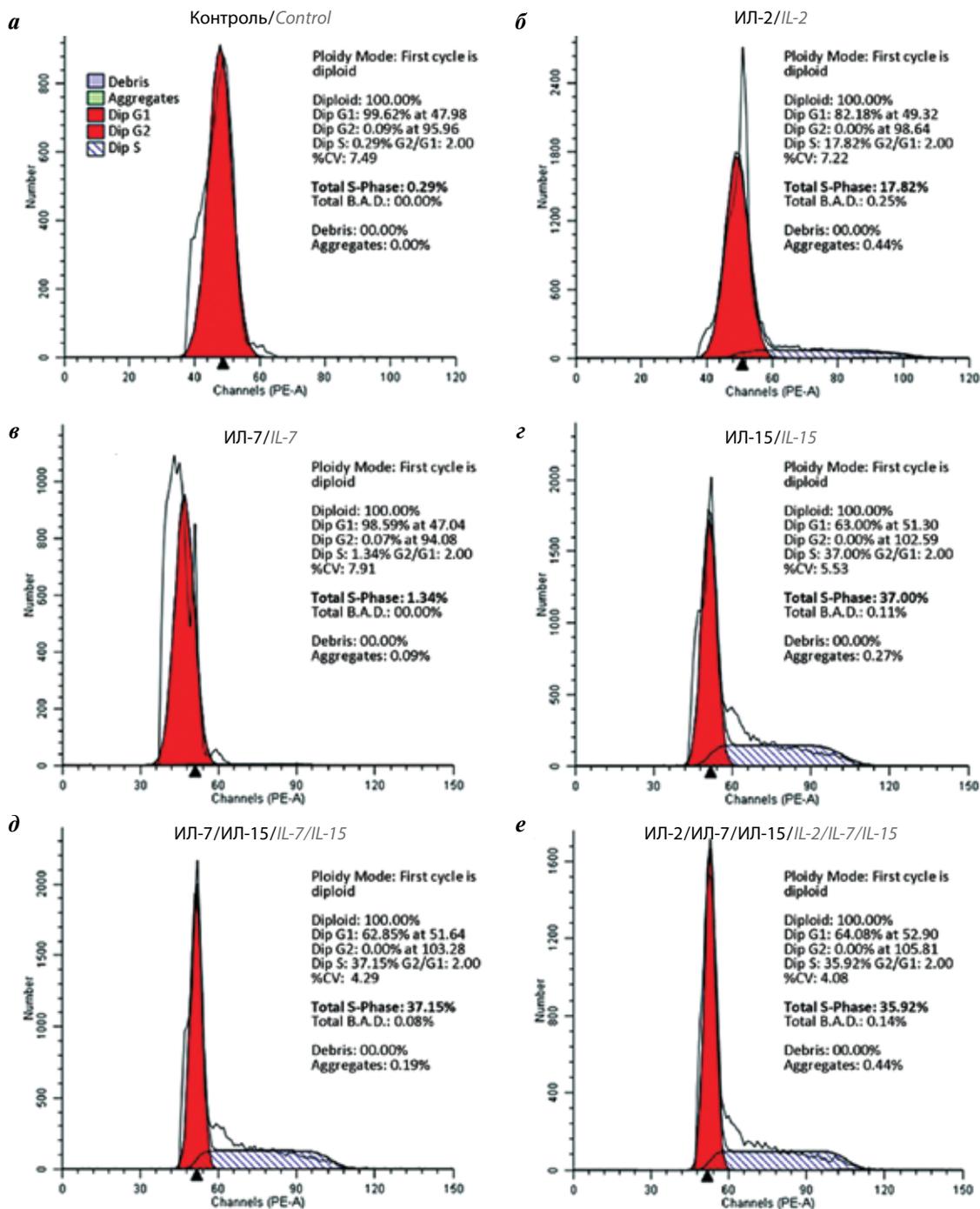


Рис. 4. Исследование клеточного цикла в образцах через 10 сут сокультивирования с цитокинами: а – контрольный образец; б – сокультивирование с ИЛ-2; в – сокультивирование с ИЛ-7; г – сокультивирование с ИЛ-15; д – сокультивирование с ИЛ-7/ИЛ-15; е – сокультивирование с ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15

Fig. 4. Study of the cell cycle in samples after 10 days of co-cultivation with cytokines: а – control sample; б – co-cultivation with IL-2; в – co-cultivation with IL-7; г – co-cultivation with IL-15; д – co-cultivation with IL-7/IL-15; е – co-cultivation with IL-2/IL-7/IL-15

Таблица 2. Анализ клеточного цикла исследуемых клеток после воздействия цитокинами

Table 2. Analysis of the cell cycle of the studied cells after effect of cytokines

Цитокины Cytokines	Доля от общего количества клеток ($M \pm m$), % Percentage of the total number of cells ($M \pm m$), %			ИП = G2/M + S IP = G2/M + S
	G0/G1-фаза G0/G1-phase	G2/M-фаза G2/M-phase	S-фаза S-phase	
Контроль Control	99,77 ± 0,19	0,03 ± 0,02	0,19 ± 0,19	0,22 ± 0,19
ИЛ-2 IL-2	78,61 ± 3,63*	0,14 ± 0,07	21,25 ± 3,65*	21,39 ± 3,63*
ИЛ-7 IL-7	97,45 ± 0,96*	0,18 ± 0,15	2,37 ± 1,02*	2,55 ± 0,96*
ИЛ-15 IL-15	70,92 ± 4,15*	0,28 ± 0,17	28,79 ± 4,29*	29,08 ± 4,15*
ИЛ-7/ИЛ-15 IL-7/IL-15	72,09 ± 3,32*	0,32 ± 0,17	27,58 ± 3,41*	27,90 ± 3,32*
ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 IL-2/IL-7/IL-15	75,58 ± 3,27*	0,27 ± 0,10*	24,15 ± 3,29*	24,42 ± 3,27*

*Достоверные отличия от контрольного образца ($p < 0,05$).

*Significant differences from the control sample ($p < 0,05$).

Примечание. Данные в таблице представлены в виде среднего значения (M) ± ошибка среднего значения (m). ИП – индекс пролиферации.

Note. The data in the table are presented as an average value (M) ± error of the average (m). IP is the index of proliferation.

цикла (табл. 2) установил, что в контроле основная масса клеток (99,77 %) находилась в G0/G1-фазе. Процентное соотношение клеток в G0/G1-фазе во всех опытных образцах статистически достоверно отличалось от контрольных проб. Минимальные различия были обнаружены после культивирования с ИЛ-7, доля таких клеток составляла 97,45 % и была меньше в 1,02 раза, чем в контроле ($p < 0,05$). В остальных опытных пробах наблюдали меньшее количество клеток в покоем состоянии. Добавление только ИЛ-2 приводило к снижению числа клеток в данной фазе по сравнению с контролем в 1,27 раза (до 78,61 %); комбинации ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 – в 1,32 раза (до 75,58 %); сочетанное воздействие ИЛ-7 и ИЛ-15 вызвало снижение количества покоящихся клеток в 1,38 раза (до 72,09 %), а воздействие только ИЛ-15 – в 1,41 раза (до 70,92 %) ($p < 0,05$).

Скорость пролиферации исследуемых клеток определяли по доле клеток в S-фазе. В контрольных пробах скорость пролиферации составила 0,19 %, что было значительно ниже данного показателя, регистрируемого во всех пробах с добавлением цитокинов. Различия между контролем и опытными образцами были статистически подтверждены. После культивирования исследуемых клеток с ИЛ-7 скорость пролиферации была больше в 12,5 раза (2,37 %) в сравнении с контролем ($p < 0,05$). Остальные опытные пробы превышали контрольные значения по данному показателю более чем в 100 раз. Разница между

контролем и пробой, культивированной с ИЛ-2, составила 111,8 раза, с ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 – 127,1 раза, с ИЛ-7/ИЛ-15 – 145,2 раза, максимальный показатель скорости пролиферации выявлен после культивирования с ИЛ-15 – 151,5 раза ($p < 0,05$).

Индекс пролиферации в исследуемых пробах оценивали по доле клеток в фазах G2/M + S. Уровень данного показателя также статистически достоверно различался между опытными пробами и контролем. Как и при оценке скорости пролиферации, минимальный индекс пролиферации клеток определяли в контроле (0,22 %). Добавление ИЛ-7 способствовало повышению данного показателя в 11,6 раза, составляя 2,55 % ($p < 0,05$), культивирование с ИЛ-2 – в 97,2 раза (21,39 %) ($p < 0,05$). Более чем в 100 раз увеличивались значения индекса пролиферации в сравнении с контролем при культивировании с ИЛ-15 в комбинации с другими цитокинами и без них (с ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15 – 24,42 %, с ИЛ-7/ИЛ-15 – 27,90 %, с ИЛ-15 – 29,08 %) ($p < 0,05$).

Как известно, нормальные (не трансформированные) диплоидные клетки проходят через 4 фазы: G1, S, G2 и M. При отсутствии репликации диплоидные клетки находятся в покоем состоянии, или в фазе G0 клеточного цикла. ДНК содержится в парных хромосомах и ее количество соответствует 2C. На начальной стадии деления клетки вступают в фазу G1 клеточного цикла, где происходит синтез РНК и протеинов, при этом содержание ДНК равно

2С. Стадии G0 и G1 объединяют и обозначают как G0/G1, так как содержание ДНК в них одинаковое (2С). Синтез ДНК, или S-фаза, начинается с репликации молекул ДНК и продолжается до ее удвоения, содержание ДНК становится 4С. Далее клетки переходят в фазу G2, в которой происходит подготовка к делению; содержание ДНК при этом не изменяется и остается 4С. В процессе M-фазы клетки претерпевают деление, или митоз. Содержание ДНК остается 4С до тех пор, пока клетка не разделится на 2 дочерние клетки, в каждой из которых содержание ДНК будет 2С [21].

Фаза G2/M является 1 из 2 контрольных точек (чекпойнтов) клеточного цикла, используемых для мониторинга повреждений ДНК и ее восстановления [22]. Клетки, которые не проходят эту контрольную точку, демонстрируют накопление ДНК в фазе G2 и снижение в фазе M, называемое «арест G2/M» [23], что предотвращает митоз и тем самым ингибирует пролиферацию [24].

В результате исследования клеточного цикла мы установили способность исследуемых клеток к пролиферации после 10 сут культивирования с цитокинами. При этом в контрольных пробах без добавления цитокинов практически все клетки находились в состоянии покоя. Культивирование лимфоцитов периферической крови в течение 10 сут является длительным для данного типа клеток, и предполагает снижение способности к делению при отсутствии дополнительных стимулов. Известно, что митогенная стимуляция предполагает 3-дневное, а антигенная — 7-дневное культивирование [25, 26], хотя в последнем случае, поскольку исследуется специфический ответ, рассматривается пролиферация Т-лимфоцитов, а не НК. Длительность экспансии при культивировании НК составляет около 2 нед, а для цитокиновой стимуляции субпопуляции НК, подобных клеткам памяти, используется несколько циклов рестимуляции [27].

Согласно проведенному нами анализу клеточного цикла, максимальные значения уровня исследуемых клеток в фазе G2/M показаны в пробах с ИЛ-15, как при одиночном воздействии, так и в комбинации с другими цитокинами (ИЛ-7/ИЛ-15 и ИЛ-2/ИЛ-7/ИЛ-15). Судя по количеству клеток в S-фазе, максимальным стимулятором скорости пролиферации также оказался ИЛ-15; в меньшей степени скорость пролиферации усиливается и содержащими ИЛ-15 комбинациями цитокинов, примененными нами,

вероятно, за счет наличия в них ИЛ-7, угнетающего или, по крайней мере, не поддерживающего пролиферацию исследованных нами лимфоцитов.

Заключение

Нами был применен ряд вариантов, включающих культивирование сепарированных лимфоцитов (обогащенных НК-клетками) больных РМЖ, как с 1 из γ С-цитокинов, так и с комплексом из 2–3. Несмотря на активную индукцию пролиферации, вызванную ИЛ-2 и ИЛ-15, через 10 сут непрерывного воздействия одним ИЛ-15 на сепарированные НК скорость и индекс пролиферации были выше, чем после культивирования с ИЛ-2. Таким образом, среди всех исследованных в нашей работе цитокинов и их комбинаций только ИЛ-15 вызывает наиболее пролонгированную активацию НК. Он представляется наиболее перспективным для этой цели, поскольку стимулирует широкий спектр иммунокомпетентных клеток: НК, антигенспецифические Т-лимфоциты, включая долгоживущие Т-клетки памяти; важным свойством является и его способность вызывать их миграцию из крови в ткани. Для нас особенно важно, что он обеспечивает выживаемость НК-клеток при длительном культивировании, а в литературе описана и его способность обеспечивать выживание НКТ-клеток *in vivo* через механизм аутофагии [28].

ИЛ-7 в наших опытах проявлял минимальное, и не во всех тестах, и не во все сроки исследования, стимулирующее действие на пролиферацию выделенных клеток, хотя при наличии среди них значительной доли НКТ-клеток, в частности инвариантных, оптимальными могут оказаться сочетания цитокинов, включающие ИЛ-7, так как именно он является стимулятором их пролиферации [29].

С учетом обычно непродолжительной выживаемости стимулированных лимфоцитов *in vivo* исследования развиваются в направлении ее повышения, например путем создания рекомбинантной фьюжен-структуры, в состав которой входят ИЛ-7 и ИЛ-15, из чего следует эффективность такой комбинации. Лимфоциты, полученные после стимуляции конструкцией из обоих цитокинов, дольше сохраняли жизнеспособность, активность, интенсивно инфильтрировали опухоль [30].

Таким образом, нами получена максимальная стимуляция пролиферации НК, сепарированных из крови больных РМЖ, при стимуляции *in vitro* ИЛ-15 и комбинациями γ С-цитокинов, включающих его.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Мушкарина Т.Ю., Кузьмина Е.Г. Многомерный анализ иммунитета с выделением роли Т-регуляторных клеток при лучевых повреждениях легких. Медицинский академический журнал 2016;16(4):161–2. [Mushkarina T.Ju., Kuz'mina E.G. Multivariate analysis of immunity highlighting the role of regulatory T cells in radiation damage to the lungs. Medicinskij akademicheskij zhurnal = Medical academic journal 2016;16(4):161–2. (In Russ.)].
- Бережная Н.М., Чехун В.Ф. Иммунология злокачественного роста. Киев: Наукова думка, 2005. 792 с. [Berezhnaya N.M., Chekhun V.F. Immunology of malignant growth. Kiev: Naukova dumka, 2005. 792 p. (In Russ.)].
- Киселевский М.В., Чикилева И.О., Жаркова О.В. и др. Перспективы комбинированной терапии онкологических больных интерлейкином-2 и ингибиторами контрольных иммунных точек. Вопросы онкологии 2020;66(1):23–8. [Kiselevskij M.V., Chikileva I.O., Zharkova O.V. et al. Prospects of combining interleukin-2 with immune checkpoint inhibitors for cancer therapy. Voprosy onkologii = Oncology issues 2020;66(1):23–8 (In Russ.)].
- Златник Е.Ю., Ситковская А.О., Непомнящая Е.М. и др. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. Казанский медицинский журнал 2018;99(5):792–801. [Zlatnik E.Ju., Sitkovskaja A.O., Nepomnjashhaja E.M. et al. Achievements and prospects of cellular technologies based on the activated lymphocytes in the treatment of malignant tumors. Kazanskij medicinskij zhurnal = Kazan medical journal 2018;99(5):792–801 (In Russ.)]. DOI: 10.17816/KMJ2018-792.
- Шамова Т.В., Ситковская А.О., Ващенко Л.Н., Кечеджиева Э.Э. Адоптивная клеточная терапия: достижения последних лет. Южно-Российский онкологический журнал 2020;1(1):43–59. [Shamova T.V., Sitkovskaja A.O., Vashhenko L.N., Kechedzhieva Je.Je. Adoptive cell therapy: current advances. Juzhno-Rossijskij onkologicheskij zhurnal = South-Russian journal of cancer 2020;1(1):43–59 (In Russ.)].
- Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M. et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2-2 to patients with metastatic cancer. N Engl J Med 1985;313(23):1485–92. DOI: 10.1056/NEJM198512053132327.
- Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M. et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2-2 or high-dose interleukin-2-2 alone. N Engl J Med 1987;316(15):889–97. DOI: 10.1056/NEJM198704093161501.
- Kimura H., Yamaguchi Y. A phase III randomized study of interleukin-2 lymphokine-activated killer cell immunotherapy combined with chemotherapy or radiotherapy after curative or noncurative resection of primary lung carcinoma. Cancer 1997;80(1):42–9.
- Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Шамова Т.В. и др. Генерация лимфокин-активированных киллеров на фоне сниженного содержания Т-регуляторных клеток *in vitro*. Цитология 2020;62(10):7–13 [Sitkovskaja A.O., Zlatnik E.Ju., Shamova T.V. et al. The effect of T-regulatory cells separation from blood mononuclear cells on the generation of lymphokine-activated killers. Citologija = Cytology 2020;62(10):7–13 (In Russ.)].
- André F., Zielinski C.C. Optimal strategies for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer with currently approved agents. Ann Oncol 2012;23:vi46–51. DOI: 10.1093/annonc/mds195.
- Juliá E.P., Amante A., Pampena M.B. et al. Avelumab, an IgG1 anti-PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitor, Triggers NK Cell-Mediated Cytotoxicity and Cytokine Production Against Triple Negative Breast Cancer Cells. Front Immunol 2018;9:2140. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02140.
- DeGottardi M.Q., Okoye A.A., Vaidya M. et al. Effect of Anti-IL-15 Administration on T Cell and NK Cell Homeostasis in Rhesus Macaques. J Immunol 2016;197(4):1183–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1600065.
- Wagner J., Pfannenstiel V., Waldmann A. et al. A Two-Phase Expansion Protocol Combining Interleukin (IL)-15 and IL-21 Improves Natural Killer Cell Proliferation and Cytotoxicity against Rhabdomyosarcoma. Front Immunol 2017;8:676. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00676.
- Godfrey D.I., Stankovic S., Baxter A.G. Raising the NKT cell family. Nature Immunol 2010;11(3):197–206. DOI: 10.1038/ni.1841.
- Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. и др. Увеличение количества NKT-клеток – маркер раннего прогрессирования при адьювантной вакцинотерапии пациентов с метастатической меланомой кожи. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(4):82–9. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolina T.N. et al. Increase in NKT cells – a marker of early progressing at adjuvant vaccinotherapy of patients with a metastatic melanoma of skin. Rossijskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4):82–9 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-82-89.
- Godfrey D.I., Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. J Clin Invest 2004;114(10):1379–88. DOI: 10.1038/nri11309.
- Viale R., Ware R., Maricic I. et al. NKT cell subsets can exert opposing effects in autoimmunity, tumor surveillance and inflammation. Curr Immunol Rev 2012;8(4):287–96. DOI: 10.2174/157339512804806224.
- East J.E., Kennedy A.J., Webb T.J. Raising the roof: The preferential pharmacological stimulation of Th1 and Th2 response mediated by NKT cells. Med Res Rev 2014;34:45–76. DOI: 10.1002/med.21276.
- Черткова А.И., Славина Е.Г., Шоуа Э.К. и др. Основные параметры клеточного иммунитета у больных раком молочной железы с тройным негативным фенотипом. Медицинская иммунология 2018;20(5):667–80. [Chertkova A.I., Slavina E.G., Shoua Je.K. et al. The main parameters of cellular immunity in patients with triple-negative breast cancer: relationship with efficiency of chemotherapy. Medicinskaja immunologija = Medical immunology 2018;20(5):667–80 (In Russ.)]. DOI: 10.15789/1563-0625-2018-5.
- Nair S., Dhodapkar M.V. Natural killer T cells in cancer immunotherapy. Front Immunol 2017;8:1178. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01178.
- Bedolla D.E., Kenig S., Mitri E. et al. Further insights into the assessment of cell cycle phases by FTIR microspectroscopy. Vibrational Spectroscopy 2014;75:127–35.
- Elledge S.J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. Science 1996;274:1664–72. DOI: 10.1126/science.274.5293.1664.
- Akaike Y., Chibazakura T. Aberrant activation of cyclin a-CDK induces G2/m-phase checkpoint in human cells. Cell Cycle 2020;19:84–96. DOI: 10.1080/15384101.2019.1693119.
- Yang M., Li L., Chen S. et al. Melatonin protects against apoptosis of megakaryocytic cells via its receptors

- and the AKT/mitochondrial/caspase pathway. *Aging* (Albany NY) 2020;12(13):13633–46. DOI: 10.18632/aging.103483.
25. Дейнеко Н.Л., Дергунова Н.Н., Булычева Т.И. и др. Митогенное и токсическое действие фитогемагглютина на лимфоциты периферической крови человека в культуре. *Иммунология* 2003;4:205–8. [Dejneko N.L., Dergunova N.N., Bulycheva T.I. et al. The mitogenic and toxic effects produced by phytohemagglutinin on the peripheral-blood lymphocytes of man in culture. *Immunologija = Immunology* 2003;4:205–8 (In Russ.)].
 26. Варфоломеева М.И., Латышева Т.В., Сетдикова Н.Х. и др. Характеристика лимфоцитов периферической крови у больных с общей варибельной иммунологической недостаточностью и возможный путь коррекции нестойкости лимфоидных элементов. *Иммунология* 2002;6:340–3. [Varfolomeeva M.I., Latsheva T.V., Setdikova N.H. et al. Characteristics of peripheral blood lymphocytes in patients with general variable immunological insufficiency and a possible way of correcting the insolvency of lymphoid elements. *Immunologija = Immunology* 2002;6:340–3 (In Russ.)].
 27. Romee R., Leong J.W., Fehniger T.A. Utilizing Cytokines to Function-Enable Human NK Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Scientifica* (Cairo) 2014;2014:205796. DOI: 10.1155/2014/205796.
 28. Zhu L., Xie X., Zhang L. et al. TBK-binding protein 1 regulates IL-15-induced autophagy and NKT cell survival. *Nat Commun* 2018;9(1):2812. DOI: 10.1038/s41467-018-05097-5.
 29. Park J.Y., Keller H., Sato N., Park J.H. NKT cells require IL-7, not IL-15, for survival and homeostasis. *J Immunol* 2014;192(1 Supplement):65.18.
 30. Song Y., Liu Y., Hu R. et al. *In vivo* antitumor Activity of a Recombinant IL-7/IL-15 Hybrid Cytokine in Mice. *Mol Cancer Ther* 2016;15(10):2413–21. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0111.

Вклад авторов

А.О. Ситковская: анализ и интерпретация данных, написание текста статьи;
 Е.Ю. Златник: концепция и дизайн исследования;
 С.Ю. Филиппова: экспериментальная работа, техническое редактирование, оформление библиографии, подготовка иллюстраций;
 Е.С. Бондаренко: экспериментальная работа;
 Л.Н. Вашенко, Э.Э. Кечеджиева, И.Р. Дашкова, Е.А. Андрейко: получение образцов крови пациентов;
 И.А. Новикова: научное редактирование.

Authors contributions

A.O. Sitkovskaya: data analysis and interpretation, article text writing;
 E.Yu. Zlatnik: research concept and design;
 S.Yu. Filippova: experimental work, technical editing, preparation of bibliography and illustrations;
 E.S. Bondarenko: experimental work;
 L.N. Vaschenko, E.E. Kechedzhieva, I.R. Dashkova, E.A. Andreiko: obtaining blood samples from patients;
 I.A. Novikova: scientific editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.О. Ситковская / A.O. Sitkovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>
 Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
 С.Ю. Филиппова / S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>
 Л.Н. Вашенко / L.N. Vashenko: <https://orcid.org/0000-0002-7302-7031>
 И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А18-118072790017-9 «Разработка и применение новых методов клеточных технологий для иммунотерапии опухолей».

Financing. The work was carried out within the framework of the state assignment No АААА-А18-118072790017-9 “Development and application of new methods of cellular technologies for tumor immunotherapy”.

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

Informed consent. All patients signed informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 05.08.2020. Принята к публикации: 16.10.2020.

Article submitted: 05.08.2020. Accepted for publication: 16.10.2020.

DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73



Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы

Л. М. Борисова, В. Н. Осипов, Д. В. Гусев, И. С. Голубева, М. П. Киселева, А. А. Варганян

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

Контакты: Лариса Михайловна Борисова larib@inbox.ru

Введение. Резистентность к терапии является основной причиной клинического прогрессирования злокачественной опухоли на фоне лечения. Реактивировать апоптоз в резистентных клетках практически нереально, опухоль переходит в необратимую фазу роста. Опубликованные недавно данные о способности производных хиназолина, индукторов ферроптоза, вызывать гибель резистентных клеток открывают новые возможности для повышения эффективности противоопухолевой терапии.

Цель исследования – изучение индукции ферроптоза синтезированным аналогом эрастина OVN-002 в клетках меланомы Mel Z и оценка его противоопухолевой активности на перевиваемой меланоме B-16 мышей.

Материалы и методы. В экспериментах *in vitro* использованы 2D-культивирование метастатических клеток меланомы Mel Z, фазово-контрастная и флуоресцентная микроскопия. Исследования *in vivo* проведены на модели экспериментального роста меланомы B-16 у самок гибридов иммунокомпетентных мышей F1 (C57Bl/6 × DBA/2). Противоопухолевый эффект оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) и увеличению продолжительности жизни леченых животных по сравнению с животными контрольной группы.

Результаты. Гибель опухолевых клеток при воздействии OVN-002 и эрастина в концентрациях 10,0 мкМ происходила по механизму ферроптоза. Цитотоксическая активность OVN-002 была сравнима с активностью эрастина на клетках метастатической меланомы Mel Z: 744 ± 20 и 719 ± 20 у. е. соответственно. В экспериментах *in vivo* на меланоме B-16 в дозе 50 мг/кг OVN-002 оказал противоопухолевый эффект с ТРО 81–57 % ($p < 0,05$) до 7-го дня наблюдения, тогда как для эрастина отмечали только непосредственный эффект (ТРО 65 %, $p < 0,05$).

Заключение. Полученные данные позволяют предположить, что соединение OVN-002 может стать потенциальным противоопухолевым агентом для лечения меланомы.

Ключевые слова: производное хиназолина, ферроптоз, меланомы, противоопухолевая активность

Для цитирования: Борисова Л. М., Осипов В. Н., Гусев Д. В. и др. Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):67–73.

3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells

Larisa M. Borisova, Vasily N. Osipov, Dmitriy V. Gusev, Irina S. Golubeva, Marina P. Kiseleva, Amalia A. Vartanian

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

Contacts: Larisa Mikhailovna Borisova larib@inbox.ru

Introduction. The main cause of clinical progression of tumor under the conditions of treatment is the resistance. Reactivate apoptosis in resistant to chemotherapy cells is impossible, the tumor grows into an irreversible growth phase. Recently published data on the ability of ferroptosis inducers to induce the death of resistant cells opens up new possibilities for improving the effectiveness of antitumor therapy.

The purpose of the study – assessment of the mechanism of ferroptosis induction of the synthesized analogue of erastin OVN-002 on Mel Z melanoma cells and investigation of its antitumor activity on transplanted B-16 melanoma of mice.

Materials and methods. In this study 2D cultivation of metastatic Mel Z melanoma cells, phase-contrast and fluorescence microscopy, and a model of experimental growth of B-16 melanoma in female hybrids of immunocompetent mice F1 (C57Bl/6 × DBA/2) were used. The antitumor effect was evaluated by measurement of tumor growth inhibition (TGI, %) and increase of life span of the treated animals as compared to the control ones.

Results. The cytotoxic activity of OVN-002 was equal to the activity of erastin on metastatic melanoma cells Mel Z: 744 ± 20 and 719 ± 20 a. u., respectively. OVN-002 at a dose 50 mg/kg reduced the growth of experimental melanoma B-16 about 81 % (TGI 81–57 %, $p < 0.05$). The effect was stable up to 7th day, while erastin showed only a direct antitumor effect (TGI 65 %, $p < 0.05$).

Conclusion. The data obtained suggest that OVN-002 might be considered as a novel antitumor agent.

Key words: quinazoline derivative, ferroptosis, melanoma, antitumor activity

For citation: Borisova L.M., Osipov V.N., Gusev D.V. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivative, an analogue of erastin, induces ferroptosis in metastatic melanoma cells. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(1):67–73. (In Russ.).

Введение

Современная противоопухолевая терапия базируется в основном на индукции апоптоза в опухолевых клетках. Несмотря на существенное улучшение результатов химиотерапии, достигнутое в последние годы, в большинстве случаев лечение сопровождается развитием лекарственной резистентности [1]. Дальнейшее улучшение результатов лечения будет связано с преодолением репрессии апоптоза в опухолевых клетках. Обнаруженный недавно новый тип программируемой гибели клетки, ферроптоз, позволяет надеяться на продление ремиссии онкологических больных. Ферроптоз – железозависимая гибель клетки, при которой накапливаются продукты перекисного окисления фосфолипидов, основного компонента всех клеточных мембран. Окисление происходит при обязательном участии ионов железа. Избыток ионов железа Fe^{2+} , находящихся в несвязанном с ферритином или ферропортином состоянии, запускает реакцию Фентона, генерируются гидроксил-радикалы, окисляющие фосфолипиды клеточных мембран [2–4]. Противостоит массивному окислению липидов антиоксидантная система защиты клетки. Основные компоненты антиоксидантной системы клетки составляют глутатионпероксидаза (GPX4), которая восстанавливает потенциально опасные гидроперекиси липидов в нетоксичные спирты (дефицит GPX4 несовместим с жизнью), и глутатион, субстрат GPX4. Глутатион – трипептид, состоящий из глутамина, глицина и цистеина. Истощение запасов глутатиона усиливает перекисное окисление липидов и убивает клетку. Индукторы ферроптоза делят на ингибиторы GPX4 и соединения, блокирующие транспорт цистеина в клетку, в том числе такие как эрастин и его аналоги [5–8].

Следует отметить, что ферроптоз обнаружили в процессе поиска противоопухолевых соединений.

Исследователи из группы Stockwell, занимаясь скринингом соединений, направленных на индукцию гибели опухолевых клеток с мутацией в *RAS*-онкогене, обнаружили соединение эрастин, производное хиназолина, которое вызывало массовую гибель опухолевых клеток. При комбинировании эрастина с хелаторами железа стало ясно, что необычная гибель, обнаруженная ими, это железозависимая гибель клетки. Эти исследователи и ввели в 2012 г. термин «ферроптоз» [9].

В работе представлены результаты исследований влияния синтезированного аналога эрастина – бензил 2-((2-(3,5-диметил-1*H*-пиразол-1-ил)-4-оксохиназолин-3(4*H*)-ил)окси)ацетата (OVN-002) – на индукцию ферроптоза в метастатических клетках меланомы Mel Z и клетках перевиваемой меланомы B-16.

Целью настоящего исследования является изучение индукции гибели клетки по типу ферроптоза синтезированным аналогом эрастина OVN-002 в клетках меланомы Mel Z и оценка его противоопухолевой активности на перевиваемой меланоме B-16 мышей.

Материалы и методы

Культивирование клеток

В работе были использованы клетки меланомы Mel Z, полученной из опухолевого материала пациента с диссеминированной меланомой, проходившего лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [10].

Клетки меланомы Mel Z культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (HI-CLONE), 2 ммоль/мл глутамин и 0,1 мг/мл гентамицин (приобретены у «ПанЭко», Россия). В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

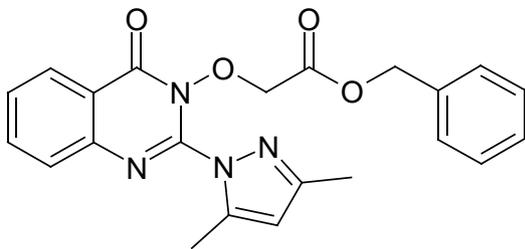


Рис. 1. Структурная формула OVN-002

Fig. 1. Structural formula OVN-002

Синтез бензил 2-((2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)-4-оксохиназолин-3(4H)-ил)окси)-ацетата (OVN-002) (рис. 1)

К раствору 256 мг (1,0 ммоль) 3-гидрокси-2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)хиназолин-4(3H)-она в 5 мл диметилсульфоксида (ДМСО) («ПанЭко», Россия) добавляли 138 мг (1,0 ммоль) мелкоизмельченного карбоната калия и по каплям вносили 185 мг (1,1 ммоль) бензилового эфира хлоруксусной кислоты. Перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, выливали в 15 мл холодной воды, отфильтровывали осадок, промывали на фильтре 2 раза по 10 мл воды и затем 10 мл гексана. Сушили на воздухе. Выход составлял 347 мг (86 %) белых кристаллов. Т.пл. 121–123 °С. Спектр ¹H ЯМР (360 МГц, ДМСО-*d*₆, δ м.д.) 8,20 (д, J = 8,0 Гц, 1H), 7,88 (т, J = 8,4 Гц, 1H), 7,79 (д, J = 8,4 Гц, 1H), 7,61 (т, J = 8,4 Гц, 1H), 7,34–7,39 (м, 5H), 6,12 (с, 1H), 6,12 (с, 1H), 5,22 (с, 2H), 5,15 (с, 2H), 2,44 (с, 3H), 2,10 (с, 3H).

Исследование влияния OVN-002 на индукцию ферроптоза *in vitro*

Клетки меланомы Mel Z растили в полной среде RPMI-1640 в 24-луночном планшете. Через 24 ч роста клеток в CO₂-инкубаторе при 37 °С добавляли 0,1; 1,0 и 10,0 мкМ эрастина или 0,1; 1,0 или 10,0 мкМ OVN-002 и инкубировали в течение 5 ч. Ранее было показано, что клетки меланомы Mel Z чувствительны к эрастину при концентрации 10,0 мкМ [11]. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде RPMI-1640 без индукторов ферроптоза.

Затем среду заменяли свежей, не содержащей сыворотки, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY (581/591) – индикатора перекисного окисления липидов (получен от Thermo Fisher Scientific, США). C11-BODIPY – это флуорофор, который, переходя из тиоэфира в сульфоксид, меняет флуоресцентные характеристики: убывает поглощение красного цвета и нарастает поглощение зеленого. После инкубирования с флуоресцентной меткой в течение 30 мин клетки трижды промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции определяли на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) при 510–550 нм.

Исследования *in vivo*

Животные. Исследования *in vivo* выполнены на самках мышей – гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) массой 20–22 г. Мышей получали из отдела лабораторных животных ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и свободном доступе к воде [12].

Опухолевая модель. Первичную оценку противоопухолевой активности соединения OVN-002 проводили на перевиваемой меланоме B-16 мышей.

Штамм меланомы B-16 поддерживали на самках мышей линии C57Bl/6 [13]. Для перевивки опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл (50 мг опухолевой массы) полученной суспензии вводили подкожно в область правой подмышечной впадины самкам гибридов мышей F1 (C57Bl/6 × DBA/2) [13].

Схема введения. Эрастин и OVN-002 вводили мышам ежедневно внутрибрюшинно в течение 5 дней. Начало введения – через 48 ч после трансплантации меланомы B-16. Соединение OVN-002 изучали в дозах 10, 15, 30, 50 и 100 мг/кг. Действие OVN-002 сравнивали с эффектом эрастина в дозе 50 мг/кг.

Эрастин растворяли в ДМСО («ПанЭко», Россия) и подкисляли соляной кислотой до pH 3,5, далее раствор разбавляли водой для инъекций до необходимой концентрации эрастина и содержания ДМСО не более 10 %.

OVN-002 растворяли в ДМСО, затем добавляли кислотный фосфатный буфер (pH 4,8) до концентрации 3 мг/мл и содержания ДМСО не более 10 %.

Группы мышей формировали с учетом получения статистически достоверных результатов: контрольная группа состояла из 10 животных, опытные группы – из 6 животных.

Критерии оценки противоопухолевого эффекта.

Наблюдение за мышами проводили до их гибели. Противоопухолевый эффект соединений оценивали по торможению роста опухоли (ТРО, %) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ, %) леченых мышей по сравнению с контрольными животными [14].

Для оценки ТРО проводили измерение 3 максимальных взаимно перпендикулярных размеров опухоли (*a* – длина, *b* – ширина, *c* – высота) у каждого животного, вычисляли ее объем, а затем средний объем опухоли в группе. Измерение объема опухоли проводили каждые 3–4 дня начиная с 1-го дня после окончания лечения животных по формуле 1:

$$V(\text{мм}^3) = a \times b \times c.$$

ТРО вычисляли по формуле 2:

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

где V_k – средний объем опухолей в контрольной группе (мм^3), V_o – средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

УПЖ вычисляли по формуле 3:

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

где СПЖ_k – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ_o – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 %. Эффективными считали дозы, вызывающие ТРО ≥ 70 % продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [14].

Статистическую значимость противоопухолевого эффекта по отношению к нелеченым особям контрольной группы определяли по методу Фишера–Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Исследования *in vitro*

Ранее нами был исследован дозозависимый эффект эрастина на рост клеток меланомы Mel Z. Было показано, что 0,1 и 1,0 мкМ эрастина не индуцировали ферроптоз в клетках меланомы. Гибель клеток Mel Z наблюдали при концентрации 10,0 мкМ [11]. О гибели клеток меланомы Mel Z по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов, которое фиксировали после инкубации клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY (581/591 нм).

Соединение OVN-002 также тестировали при 3 концентрациях: 0,1; 1,0 и 10,0 мкМ. При концентрации 0,1 мкМ соединение OVN-002 не индуцировало ферроптоз в клетках Mel Z; при 1,0 мкМ наблюдалась гибель 10–15 % клеток; гибель клеток, индуцированная 10,0 мкМ соединения OVN-002, была сравнима с гибелью клеток, индуцированной 10,0 мкМ эрастина (рис. 2). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции C11-BODIPY для 10,0 мкМ OVN-002 и эрастина была сравнима: 744 ± 20 и 719 ± 20 у. е. соответственно (см. рис. 2). В контрольных клетках и клетках, инкубированных с эквимолярным количеством ДМСО, интенсивность флуоресценции равнялась 202 ± 10 и 206 ± 10 у. е. соответственно.

Чувствительность клеток меланомы Mel Z к действию соединения OVN-002 позволила инициировать исследование его противоопухолевой активности на модели перевиваемой меланомы В-16 мышей.

Первичная оценка противоопухолевой активности OVN-002 *in vivo*

При изучении действия OVN-002 на меланому В-16 было выявлено, что в диапазоне доз 10–30 мг/кг соединение оказывало минимальный противоопухолевый эффект на уровне 48–59 % ТРО ($p < 0,05$ по отношению к контролю) (см. таблицу).

Результаты сравнительного исследования противоопухолевой активности OVN-002 и эрастина в дозе 50 мг/кг показали, что OVN-002 оказывал выраженное противоопухолевое действие на рост меланомы В-16 (см. таблицу). ТРО составляло 81–57 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю), эффект наблюдали в течение 7 дней после окончания лечения.

Введение эрастина вызывало кратковременное ТРО В-16 непосредственно после окончания лечения (ТРО 65 %; $p < 0,05$ по отношению к контролю).

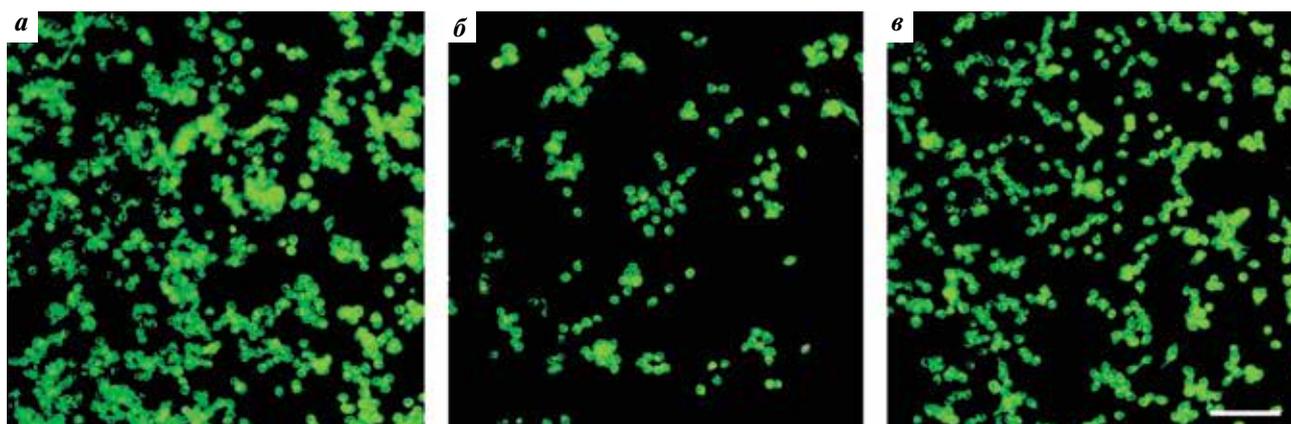


Рис. 2. OVN-002 индуцирует гибель клеток Mel Z по типу ферроптоза. Флуоресценция C11-BODIPY в клетках Mel Z: а – рост клеток с 10,0 мкМ OVN-002; б – контроль с 10 % ДМСО; в – рост клеток с 10,0 мкМ эрастина. $\times 200$

Fig. 2. Ferroptotic cell death induced by OVN-002. The fluorescence of C11-BODIPY in Mel Z: а – cells grown with 10.0 μM OVN-002; б – control cells with 10 % DMSO; в – cells grown with 10.0 μM of erastin. $\times 200$

Противоопухолевая активность OVN-002 на меланоме B-16

Antitumor activity of OVN-002 on B-16 melanoma

№ No.	Группа Group	Доза, мг/кг Dose, mg/kg	TPO, % TGI, %						УПЖ, % ILS, %
			Дни после окончания лечения Days after treatment						
			1	4	7	10	13	17	
1	OVN-002	10	59*	48*	53*	24	25	38	12
2		15	48*	10	36	12	18	24	5
3		30	56*	32	21	29	30	17	23
4		50	81*	69*	57*	46	33	55*	14
5		100	65*	62*	67*	56*	57*	43	29*
6	Эрастин	50	65*	22	28	1	0	0	3

* $p < 0,05$ различия достоверны по отношению к контролю.* $p < 0,05$ differences are significant in relation to control.**Примечание.** TPO – торможение роста опухоли; УПЖ – увеличение продолжительности жизни.

Note. TGI – tumor growth inhibition; ILS – increase of life span.

В этой дозе ни соединение OVN-002, ни эрастин достоверно не увеличивали продолжительность жизни мышей (УПЖ 14 и 3 % соответственно).

Увеличение дозы OVN-002 до 100 мг/кг приводило к более равномерному и длительному противоопухолевому эффекту: TPO составило 65–67 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю) в течение 7 дней после окончания лечения, далее эффект сохранялся на уровне TPO 57 % ($p < 0,05$) до 13-го дня наблюдения. В этой дозе получен эффект УПЖ на уровне 29 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю).

Следует отметить, что после введения соединений гибель мышей не отмечали ни в одной из опытных групп.

Обсуждение

Меланома – высокозлокачественная опухоль, резистентная к химио- и лучевой терапии [15], а также к антиангиогенной терапии. Высокая частота рецидивов, непредсказуемость клинического течения болезни и отсутствие эффективной системной терапии делают пессимистическими прогнозы при прогрессировании и метастазировании опухоли. Два независимых факта привели нас к синтезу и исследованию влияния аналога эрастина на рост метастатических клеток меланомы: во-первых, индукторы ферроптоза способны вызывать гибель резистентных к терапии опухолевых клеток [15, 16], во-вторых, эрастин плохо растворим в воде и нестабилен [17, 18].

«Золотым стандартом» индукции ферроптоза и сегодня продолжает оставаться эрастин. В последнее время эрастин рассматривается как перспективное противоопухолевое соединение, способное повысить

эффективность стандартной химио- и лучевой терапии [19]. Эрастин содержит в молекуле структурный фрагмент хиназолина, который, очевидно, важен для проявления такого типа активности [9, 20]. Нами была модифицирована структура эрастина с заменой заместителей во 2-м и 3-м положении хиназолинового цикла. Во 2-м положении был введен пиразольный цикл, а в 3-м – гидроксильная группа, алкилированная бензиловым эфиром уксусной кислоты. Предполагалось, что такая замена должна привести к усилению активности данного соединения по сравнению с эрастином.

In vitro исследование соединения OVN-002 показало, что его активность не только приближалась к активности эрастина при одинаковой концентрации в 10,0 мкМ, но и незначительно превышала эффект эрастина на клетках меланомы Mel Z. Обнаруженная в опытах *in vitro* цитотоксическая активность OVN-002 явилась основанием для исследования его противоопухолевой активности на экспериментальной модели меланомы B-16 мышей. Исследование аналогов эрастина *in vivo* в настоящее время лимитировано низкой биодоступностью соединений, обусловленной их плохой растворимостью в воде [17, 18]. Поэтому J. Сао и соавт. использовали в качестве растворителя 0,625 % ДМСО [21]. Другие авторы растворяли эрастин в 5 % ДМСО с кукурузным маслом или в 0,1 % ДМСО [22, 23]. Также эрастин растворяли в 2 % ДМСО с последующим добавлением 98 % физиологического раствора с фосфатным буфером [24]. Синтезированный аналог эрастина OVN-002 также плохо растворялся в воде. Для *in vivo* экспериментов соединение OVN-002 растворяли в ДМСО, затем добавляли кислотный фосфатный буфер (рН 4,8), получая раствор с содержанием ДМСО не более 10 %.

При первичной оценке противоопухолевой активности соединения OVN-002 *in vivo* на меланоме В-16 выявлено, что соединение в дозе 50 мг/кг оказало эффект в виде ТРО 81–57 % ($p < 0,05$) в течение 7 дней после окончания лечения. В то же время эрастин в аналогичной дозе показал лишь кратковременный эффект (ТРО 65 %, $p < 0,05$) в 1-й день наблюдения. При увеличении дозы OVN-002 до 100 мг/кг получен более длительный противоопухолевый эффект: ТРО составило 65–57 % до 13-го дня наблюдения. В этой дозе соединение оказало эффект УПЖ на 29 % ($p < 0,05$), что превышало, хотя и незначительно, минимальное значение критерия (УПЖ 25 %).

К сожалению, в данном эксперименте доза эрастина 100 мг/кг не была испытана, что предполагается сделать в последующих исследованиях.

Несмотря на несомненную перспективность эрастина, к настоящему времени нет внедренного в клиническую практику препарата, индуцирующего ферроптоз в опухолевых клетках. Полученные данные об индукции гибели метастатических клеток меланомы Mel Z и первичная оценка противоопухолевой активности соединения OVN-002 могут служить основанием для продолжения исследований и синтеза новых производных хиназолина с более высокой активностью.

Заключение

Сегодня уже нет сомнений, что одной из основных причин клинического прогрессирования опухоли на фоне лечения является резистентность к терапии. Достигнуть реактивации апоптоза в резистентных клетках практически невозможно. Заболевание вступает в терминальную неконтролируемую фазу роста.

Опубликованные недавно данные о способности индукторов ферроптоза вызывать гибель метастатических опухолевых клеток привели нас к инициации поиска низкомолекулярных активаторов ферроптоза.

Проведенные исследования показали, что производное хиназолина OVN-002 проявляет цитотоксическую активность, сравнимую с активностью эрастина, на клетках метастатической меланомы Mel Z: в концентрации 10,0 мкМ значения флуоресценции C11-BODIPY для OVN-002 и эрастина составляли 744 ± 20 и 719 ± 20 у. е. соответственно.

OVN-002 оказывает более высокий противоопухолевый эффект на меланому В-16 мышшей по сравнению с эрастином: ТРО 81–57 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю) до 7-го дня и ТРО 65 % ($p < 0,05$) в 1-й день после окончания лечения соответственно.

Полученные предварительные результаты дают возможность продолжить поиск соединений, индуцирующих ферроптоз.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Свирновский А.И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема. Международные обзоры: Клиническая практика и здоровье 2014;5(11):15–37. [Svirnovsky A.I. The resistance of tumor cells to therapeutic influences as a biomedical problem. *Mezhdunarodnie obzory: klinicheskaya praktika i zdorovie* = International Reviews: Clinical Practice and Health 2014;5(11):15–37 (In Russ.)].
- Xie Y., Hou W., Song X. et al. Ferroptosis: Process and function. *Cell Death Differ* 2016;23(3):369–79. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.
- Вартанян А.А. Метаболизм железа, ферроптоз, рак. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(3):14–20. [Vartanian A.A. Iron metabolism, ferroptosis and cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2017;16(3):14–20 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20.
- Bogdan A.R., Miyazawa M., Hashimoto K. et al. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends Biochem Sci* 2016;41(3):274–86. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.11.012.
- Lo M., Ling V., Wang Y.Z. et al. The xc-cystine/glutamate antiporter: a mediator of pancreatic cancer growth with a role in drug resistance. *Br J Cancer* 2008;99:464–72. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604485.
- Yang W.S., Sriramaratnam R., Welsch M.E. et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell* 2014;156:317–31. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.010.
- Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016;26(3):165–76. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.014.
- Lewerenz J., Hewett S., Huang Y. et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(5):522–55. DOI: 10.1089/ars.2011.4391.
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Демидов Л.В. и др. Клеточная линия меланомы человека Mel Z, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Патент на изобретение RU 2390556 C1, 27.05.2010. [Mikhajlova I.N., Baryshnikov A.J., Demidov L.V. et al. Human melanoma cell line Mel Z used for making anti-tumor vaccines. Patent of Invention RU 2390556 C1, 27.05.2010. (In Russ.)].
- Вартанян А.А., Осипов В.Н., Хоченков Д.А. и др. Производные хиназолина, индуцирующие ферроптоз в метастатических клетках меланомы и рака толстой кишки. Патент на изобретение RU 2722308 C1, 2020. [Vartanian A.A., Osipov V.N., Khochenkov D.A. et al. Quinazoline derivatives inducing ferroptosis in metastatic melanoma cells and colon cancer. Patent of Invention RU 2722308 C1, 2020. (In Russ.)].
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд. Пер. с англ. под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017. 336 с. [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. Transl. from Eng. by I.V. Belozertseva, D.V. Blinov, M.S. Krasilschikova. Moscow: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].

13. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьина, А.Б. Сыркина, А. Голдин, И. Кляйн. М.: Медицина, 1980. 296 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: Meditsina, 1980. 296 p. (In Russ.)].
14. 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 the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. Moscow: Grif i K., 2012. Pp. 642–57 (In Russ.)].
15. Tsoi J., Robert L., Paraiso K. et al. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell* 2018;33(5):890–904.e5. DOI: 10.1016/j.ccell.2018.03.017.
16. Yu Y., Xie Y., Cao L. et al. The ferroptosis inducer erastin enhances sensitivity of acute myeloid leukemia cells to chemotherapeutic agents. *Mol Cell Oncol* 2015;2(4):e1054549. DOI: 10.1080/23723556.2015.1054549.
17. Viswanathan V.S., Ryan M.J., Dhruv H.D. et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547(7664):453–7. DOI: 10.1038/nature23007.
18. Hangauer M.J., Viswanathan V.S., Ryan M.J. et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition. *Nature* 2017;551(7679):247–50. DOI: 10.1038/nature24297.
19. Zhao Y., Li Y., Zhang R. et al. The Role of Erastin in Ferroptosis and Its Prospects in Cancer Therapy. *Onco Targets Ther* 2020;13:5429–41. DOI: 10.2147/OTT.S254995.
20. Dixon S.J., Patel D.N., Stockwell B.R. Pharmacological inhibition of cystine-glutamate exchange induces endoplasmic reticulum stress and ferroptosis. *Elife* 2014;3:e02523. DOI: 10.7554/eLife.02523.
21. Cao J., Chen X., Jiang L. et al. DJ-1 suppresses ferroptosis through preserving the activity of S-adenosyl homocysteine hydrolase. *Nature communications* 2020;11:1251. DOI: 10.1038/s41467-020-15109-y.
22. Luo M., Wu L., Zhang K. et al. miR-137 regulates ferroptosis by targeting glutamine transporter SLC1A5 in melanoma. *Cell Death & Differentiation* 2018;25:1457–72. DOI: 10.1038/s41418-017-0053-8.
23. Shiromizu Sh., Yamauchi T., Kusunose N. et al. Dosing Time-Dependent Changes in the Anti-tumor Effect of xCT Inhibitor Erastin in Human Breast Cancer Xenograft Mice. *Biol Pharm Bull* 2019;42(11):1921–5. DOI: 10.1248/bpb.b19-00546.
24. Sun X., Ou Z., Xie M. et al. HSPB1 as a novel regulator of ferroptotic cancer cell death. *Oncogene* 2015;34(45):5617–25. DOI: 10.1038/onc.2015.32.

Вклад авторов:

Л.М. Борисова: разработка дизайна исследования, обсуждение результатов, редактирование рукописи;

В.Н. Осипов: синтез и подтверждение структуры соединения;

А.А. Вартамян: исследования *in vitro*, обсуждение результатов, написание рукописи;

Д.В. Гусев: обсуждение дизайна синтеза соединения;

И.С. Голубева: трансплантация опухоли, исследование *in vivo*;

М.П. Киселева: обработка результатов исследования *in vivo*.

Authors contributions:

L.M. Borisova: study design, results discussion, manuscript editing;

V.N. Osipov: the synthesis and confirmation of OVN-002 structure;

A.A. Vartanian: *in vitro* studies, results discussion, manuscript writing;

D.V. Gusev: discussion of OVN-002 synthesis design;

I.S. Golubeva: tumor transplantation, *in vivo* studies;

M.P. Kiseleva: *in vivo* studies results processing.

ORCID авторов/ORCID of authors

Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0001-6554-1949>

В.Н. Осипов / V.N. Osipov: <https://orcid.org/0000-0001-7726-4467>

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

Д.В. Гусев / D.V. Gusev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8265>

И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>

М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>

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-А19-119021890101-1

«Разработка подходов к созданию противоопухолевых агентов на основе соединений – потенциальных индукторов ферроптоза».

Financing. The study was performed in the framework research work № АААА-А19-119021890101-1 “Development of approaches to the creation of antitumor agents based on compounds – potential inducers of ferroptosis”.

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: 11.11.2020. **Принята в печать:** 24.12.2020.

Article submitted: 11.11.2020. **Accepted for publication:** 24.12.2020.



Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269

М.В. Дмитриева¹, Бу Лугэнь², А.П. Полозкова¹, О.Л. Орлова¹, И.И. Краснюк², И.И. Краснюк (мл.)²

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

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

Контакты: Мария Вячеславовна Дмитриева dmitrieva.m@ronc.ru

Введение. Одной из ключевых задач при сублимационном высушивании лекарственного препарата является выбор оптимального криопротектора (КП), обеспечивающего получение качественного лиофилизированного продукта.

Цель исследования. Выбор КП и его концентрации для получения лиофилизата липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269.

Материалы и методы. Субстанция ЛХС-1269 ≥99 % (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России), яичный фосфатидилхолин Е РС S (Lipoid, Германия), холестерин ≥99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтаноламин (Lipoid, Германия), манноза-D (+) 99 % (Kaden, Германия), сахароза ЧДА («Химмед», Россия), трегалозы дигидрат ОСЧ («Химмед», Россия). Для получения липосом ЛХС-1269 использовали метод Бенгхема в модификации для гидрофобных субстанций с последующей экструзией дисперсии многослойных фосфолипидных везикул. Готовую липосомальную дисперсию дозировали во флаконы по 6 мл и лиофилизировали в камере сублимационной установки с использованием режима «ступенчатого» замораживания. Липосомы ЛХС-1269 анализировали до и после сублимационного высушивания с применением методов лазерной спектроскопии рассеяния и определения электрофоретической подвижности частиц.

Результаты. Для предотвращения разрушения липосом ЛХС-1269 в процессе лиофилизации исследовали вещества из класса углеводов: маннозу, сахарозу и трегалозу в 2 концентрациях. В ходе сравнительной оценки полученных лиофилизатов по показателям качества – внешний вид, регидратируемость, размер и дзета-потенциал липосом до и после сублимации – установлено, что оптимальными криопротективными свойствами обладает сахароза, вводимая в состав липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269 в молярном соотношении сахароза/яичный фосфатидилхолин 5:1.

Заключение. В результате проведенного исследования выбран оптимальный КП и его концентрация, обеспечивающие получение качественного лиофилизата липосомальной композиции производного индолокарбазола ЛХС-1269.

Ключевые слова: лиофилизация, криопротектор, липосомы, яичный фосфатидилхолин, ЛХС-1269

Для цитирования: Дмитриева М.В., Лугэнь Бу, Полозкова А.П. и др. Выбор криопротектора для получения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1269. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):74–9.

Selection of a cryoprotector for production a lyophilized liposomal dosage form of the indolocarbazole derivative LHS-1269

Maria V. Dmitrieva¹, Bu Lugen², Alevtina P. Polozkova¹, Olga L. Orlova¹, Ivan I. Krasnyuk², Ivan I. Krasnyuk (Jr.)²

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

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

Contacts: Maria Vyacheslavovna Dmitrieva dmitrieva.m@ronc.ru

Introduction. One of the key tasks in freeze-drying of drug is to choose the optimal cryoprotector that provides a high-quality lyophilized product.

The aim of research. Selection of cryoprotectant and its concentration for the preparation of lyophilizate of the liposomal dosage form of the indolocarbazole derivative LHS-1269.

Materials and methods. Substance LHS-1269 $\geq 99\%$ (N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology), egg phosphatidylcholine E PC 5 (Lipoid, Germany), cholesterol $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, Japan), polyethylene glycol-2000-distearoyl phosphatidylethanolamine (Lipoid, Germany), mannose-d (+) 99 % (Kaden, Germany), sucrose (Himed, Russia), trehalose dihydrate (Himed, Russia). To obtain LHS-1269 liposomes, the Bangham method was used in modification for hydrophobic substances with subsequent extrusion of the dispersion of multilayer phospholipid vesicles. The prepared liposomal dispersion was dosed into vials of 6 ml and lyophilized in the freeze-drying chamber using the «step-by-step» freezing mode. LHS-1269 liposomes were analyzed before and after freeze-drying using laser scattering spectroscopy and determination of the electrophoretic mobility of particles.

Results. To prevent the destruction of LHS-1269 liposomes during lyophilization, substances from the carbohydrates class – mannose, sucrose and trehalose – were studied in two concentrations. In the course of comparative evaluation of the obtained lyophilizates in terms of quality, appearance, rehydration, size and zeta potential of liposomes before and after sublimation, it was found that sucrose introduced into the liposomal dosage form LHS-1269 in the molar ratio sucrose/egg phosphatidylcholine 5:1 has optimal cryoprotective properties.

Conclusion. As a result of the study, the optimal cryoprotector and its concentration were selected, which ensure the production of high-quality lyophilizate of the liposomal composition of the indolocarbazole derivative LHS-1269.

Key words: lyophilization, cryoprotector, liposomes, egg phosphatidylcholine, LHS-1269

For citation: Dmitrieva M.V., Lugen Bu, Polozkova A.P. et al. Selection of a cryoprotector for production a lyophilized liposomal dosage form of the indolocarbazole derivative LHS-1269. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):74–9. (In Russ.).

Введение

За несколько десятков лет использования сублимационная сушка превратилась из лабораторной технологии в устоявшийся метод консервации широкого спектра фармацевтических продуктов. В течение этого периода были разработаны фундаментальные концепции, касающиеся разработки рецептур и процессов лиофилизации [1].

Технология процесса лиофилизации применяется прежде всего к лекарственным препаратам, которые нестабильны в водных растворах при комнатной температуре, для обеспечения более длительного срока хранения [2]. Липосомальная форма лекарственного вещества представляет собой гетерогенную дисперсную систему, где в качестве жидкой дисперсионной среды выступает вода, а дисперсионной фазы – собственно липосомы, сферические везикулы субмикронного диаметра, содержащие 1 или несколько биосовместимых липидных бислоев с водным ядром. Такие водные дисперсии обладают физической и химической нестабильностью, характеризующейся процессами окисления и гидролиза липосомальных липидов, в особенности ненасыщенных фосфолипидов, агрегацией или слиянием липосом. Данная проблема ограничивает широкое использование липосомальных препаратов и часто приводит к сокращению срока годности продукта [3]. Перевод посредством сублимационной сушки жидких липосомальных препаратов в безводную форму, в которой менее вероятна химическая деградация липидных компонентов, по-

зволяет повысить стабильность при хранении и обеспечивает увеличение срока годности соответствующих фармацевтических продуктов при сохранении их терапевтической эффективности. Поскольку липосомы рассматриваются как упрощенная модель клеточной мембраны, для их лиофилизации используются те же методические подходы, которые применяются для биологических клеточных объектов [4].

Известно, что лиофилизация изменяет физическую структуру липосом. При замораживании липидные бислои могут разрываться в процессе образования кристаллов льда из водных фаз как внутри, так и снаружи везикул. Кроме того, во время сушки липосомы могут агрегировать или сливаться с образованием более крупных липидных частиц, вызывая утечку лекарственного вещества. Во время регидратации целостность липидного бислоя также может быть нарушена из-за фазовых переходов липидов [2]. Для предотвращения данных процессов и стабилизации липосомальной структуры в состав дисперсии вводят специальные вспомогательные вещества – криопротекторы (КП).

Криопротекторы играют важную роль в защите структурной целостности липосом во время сублимационной сушки и последующего хранения. Несмотря на то что в технологии лиофилизации в качестве КП могут быть использованы соединения различных химических классов – спирты, альдегиды, амины, аминокислоты и их амиды, оксиды, полимеры и др. [5, 6], для сублимационного высушивания липосом

в основном применяют углеводы — моно- и дисахариды [7, 8]. После добавления в дисперсные липосомные системы молекулы сахара образуют водородные связи с фосфолипидами. Таким образом, температура фазового перехода кристаллического геля в жидкость уменьшается из-за менее плотно упакованных фосфолипидов. Это позволяет липосомальной мембране сохранять единую фазу во время процессов сушки и регидратации, предотвращая структурные переходы и утечку лекарственного вещества [2].

В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России разработана липосомальная лекарственная форма гидрофобного производного индолюкарбазола ЛХС-1269 на основе ненасыщенного яичного фосфатидилхолина (ЯФХ) [9]. В связи с низкой стабильностью водной дисперсии липосом индолюкарбазола предложено ее сублимационное высушивание.

Цель исследования — выбор КП и его концентрации для получения лиофилизата липосомальной лекарственной формы производного индолюкарбазола ЛХС-1269.

Материалы и методы

Материалы и реактивы: субстанция ЛХС-1269 ≥ 99 % (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России), ЯФХ E PC S (Lipoid, Германия), холестерин ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Япония), полиэтиленгликоль-2000-дистеароилфосфатидилэтанолamina (Lipoid, Германия), манноза-D (+) 99 % (Kaden, Германия), сахароза ЧДА («Химмед», Россия), трегалозы дигидрат ОСЧ («Химмед», Россия); хлороформ ХЧ, стабилизированный этанолом («Химмед», Россия); ацетон ЧДА («Химмед», Россия), вода для инъекций ФС. 2.2.0019.18; нейлоновые мембранные фильтры Pall N66 диаметром 47 мм с размером пор 1,2; 0,45 и 0,22 мкм (ООО «Палл Евразия», Россия).

Оборудование: весы электронные DL-120 (A&D Co., LTD, Япония), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), испаритель роторный Heidolph Nei-VAP Advantage с отгонной колбой на 2 л (Heidolph, Германия), экструдер Lipex™ на 100 мл (Northern Lipids, Inc., Канада), ультразвуковая ванна Transsonic T310 (Elma, Германия), спектрофотометр Cary 100 (Agilent Technologies, Австралия), дзетасайзер Nanoseries Nano-ZS 3600 (Malvern, Великобритания), установка сублимационной сушки Edwards Minifast DO.2 (Ero Electronic S.p.A., Италия).

Методы. *Получение липосом с ЛХС-1269.* Липосомы получали по методу Бэнгхема в модификации для гидрофобных субстанций с последующей экструзией дисперсии многослойных фосфолипидных везикул ЛХС-1269. Более подробное описание метода

получения липосом ЛХС-1269 представлено в работе Б. Лугэнь и соавт. [9].

Лиофилизация липосом с ЛХС-1269. К липосомальной дисперсии после экструзии добавляли навеску исследуемого КП, перемешивали до полного растворения и проводили стерилизующую фильтрацию через нейлоновые мембраны с размером пор 0,22 мкм. Полученную дисперсию разливали во флаконы по 6 мл и помещали в камеру сублимационной сушки при комнатной температуре +20...+25 °С. Препарат замораживали, используя «ступенчатый» подход к снижению температуры: от комнатной температуры до -5 °С с выдерживанием при данной температуре в течение 30 мин для равномерного охлаждения продукта и далее от -5 до -40 °С со скоростью -10 °С/ч. После достижения и уравнивания минимальной температуры продукта (-40 °С) флаконы с препаратом выдерживали в течение 3 ч и начинали откачку воздуха из камеры сублимационной установки. После включения вакуумного насоса и выравнивания вакуума (около 3 ч) осуществляли нагрев полок до температуры -25 °С со скоростью +2,5 °С/ч и выдерживание полок на температуре -25 °С в течение 2,5 ч, нагрев полок до температуры -5 °С со скоростью 1 °С/ч и нагрев полок до комнатной температуры +20...+22 °С со скоростью +5 °С/ч. Препарат досушивали для удаления остаточной влаги около 3 ч по критерию неизменности остаточного давления паров в сублимационной камере.

Определение среднего диаметра и дзета-потенциала (ζ -потенциала) липосом ЛХС-1269. Оценку размера липосом ЛХС-1269 до и после лиофилизации проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния, ζ -потенциала — посредством измерения электрофоретической подвижности везикул. Для этого 100 мкл исследуемого образца свежеприготовленной или полученной после редиспергирования липосомальной дисперсии помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили водой до метки. 1 мл полученного образца вносили в полистирольную кювету, которую помещали в ячейку дзетасайзера и проводили измерение показателей.

Результаты

Одной из задач разработки лиофилизированной формы любого фармацевтического продукта является выбор КП, который бы обеспечивал получение качественного лиофилизата в виде сухой пористой массы, способной к регидратации с образованием исходной гомогенной дисперсии с оптимальными физико-химическими характеристиками.

При проведении эксперимента по выбору оптимального КП для получения лиофилизата липосом ЛХС-1269 исследовали 3 наиболее широко используемых углевода — маннозу, сахарозу и трегалозу.

Значения размера и ζ -потенциала липосом ЛХС-1269 до лиофилизации с различными криопротекторами

Values of the size and ζ -potential of LHS-1269 liposomes before lyophilization with various cryoprotectors

Криопротектор Cryoprotector	Молярное соотношение криопротектор/ЯФХ Molar ratio Cryoprotector/ EPC	Средний размер липосом, нм The average size of the liposomes, nm	Среднее значение ζ -потенциала липосом, мВ The average value of ζ -potential of liposomes, mV
Контроль Control	—	169	-22,3
Манноза Mannose	8:1	166	-16,4
	10:1	155	-24,6
Сахароза Sucrose	4:1	146	-23,2
	5:1	146	-25,5
Трегалоза Trehalose	4:1	153	-22,3
	5:1	155	-24,2

Примечание. ЯФХ — яичный фосфатидилхолин.

Note. EPC — Egg phosphatidylcholine.

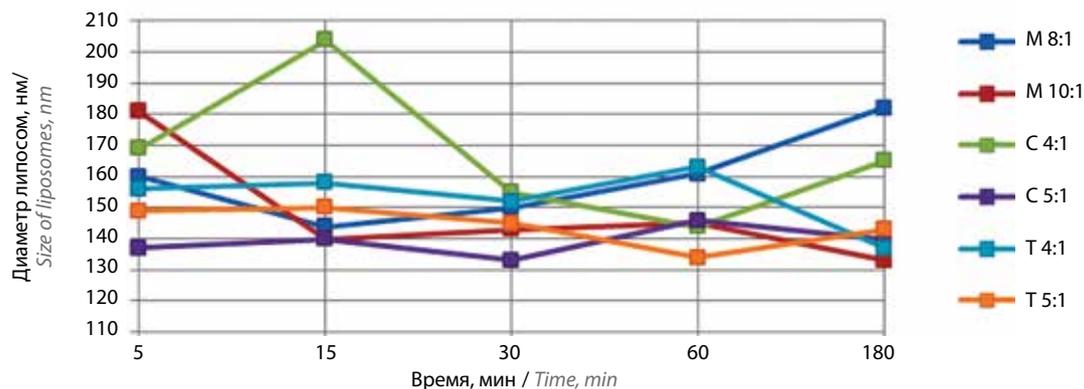


Рис. 1. Среднее значение размера липосом ЛХС-1269 через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после редиспергирования в воде для инъекций лиофилизатов, содержащих исследуемые криопротекторы. М — манноза, С — сахароза, Т — трегалоза

Fig. 1. The average value of the liposome size of LHS-1269 at 5, 15, 30, 60 and 180 min after redispersion in water for injection of lyophilizates containing the studied cryoprotectors. M — mannose, C — sucrose, T — trehalose

Поскольку КП обеспечивает защитное действие именно в отношении липидного бислоя липосомы за счет связывания с фосфолипидами, одним из условий успешной лиофилизации является соблюдение молярного соотношения КП/фосфолипид. Маннозу вводили в липосомальную дисперсию ЛХС-1269 в молярных соотношениях КП/ЯФХ 8:1 и 10:1, дисахара — 4:1 и 5:1, что обусловлено различием в химическом строении и молекулярной массе данных соединений. В качестве контроля использовали липосомальную дисперсию, не содержащую КП. Сравнительную оценку качества полученных лиофилизатов проводили по таким показателям, как описание, регидратируемость/редиспергируемость, средний размер и ζ -потенциал липосом до сублимационного высушивания (см. таблицу) и после регидратации в воде через определенные промежутки времени — 5, 15, 30, 60 и 180 мин.

Все образцы лиофилизатов представляли собой сухую пористую массу в виде таблетки. При редиспергировании контрольного лиофилизата в воде для инъекций образовалась неоднородная вязкая масса с 2 фракциями везикул, средний размер которых в течение всего исследуемого периода времени варьировал в диапазоне 276–833 нм для преобладающей фракции (90 % и более) и 21–56 нм для меньшей фракции, а значение ζ -потенциала находилось в пределах от -26,6 до -28,9 мВ.

При сравнении образцов лиофилизатов с маннозой, сахарозой и трегалозой установлено, что химическая природа углевода играет лишь незначительную роль в формировании лиофилизата, поскольку все указанные сахара проявили требуемые криопротекторные свойства при лиофилизации исследуемых липосом. Практически во всех 6 образцах после регидратации отмечалось уменьшение или незначительное

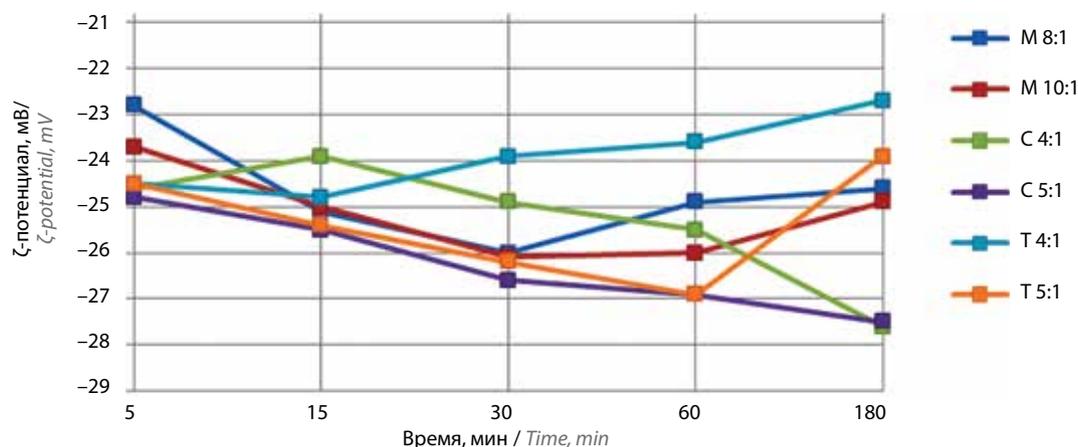


Рис. 2. Среднее значение ζ -потенциала липосом ЛХС-1269 через 5, 15, 30, 60 и 180 мин после редиспергирования в воде для инъекций лиофилизатов, содержащих исследуемые криопротекторы. М – манноза, С – сахароза, Т – трегалоза

Fig. 2. Average value of the ζ -potential of LHS-1269 liposomes at 5, 15, 30, 60 and 180 min after redispersion in water for injection of lyophilizates containing the studied cryoprotectors. M – mannose, C – sucrose, T – trehalose

укрупнение среднего диаметра везикул и повышение ζ -потенциала по модулю (рис. 1, 2) по сравнению со значениями, полученными до лиофилизации. Исключение составил лиофилизат с сахарозой 4:1 – на протяжении исследуемого периода времени (180 мин) наблюдались значительные колебания размера везикул (см. рис. 1).

При редиспергировании образцов с маннозой 8:1 и трегалозой 4:1 получали неустойчивые во времени липосомальные дисперсии. Спустя 15–30 мин после добавления воды для инъекций фиксировали минимальные значения диаметра и ζ -потенциала везикул, однако затем наблюдали их укрупнение и снижение поверхностного заряда по модулю. Стабильность дисперсий удалось повысить при использовании КП в большей концентрации. На протяжении 3 ч после редиспергирования лиофилизатов отмечали сохранение среднего размера липосом, содержащих маннозу 10:1, сахарозу 5:1 и трегалозу 5:1 (см. рис. 1). Однако стойкое повышение уровня ζ -потенциала с $-24,8$ до $-27,5$ мВ в течение 180 мин наблюдали только для дисперсии, содержащей сахарозу в молярном соотношении КП/ЯФХ 5:1, что свидетельствует о ста-

бильности липосомальной структуры и снижении риска слияния и/или агрегации везикул.

Заключение

Сохранение физической целостности липосомальной структуры в процессе сублимационного высушивания имеет первостепенное значение и может быть достигнуто путем включения в состав лекарственной формы специального эксципиента – КП. При исследовании образцов лиофилизированных липосом ЛХС-1269 с маннозой, сахарозой и трегалозой в 2 молярных соотношениях КП/ЯФХ установлено, что на качество продукта в первую очередь влияет концентрация используемого углевода и лишь незначительно – его структура. В результате сравнительной оценки полученных лиофилизатов по показателям качества – описание внешнего вида, регидратируемость, размер и ζ -потенциал липосом до и после сублимации, установлено, что оптимальными криопротективными свойствами обладает сахароза, вводимая в состав липосомальной лекарственной формы ЛХС-1269 в молярном соотношении сахароза/ЯФХ 5:1.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kasper J.C., Winter G., Friess W. Recent advances and further challenges in lyophilization. *Eur J Pharm Biopharm* 2013;85(2):162–9. DOI: 10.1016/j.ejpb.2013.05.019.
- Wang Y., Grainger D.W. Lyophilized liposome-based parenteral drug development: reviewing complex product design strategies and current regulatory environments. *Adv Drug Deliv Rev* 2019;151–152:56–71. DOI: 10.1016/j.addr.2019.03.003.
- Ghanbarzadeh S., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. The effects of lyophilization on the physico-chemical stability of sirolimus liposomes. *Adv Pharm Bull* 2013;3(1):25–9. DOI: 10.5681/apb.2013.005.
- Шанская А.И., Пучкова С.М., Хмылова Г.А., Недачина Н.А. Липосомальный препарат Липоферол для внутривенного введения с альфа-токоферолом. Актуальные вопросы трансфузиологии и клинической

- медицины 2015;1:156–8. [Shanskaya A.I., Puchkov S.M., Chmielova G.A., Neudachina N.A. Liposomal drug Lipoferum for intravenous administration with alpha-tocopherol. Actualniye voprosi transfuziologii i klinicheskoy meditsini = Topical issues of Transfusiology and clinical medicine 2015;1:156–8. (In Russ.)].
5. Костяев А.А., Утемов С.В., Андреев А.А. и др. Анналы криобиологии. Классификация криопротекторов и криоконсервантов для клеток крови и костного мозга. Вестник гематологии 2016;12(3):23–7. [Kostyaev A.A., Utemov S.V., Andreev A.A. et al. Annals of Cryobiology. Classification of cryoprotectors and cryopreservants for blood cells and bone marrow. Vestnik gematologii = Bulletin of Hematology 2016;12(3):23–7. (In Russ.)].
6. Izutsu K.I. Applications of freezing and freeze-drying in pharmaceutical formulations. Adv Exp Med Biol 2018;1081:371–83. DOI: 10.1007/978-981-13-1244-1_20.
7. Guimarães D., Noro J., Silva C. et al. Protective effect of saccharides on freeze-dried liposomes encapsulating drugs. Front Bioeng Biotechnol 2019;7:424. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00424.
8. Li J., Hu M., Xu H. et al. Influence of type and proportion of lyoprotectants on lyophilized ginsenoside Rg3 liposomes. J Pharm Pharmacol 2016;68(1):1–13. DOI: 10.1111/jphp.12489.
9. Лугэнь Б., Дмитриева М.В., Орлова О.Л. и др. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолакарбазола. Разработка и регистрация лекарственных средств 2020;9(3):21–6. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26. [Lugen B., Dmitrieva M.V., Orlova O.L. et al. Development of a liposomal dosage form based on hydrophobic derivative of indolo-carbazole. Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration 2020;9(3):21–6. (In Russ.)].

Вклад авторов

М.В. Дмитриева, Бу Лугэнь: дизайн исследования, проведение экспериментов и анализ данных, написание текста статьи и подготовка к публикации;

А.П. Полозкова, О.Л. Орлова: лиофилизация образцов, редактирование статьи;

И.И. Краснюк, И.И. Краснюк (мл.): дизайн исследования, перевод, проверка конечной версии рукописи.

Authors contributions

M.V. Dmitrieva, Bu Lugen: research design, carrying experiments and data analysis, writing the text of the article and preparing for publication;

A.P. Polozkova, O.L. Orlova: lyophilization of samples, editing of the article;

I.I. Krasnyuk, I.I. Krasnyuk (jr.): research design, translation, verification of the final version of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Дмитриева / M.V. Dmitrieva: <https://orcid.org/0000-0001-6740-5692>

Бу Лугэнь / Bu Lugen: <https://orcid.org/0000-0002-7740-5562>

О.Л. Орлова / O.L. Orlova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>

И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0003-4382-7377>

И.И. Краснюк (мл.) / I.I. Krasnyuk (Jr.): <https://orcid.org/0000-0001-8557-8829>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.11.2020. Принята к публикации: 24.12.2020.

Article submitted: 02.11.2020. Accepted for publication: 24.12.2020.

Объекты интеллектуальной собственности ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, созданные в 2019–2020 годах

О.И. Тарасова, А.А. Рыжова, М.И. Савинова, В.Д. Бородин

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

Контакты: Ольга Ивановна Тарасова patent3@ronc.ru

В кратком сообщении представлены результаты интеллектуальной деятельности научных сотрудников ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за 2019–2020 гг. Подчеркивается, что важным показателем инновационной деятельности научно-исследовательской организации является наличие исключительных прав на объекты интеллектуальной собственности.

Ключевые слова: результаты интеллектуальной деятельности, изобретения, патент, лицензия

Для цитирования: Тарасова О.И., Рыжова А.А., Савинова М.И., Бородин В.Д. Объекты интеллектуальной собственности ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, созданные в 2019–2020 годах. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(1):80–3.

Objects of intellectual property in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology created in 2019–2020

Olga I. Tarasova, Anna A. Ryzhova, Marina I. Savinova, Vitaliy D. Borodin

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

Contacts: Olga Ivanovna Tarasova patent3@ronc.ru

The results of the intellectual activity of the researchers of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russia in 2019–2020 are presented in the short message. It is highlighted that the number of patents is an index of an innovative level in the organization.

Key words: results of intellectual activity, inventions, patent, license

For citation: Tarasova O.I., Ryzhova A.A., Savinova M.I., Borodin V.D. Objects of intellectual property in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology created in 2019–2020. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(1):80–3. (In Russ.).

XXI век — время развития инновационных технологий во всех отраслях деятельности, в том числе и в здравоохранении. Россия является одной из немногих стран, где можно получить патент на любой продукт или способ, относящийся к здравоохранению [1].

Важным показателем инновационной деятельности научно-исследовательской организации, одним

из критериев эффективности ее работы является наличие исключительных прав на объекты интеллектуальной собственности (ОИС): изобретения, полезные модели, промышленные образцы, программы для электронно-вычислительных машин (ЭВМ), базы данных, товарные знаки, — что создает правовую основу для внедрения новшеств в практику и их дальнейшего коммерческого использования [2]. С этой

целью необходимо грамотное и своевременное оформление исключительных прав на ОИС.

Цель – познакомить читателей с ОИС ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (далее – Центр), созданными в 2019–2020 гг.

С целью регулирования отношений, связанных со служебными ОИС, в Центре разработан и утвержден приказом директора локальный нормативный акт – Положение о выявлении и правовой охране результатов интеллектуальной деятельности в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Данное Положение создано в соответствии с частью 4 Гражданского кодекса РФ [3] в целях дальнейшего совершенствования работы по обеспечению правовой охраны результатов интеллектуальной деятельности, созданных сотрудниками Центра в связи с выполнением своих трудовых обязанностей [4].

За период 2019–2020 гг. подготовлены и поданы в Федеральную службу по интеллектуальной собственности (Роспатент) 36 заявок на выдачу охранных документов на служебные ОИС, среди них:

- 33 заявки на выдачу патентов на изобретения, в числе которых 11 заявок на способы лечения злокачественных опухолей; 8 – на объекты медицинской биотехнологии, молекулярной биотехнологии и генетики; 6 – на лекарственные противоопухолевые средства; 5 – на способы лучевой терапии рака; 3 – на способы диагностики злокачественных опухолей;
- 2 заявки на государственную регистрацию базы данных;
- 1 заявка на выдачу свидетельства на программу для ЭВМ.

Из общего числа заявок 14 подготовлены сотрудниками Научно-исследовательского института (НИИ) экспериментальной диагностики и терапии опухолей (НИИ ЭДиТО); 12 – сотрудниками НИИ клинической онкологии имени академика РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова (НИИ КО им. Н.Н. Трапезникова); 10 – сотрудниками НИИ клинической и экспериментальной радиологии (НИИ КиЭР); 1 – сотрудниками НИИ детской онкологии и гематологии (НИИ ДОиГ).

За период 2019–2020 гг. получено 30 охранных документов на ОИС, правообладателем которых является Центр, включая:

- 27 патентов на изобретения, в числе которых 9 патентов на способы диагностики злокачественных опухолей; 5 – на способы лечения злокачественных опухолей; 5 – на лекарственные противоопухолевые средства; 4 – на способы лучевой терапии рака; 4 – на объекты медицинской биотехнологии, молекулярной биотехнологии и генетики;

- 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных: «База данных иммунного профиля опухолей и эффективности неoadъювантной химиотерапии у больных раком молочной железы», «База данных иммунного профиля опухолей и эффективности лечения больных меланомой»;
- 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ «PLANETA – медицинская информация в клинической и экспериментальной радиологии».

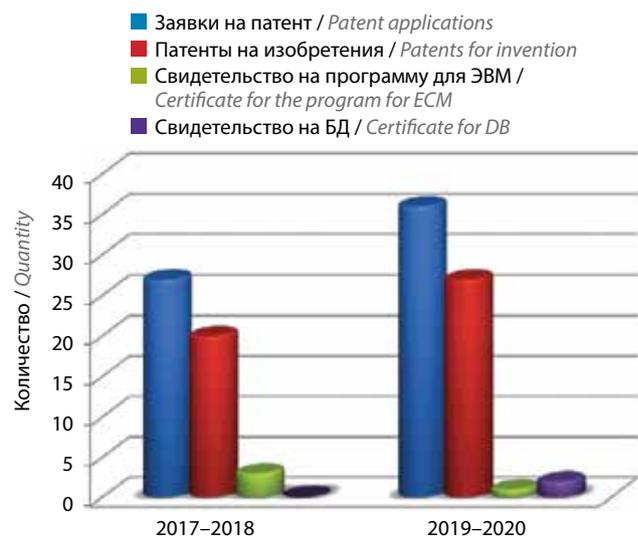
Более подробная информация о патентах Центра представлена на официальном сайте Центра [5].

Из общего числа полученных охранных документов 12 подготовлены сотрудниками НИИ ЭДиТО; 9 – сотрудниками НИИ КиЭР; 8 – сотрудниками НИИ КО им. Н.Н. Трапезникова; 1 – сотрудниками НИИ ДОиГ.

Инновационная активность научных сотрудников Центра заметно повысилась по сравнению с периодом 2017–2018 гг.: в Роспатент подано на 25 % больше заявок на ОИС, получено на 23,33 % больше охранных документов.

На рисунке представлены сравнительные показатели патентной активности в Центре в 2017–2018 и 2019–2020 гг.

Продолжается работа по инвентаризации действующих патентов, учтенных в качестве нематериальных активов Центра. Поддержание в силе 4 патентов было прекращено ввиду невозможности использования в коммерческих целях. В настоящее время действуют, используются в клинической практике,



Сравнительные показатели патентной активности в 2017–2018 и 2019–2020 гг. в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ЭВМ – электронно-вычислительная машина; БД – база данных

Comparative indicators of patent activity in 2017–2018 and in 2019–2020 in the N. N. Blokhin National Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. ECM – electronic computing machine; DB – database

исследовательской деятельности и учтены в качестве нематериальных активов 67 патентов Центра. Среди них патенты на средства, обладающие противоопухолевым действием; хирургические и лучевые способы лечения рака; способы диагностики рака; патенты на биомедицинские продукты и способы, а также патенты на способы криоконсервирования пуповинной крови; циклофилин А — стимулятор гранулоцитопоеза, радиопротектор и иммуностимулятор; биоимплантат с многофункциональным биоактивным наноструктурированным покрытием; штамм гибридных культивируемых клеток животных *mus musculus* α — продуцент моноклональных антител, специфичных к гранулоцитарному колониестимулирующему фактору (GCSF) человека; подкожный ксенографт клеточной линии беспигментной меланомы кожи человека *mel NRAS* для доклинического изучения противоопухолевых таргетных средств; способ и устройство для реконструкции костей таза; клеточная линия меланомы кожи человека *mel 1br EEMC*, предназначенная для разработки иммунологических подходов в лечении меланомы; антиангиогенные лекарственные средства; способ селективной доставки химиопрепарата к сетчатке глаза при лечении интраокулярной ретинобластомы у детей. Подробная информация о патентах представлена на официальном сайте Центра [5].

На балансе Центра также числятся 9 свидетельств о государственной регистрации программ для ЭВМ,

8 свидетельств на товарные знаки, 2 свидетельства о государственной регистрации базы данных и 1 ноу-хау.

Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ лицензионный договор по патенту № 2612528 «Способ получения биоимплантата для замещения сегментарных дефектов трахеи», авторы М.В. Киселевский и др. на условиях неисключительной лицензии. Основой биоимплантата согласно патенту является синтетический матрикс, выполненный с использованием технологии 3D-принтинга из биосовместимого нерезорбируемого материала по размерам и форме дефектного участка трахеи пациента. Материал обладает воздухопроводящей и барьерной функциями, что снижает риск инфицирования, обеспечивает быструю фиксацию и репарацию в зоне имплантации. Наружный слой биоимплантата заселяют мезенхимальными стромальными клетками костного мозга пациента.

В заключение отметим, что наличие исключительных прав на ОИС у научной организации является одним из критериев эффективности ее работы и правовой основой для дальнейшего внедрения инноваций в практику. В 2019–2020 гг. инновационная активность научных сотрудников Центра заметно повысилась по сравнению с 2017–2018 гг., о чем свидетельствует значительное увеличение числа поданных в Роспатент заявок на ОИС и полученных охраняемых документов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Киселев А.В., Гордина Г.А., Кубасова И.Ю. и др. Рекомендации по оформлению заявок на результаты интеллектуальной деятельности. Российский биотерапевтический журнал 2010;9(1):35–8. [Kiselev A.V., Gordina G.A., Kubasova I.Y. et al. Recommendations for Drawing Up a Claim for the Results of Intellectual Activity. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2010;9(1):35–8 (In Russ.).]
2. Тарасова О.И., Рыжова А.А., Кубасова И.Ю. и др. Защита объектов интеллектуальной собственности в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в 2017 году. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(3):89. [Tarasova O.I., Ryzhova A.A., Kubasova I.Y. et al. Protection of intellectual property in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia in 2017. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(3):89 (In Russ.).] DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-3-89.
3. Гражданский кодекс Российской Федерации. Часть 4. Федеральный закон от 18.12.2006 № 230-ФЗ с изменениями, внесенными Федеральным законом от 30.12.2015 № 431-ФЗ. Собрание законодательства Российской Федерации 2016;1:51. [Civil Code of the Russian Federation. Part 4. Federal Law of December 18, 2006 No. 230-FZ as amended by Federal Law No. 431-FZ of December 30, 2015. *Collected Legislation of the Russian Federation* 2016;1:51 (In Russ.).]
4. Положение о выявлении и правовой охране результатов интеллектуальной деятельности в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. [Regulations on the identification and legal protection of the results of intellectual activity in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation (In Russ.)]. Available at: <https://www.ronc.ru/nauka/patentnyy-otdel/polozhenie-o-vyavlenii-i-pravovoy-okhrane-rezultatov-intellektualnoy-deyatelnosti/>
5. Патенты ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [Patents of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia]. Available at: <https://www.ronc.ru/nauka/patentnyy-otdel/patenty/>

Вклад авторов:

О.И. Тарасова: написание текста статьи, редактирование.

А.А. Рыжова, М.И. Савинова, В.Д. Бородин: сбор, анализ информации по теме статьи.

Authors contributions:

O.I. Tarasova: writing the text of the article, editing.

A.A. Ryzhova, M.I. Savinova, V.D. Borodin: collection and analysis of information.

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: 13.01.2021. Принята к публикации: 08.02.2021.

Article submitted: 13.01.2021. Accepted for publication: 08.02.2021.

