

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2021 • ТОМ 20 • № 2

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

2

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

Основная задача издания – публикация информации о современных достижениях в области изучения патогенеза, диагностики и терапии иммуноопосредованных и онкологических заболеваний, результатов научных исследований, национальных и международных доклинических и клинических исследований.

Цели журнала – информирование читателя о результатах изучения новых биомаркеров онкологических и иммуноопосредованных заболеваний, использования биомаркеров в диагностике и терапии злокачественных новообразований и патологий иммунной системы, исследований в области лекарственной и клеточной терапии, а также по вопросам технологии создания лекарств, биомедицинских клеточных продуктов и биоматериалов, проведения доклинических и клинических исследований новых препаратов и методов лечения; обобщение научных и практических достижений в области диагностики и терапии иммунологических и онкологических заболеваний.

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

2 ^{ТОМ 20}
'21

Учредитель:
ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России

Адрес учредителя и редакции:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

Тел.: +7 (499) 324-10-65
факс +7 (499) 324-22-74

E-mail: biotherapy_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. № 2. 1–84. 00.00.2021.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2021

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 81679.

Отпечатано в типографии
«Мэйл Текнолоджи». 105082, Москва,
Переведеновский пер., 13, стр. 16.

Тираж 1000 экз. Бесплатно.
<http://bioterapevt.elpub.ru>

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

Киселевский Михаил Валентинович, д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клеточного иммунитета ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (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)

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)

ОТВЕТСТВЕННЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Соколова Зинаида Александровна, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей 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)

Бунятян Наталья Дмитриевна, д.фарм.н., профессор, главный научный сотрудник 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)

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)

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)

Меерович Игорь Геннадьевич, к.б.н., научный сотрудник департамента фармации Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Каламазу, 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, США)

Соколова Татьяна Михайловна, д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Степанова Евгения Владиславовна, д.м.н., советник вице-президента РАН (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)

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)

Эстрин Юрий Захарович, д.ест.н., почетный доктор РАН, действительный член Австралийской академии наук, иностранный член РАН, профессор департамента материаловедения и инжиниринга Университета им. Монаша (Клэйтон, Австралия)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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)

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

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)

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., заместитель директора по научной работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, директор НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

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

The main objective of Russian Journal of Biotherapy is a publication of current achievements in the study of pathogenesis, diagnostics, and therapy of immune-mediated and oncological diseases, results of the research studies, and results of national and international pre-clinical and clinical studies.

The publication aim is to present the results of the studies of new biomarkers of oncological and immune diseases, the use of biomarkers in diagnostics and therapy of tumors and disorders of the immune system, studies in the field of drug and cell therapy, studies of drug development technologies, biomedical cell products and biomaterials, pre-clinical and clinical studies of new medicines and methods of treatment. The main focus of the journal is to summarize scientific and practical achievements in the field of immunological and oncological diseases therapy.

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

2 VOL. 20
'21

Founder:

N.N. Blokhin National Medical Research
Center of Oncology of the Ministry
of Health of the Russian Federation

Founder and editorial office:

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse,
Moscow 115478.

Tel.: +7 (499) 324-10-65

Fax: +7 (499) 324-22-74

e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rjournal@ronc.ru

Publishing office:

Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye
Shosse, 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: ПИИ № 77-11695
dated 21.01.2002;*

*ПИИ № 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 2. 1–84. 00.00.2021.

© PH "ABV-Press", 2021

Rospechat' catalogue index: 81679.

Printed at the Mail Technology Ltd

Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane,
Moscow 105082.

1,000 copies. Free distribution

<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Mikhail V. Kiselevskiy, PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Cell Immunity, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

DEPUTIES EDITOR-IN-CHIEF

Alexander V. Karaulov, Academician of the Russian Academy of Sciences, PhD, DSc, Professor, Head of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Zoya S. Shprakh, 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 of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

EXECUTIVE EDITOR

Zinaida A. Sokolova, PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Diagnostic and Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

Irina A. Baldueva, 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)

Natalia D. Bunyatyan, PhD, DSc, Professor, Major Researcher 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 of the Institute of Professional Education, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Anatoly K. Golenkov, MD, PhD, DSc, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, 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)

Irina V. Evsegneeveva, MD, PhD, DSc, Professor, Professor of Chair of Clinical Immunology and Allergology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Viktor P. Krasnov, 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)

Igor G. Meerovich, PhD, Scientist II of Pharma Department, Eurofins Lancaster Laboratories, Inc. (Kalamazoo, USA)

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

Igor R. Nabiev, 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)

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

Natalia A. Oborotova, 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)

Andrey A. Pankratov, 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)

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

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

Tatiana M. Sokolova, PhD, DSc, Leading Researcher of Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

Eugenia V. Stepanova, PhD, DSc, Advisor to the Vice-President of the Russian Academy of Sciences (Moscow, Russia)

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

Ilya V. Ulasov, PhD, DSc, Leading Researcher, Leader of the Experimental Biotherapy and Diagnostics Group of the Institute of Regenerative Medicine, I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Yuri Z. Estrin, PhD, DSc, Honorary Doctor of the Russian Academy of Sciences, Fellow of the Australian Academy of Science, Foreign member of the Russian Academy of Sciences, Professor of Department of Materials Science and Engineering, Monash University (Clayton, Australia)

EDITORIAL COUNCIL

Maria A. Baryshnikova, 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)

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

Lev V. Demidov, MD, PhD, DSc, Professor, Head of Surgical Department No 10 of Biotherapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (Moscow, Russia)

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

Zaira G. Kadagidze, 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)

Vyacheslav S. Kosorukov, PhD, Deputy Director for Research of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors (Moscow, Russia)

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

Nikolay N. Tupitsyn, 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)

Irina Zh. Shubina, 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

- П.А. Зиновьев, И.Ж. Шубина, В.В. Яменсков, М.В. Киселевский*
Хроническое воспаление у пожилых: механизмы развития и связь с атеросклерозом 10
- А.А. Лаевская, В.В. Косенчук, С.И. Якушов, П.С. Тимашев, И.В. Уласов*
Скаффолд как способ доставки вирусных векторов 19
- И.В. Ярош, В.А. Мисюрин, И.И. Краснюк*
**Современные иммунотерапевтические таргетные системы доставки гранзимов
 в лечении злокачественных новообразований 31**

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- В.Н. Блиндарь, М.Н. Хагажеева, Т.В. Давыдова, А.В. Снеговой, М.М. Добровольская,
 Н.В. Любимова, Н.Е. Кушлинский, И.Б. Кононенко, З.З. Тоашева,
 А.М. Келеметов, Д.А. Рябчиков*
**Диагностика и лечение анемического синдрома у больных раком молочной
 железы на фоне неoadъювантной химиотерапии 42**
- М.И. Куржупов, А.В. Шабунин, К.С. Титов, Е.Л. Слобина, Д.Н. Греков*
**Современное эффективное лечение внутримозговых метастазов меланомы
 кожи. Пример клинического наблюдения 53**
- А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, О.С. Бурова,
 Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков*
**Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели
 противомеланомной вакцины 61**
- А.В. Смирнова, П.О. Варакса, Ю.А. Финогенова, Ю.С. Лагодзинская,
 А.А. Липенгольц, М.А. Абакумов, Е.Ю. Григорьева*
**Возможность применения магнитно-резонансной томографии в прижизненной
 верификации метастатического поражения легких мышей 69**
- Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова, К.М. Новрузов, С.В. Добаткин,
 М.В. Киселевский, Ю.З. Эстрин*
**Влияние мультиосевой деформации на динамику биодеградации сплава WE43
 и колонизацию клетками 76**

REVIEWS

- Pavel A. Zinovey, Irina Zh. Shubina, Vladimir V. Yamenskov, Mikhail V. Kiselevskiy*
Chronic inflammation in the elderly: mechanisms and association with atherosclerosis. 10
- Anastasia A. Laevskaya, Valeriy V. Kosenchuk, Semyon I. Yakushov, Pyotr S. Timashev, Ilya V. Ulasov*
Viral delivery using scaffolds. 19
- Ilya V. Yarosh, Vsevolod A. Misyurin, Ivan I. Krasnyuk*
Novel immunotherapeutic targeted granzyme delivery systems in treatment of malignant tumors 31

ORIGINAL REPORTS

- Valentina N. Blindar, Madina N. Khagazheeva, Tatiana V. Davydova, Anton V. Snegovoy, Marina M. Dobrovolskaya, Nina V. Lyubimova, Nikolay E. Kushlinsky, Inessa B. Kononenko, Zarina Z. Toasheva, Aslan M. Kelemetov, Denis A. Ryabchikov*
Diagnostics and treatment of anemic syndrome in patients with breast cancer on the background of neoadjuvant chemotherapy 42
- Mikhail I. Kurzhupov, Alexei V. Shabunin, Konstantin S. Titov, Elena L. Slobina, Dmitriy N. Grekov*
Modern effective treatment of brain metastases of skin melanoma. The example of clinical observation. 53
- Anna A. Rudakova, Maria A. Baryshnikova, Zinaida A. Sokolova, Olga S. Burova, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov*
Evaluation of immunogenicity of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model 61
- Anna V. Smirnova, Pavel O. Varaksa, Yulia A. Finogenova, Yulia S. Lagodzinskaya, Alexey A. Lipengolts, Maxim A. Abakumov, Elena Yu. Grigorieva*
Feasibility study of magnetic resonance imaging application in experimental radiology for intravital verification of lungs metastases in mice 69
- Natalia S. Martynenko, Natalia Yu. Anisimova, Keryam M. Novruzov, Sergey V. Dobatkin, Mikhail V. Kiselevskiy, Yuri Z. Estrin*
The effect of multiaxial deformation on the dynamics of biodegradation and cell colonization of alloy WE43 76

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-10-18>

Хроническое воспаление у пожилых: механизмы развития и связь с атеросклерозом

П.А. Зиновьев¹, И.Ж. Шубина², В.В. Яменсков¹, М.В. Киселевский²

¹ФГБУ «3 Центральный военный клинический госпиталь им. А.А. Вишневого» Минобороны России; Россия, 143420 Московская обл., городской округ Красногорск, п. Новый, терр. 3 ЦВКГ им. А.А. Вишневого, 1;

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

Контакты: Павел Андреевич Зиновьев pashaz_1991@mail.ru

В 2000 г. Claudio Franceschi впервые использовал термин “inflammageing”, который является производным от английских слов *inflammation* (воспаление) и *age* (возраст). Этим термином обозначается состояние, при котором у лиц пожилого возраста развивается хроническое воспаление и которое характеризуется высоким уровнем провоспалительных медиаторов клеток и тканей. Клеточное старение может быть запущено различными факторами: критическим укорочением теломер, постоянным повреждением ДНК, эпигенетическими повреждениями, митохондриальной дисфункцией и увеличением количества молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями клеток.

Обнаружено большое количество маркеров, изменение которых говорит о наличии воспалительного статуса, характеризующегося высоким уровнем провоспалительных факторов, включающих интерлейкин (ИЛ) 1, ИЛ-1га (белок антагониста рецептора ИЛ-1), ИЛ-6, -8, -13, -18, С-реактивный белок, интерфероны α , β , трансформирующий фактор роста β , фактор некроза опухоли α и его растворимые рецепторы и SAA-1 (сывороточный амилоид А1). Молекулярные механизмы, связанные со старением и болезнями, обусловленными возрастными изменениями, не до конца ясны, при этом вялотекущее хроническое воспаление является одним из ведущих механизмов развития атеросклероза и других патологических процессов у лиц пожилого возраста. Инфламмосомы NLRP3 и состояние иммунной системы в целом, а именно ее ремоделирование в сторону увеличения продукции провоспалительных цитокинов, играют ключевую роль в поддержании хронического воспаления и могут быть факторами развития атеросклероза.

Таким образом, на всех стадиях патогенеза атеросклероза, особенно на начальном его этапе, важную роль играют провоспалительные факторы иммунной системы, которые через различные механизмы действия стимулируют атеросклеротические изменения сосудов.

Ключевые слова: клеточное старение, воспаление, атеросклероз, инфламэйджинг

Для цитирования: Зиновьев П.А., Шубина И.Ж., Яменсков В.В., Киселевский М.В. Хроническое воспаление у пожилых: механизмы развития и связь с атеросклерозом. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2): 10–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-10-18.

Chronic inflammation in the elderly: mechanisms and association with atherosclerosis

Pavel A. Zinovev¹, Irina Zh. Shubina², Vladimir V. Yamenskov¹, Mikhail V. Kiselevskiy²

¹A.A. Vishnevskiy 3 Central Military Clinical Hospital, Ministry of Defense of Russia; 1, A.A. Vishnevskiy 3 CMCH, Noviy village, Krasnogorsk, Moscow region 143420, Russia;

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

Contacts: Pavel Andreevich Zinovev pashaz_1991@mail.ru

In 2000 Claudio Franceschi first used the term “inflammageing” derived from the English words “inflammation” and “age”. This term refers to the development of chronic inflammation in the elderly, which is characterized by a high level of pro-inflammatory markers of cells and tissues. Cellular aging can be triggered by a variety of factors: critical telomere shortening, permanent DNA damage, epigenetic damage, mitochondrial dysfunction, and an increase in the number of molecular fragments associated with cell damage.

A large number of markers have been found to reveal the pro-inflammatory status, such as interleukin (IL) 1, IL-1ra (IL-1 receptor antagonist protein), IL-6, -8, -13, -18, C-reactive protein, interferons α , β , transforming growth factor β , tumor necrosis factor α and its soluble receptors and SAA-1 (serum amyloid A1). The molecular mechanisms associated with aging and age-related diseases are not clear yet, while sluggish chronic inflammation is one of the leading mechanisms for the atherosclerosis development. Remodeling of the immune system with the increasing production of pro-inflammatory cytokines and NLRP3 inflammasomes also play a key role in the maintenance of chronic inflammation due to its ability to pick up a variety of age-related dangerous signals that trigger the immune response and subsequent inflammation and may act as a factor of the atherosclerosis development. Thus, pro-inflammatory factors of the immune system play an important role in pathogenesis of atherosclerosis, especially at an early stage, involving various mechanisms of action that boost atherosclerotic changes.

Key words: cellular ageing, inflammation, atherosclerosis, inflammaging

For citation: Zinovev P.A., Shubina I.Zh., Yamenskov V.V., Kiselevskiy M.V. Chronic inflammation in the elderly: mechanisms and association with atherosclerosis. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):10–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-10-18.

Введение

Старение – естественный и необратимый процесс, включающий прогрессирующие изменения во всех органах и системах и, как правило, напрямую связанный с увеличивающейся частотой возникновения ряда патологических состояний, таких как сердечно-сосудистые, метаболические или нейродегенеративные нарушения. В частности, пожилой возраст является независимым фактором риска развития жизнеугрожающих заболеваний, включая атеросклероз коронарных и брахиоцефальных артерий, которые могут привести к нарушению кровоснабжения сердца и головного мозга и, соответственно, нейродегенеративным заболеваниям, которые напрямую связаны с эндотелиальной дисфункцией [1–3].

Рассматривая старение как необратимый и естественный процесс, необходимо исследовать сопровождающие его явления в организме. Наряду с изменениями в органах и тканях оно обуславливает комплексные изменения в иммунной системе, которые имеют прямую связь с воспалительным ответом. Так, старение иммунной системы рассматривается как результат продолжительной стимуляции, вызванной хронической перегрузкой антигенами и, как следствие, неспособностью к образованию и высвобождению иммунных клеток.

Другим универсальным феноменом, сопровождающим процесс старения, является вялотекущее хроническое воспаление. При этом состоянии, по данным некоторых авторов, наблюдаются случаи увеличения в сыворотке крови пожилых людей воспалительных медиаторов в 2–4 раза по сравнению с сывороткой крови людей молодого возраста [4].

Старение тканей, органов и систем органов начинается с клеток, поэтому на протяжении долгого времени велись поиски факторов, запускающих процессы клеточного старения.

В 2000 г. Claudio Franceschi впервые использовал термин “inflammaging” (инфламэйджинг), который

является производным от английских слов *inflammation* (воспаление) и *age* (возраст). Этим термином обозначается состояние, при котором у лиц пожилого возраста развивается хроническое воспаление, характеризующееся прежде всего высоким уровнем провоспалительных медиаторов клеток и тканей.

Данный термин является результатом наблюдений, свидетельствующих о том, что у людей пожилого возраста отмечается повышение уровня цитокинов в крови, что наряду с другими факторами риска может быть причиной развития возрастных хронических заболеваний, в частности болезней сердечно-сосудистой системы [5].

Атеросклероз, как заболевание, ассоциирующее с старением организма, развивается под воздействием факторов, связанных со старением органов, тканей и клеток и сопутствующим хроническим воспалением.

Факторы клеточного старения

Клеточное старение впервые было описано Leonard Hayflick в 1961 г., когда он наблюдал процесс деления половых клеток человека. Это состояние, которое предполагает необратимое прекращение пролиферации клеток и является следствием влияния различных стресс-факторов, а также естественным спутником старения организма и заболеваний, связанных с ним. В результате исследований был сделан вывод, что старение клетки – это многостадийный процесс, и различные стимулы, такие как персистирующее повреждение ДНК, укорочение теломер, онкогенная дисрегуляция, митохондриальная дисфункция, эпигенетические повреждения и «окислительный взрыв», вызванный свободными радикалами, продуцируемыми активированными клетками, запускают переход обратимого состояния старения в статус хронического [6–8].

В 2008 г. Hayden и соавт. продемонстрировали, что повреждение ДНК активирует сигнальный путь

NF- κ B (ядерный фактор κ B), обуславливая связь между провоспалительными ядерными факторами и процессами старения. Активация данного пути приводит к транскрипции участков гена, ответственного за синтез белка NLRP3, так же как и зимогенной формы провоспалительного цитокина – интерлейкина (ИЛ) 1 β [6, 9, 10].

Таким образом, клеточное старение может быть запущено различными факторами: критическим укорочением теломер, постоянным повреждением ДНК, эпигенетическими повреждениями, митохондриальной дисфункцией и увеличением количества молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями клеток (damage-associated molecular patterns, DAMPs).

Механизмы клеточного старения

Следует отметить, что вследствие накопления продуктов повреждения клеток архитектура сердечно-сосудистой системы с возрастом претерпевает изменения, такие как утолщение сосудистой стенки и эндотелиальная дисфункция, которые приводят к атеросклерозу. Кроме особенностей гидродинамики, некоторые процессы, связанные со старением, например укорочение теломер, митохондриальная дисфункция, аутофагия, играют определенную роль в ремоделировании сердечно-сосудистой системы. Жирные кислоты накапливаются в атеросклеротических бляшках, представляя собой источник стимулов, которые предрасполагают к усилению местного воспаления. Повышенный уровень свободных радикалов кислорода, наблюдаемый в большинстве случаев у пожилых людей, также играет большую роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Свободные радикалы, в частности, индуцируют превращение холестерина в окисленную форму, которая связывается с рецептором CD36 и инициирует транскрипцию для синтеза компонентов белкового комплекса инфламмосом через сигнальный путь ядерного фактора NF- κ B, который является одним из основных в развитии хронического воспаления. Более того, макрофаги поглощают окисленный холестерин, его накопление в этих клетках является 2-м сигналом, необходимым для активации инфламмосом NLRP3. Макрофаги высвобождают провоспалительные цитокины и еще больше свободных радикалов, что также усиливает окисление холестерина, и, как следствие, развитие атеросклероза [6, 11].

Макрофаги в атеросклеротических поражениях в основном происходят из циркулирующих моноцитов, которые мигрируют в чувствительные к атеросклерозу участки артериальной стенки и в растущие атеросклеротические поражения. Локальная пролиферация макрофагов и трансдифференцировка гладкомышечных клеток (ГМК) интимы в макрофагопо-

добные клетки – два дополнительных источника макрофагов в поражениях. Возможность возникновения макрофагов из ГМК привлекла большое внимание исследователей. Клетки гладких мышц интимы накапливают холестерин и приобретают характер пенистых клеток. Более того, накопление холестерина в этих клетках также может стимулировать их поляризацию в провоспалительные клетки макрофагального типа [12].

Повреждение эндотелия – еще один ключевой фактор в развитии атеросклероза, оно способствует накоплению в стенке артерии холестеринсодержащих частиц – липопротеидов низкой плотности, которые имеют тенденцию к окислению, что вызывает воспалительную реакцию, не ослабевающую с течением времени. Активация как врожденного, так и приобретенного иммунитета также способствует инициации и прогрессированию атерогенеза – от ранней эндотелиальной дисфункции до развития острых тромботических осложнений, вызванных разрывом или эрозией бляшек [5].

Старение ГМК сосудистой стенки также считается состоянием, влияющим на развитие атеросклероза. Оно характеризуется приобретением клетками секреторного фенотипа, ассоциированного со старением, и связано с остеобластической дифференцировкой ГМК и кальцинозом сосудистой стенки. Один из катализаторов этого процесса – так называемая микроРНК-34а, которая может играть роль в развитии сосудистого воспаления. Группой исследователей была проанализирована связь между микроРНК-34а и компонентом секреторного фенотипа, ассоциированного с клеточным старением (senescence-associated secretory phenotype, SASP), – ИЛ-6 в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Было показано, что уровни микроРНК-34а и ИЛ-6 увеличивались прямо пропорционально, причем корреляция между показателями наблюдалась в аорте у мышей в возрасте 21 мес и в ГМК аорты человека, взятых от доноров разного возраста, вступивших в период старения. При этом для стареющих артерий характерны функциональные изменения сосудистых ГМК – от статуса «сокращение–расслабление» к фенотипу «старение», характеризующемуся потерей сократительной способности, необратимой остановкой роста, повышенной активностью галактозидазы, ассоциированной с клеточным старением, и увеличенной экспрессией ингибиторов циклинзависимой киназы p21 и p16 и гена-супрессора опухолей p53 [13].

Кроме того, стареющие ГМК сосудов переходят в состояние SASP, включающее секрецию различных растворимых молекул, в большинстве случаев – провоспалительных цитокинов и хемокинов, факторов роста и матриксных металлопротеиназ. Факторы SASP высвобождаются в кровоток и действуют локально,

паракринно, обуславливая начало старения соседних клеток и приводя к развитию вялотекущего хронического воспаления, ассоциированного со старением, обозначаемого как инфламэйджинг, являющегося фактором риска развития возрастных заболеваний, включая сердечно-сосудистые заболевания.

Таким образом, стареющие ГМК сосудов и эндотелиоциты – это «ключевые игроки» в индукции и поддержании артериального и системного воспаления, так же как и увеличение количества сосудистой микроРНК-34а. Как было сказано выше, выявлена прямо пропорциональная зависимость между циркулирующей микроРНК-34а и ИЛ-6, но не ИЛ-8, у здоровых людей 20–90 лет, что подтверждает гипотезу о том, что микроРНК-34а может быть функциональным «промоутером» сосудистого старения и сопутствующего системного вялотекущего воспаления. МикроРНК-34а также может контролировать возраст-ассоциированную дисфункцию эндотелия. Несомненно, уровень микроРНК-34а увеличивается в стареющих эндотелиальных клетках и запускает старение эндотелиоцитов через активацию фермента SIRT1 [13].

Старение и воспалительные процессы

Старение тесно связано с хроническим системным воспалением. Хроническое, вялотекущее асептическое воспаление (при отсутствии патогенов), ассоциированное с процессом старения, называют инфламэйджингом [4, 5].

В нормальных условиях воспалительный ответ – это преимущественно острая преходящая реакция организма на изменяющиеся условия среды, облегчающая защиту, восстановление и адаптацию для большинства органов и тканей [4]. Хотя воспаление является частью нормального восстановительного ответа для заживления ран и защиты организма от бактериальной, вирусной инфекции и неблагоприятных факторов среды, оно не всегда приводит к положительному результату. Длительно сохраняющееся воспаление становится повреждающим и деструктивным [14].

Как было сказано выше, у пожилых людей наблюдается более высокий уровень воспалительных цитокинов (ИЛ-6, -1, -18, фактор некроза опухоли α (ФНО- α)) и других маркеров воспаления (С-реактивный белок), чем у людей молодого возраста [6, 15]. В частности, воспалительные факторы, такие как ИЛ-6, ФНО- α , межклеточная молекула адгезии ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), и потеря антиоксидантного механизма являются одними из важнейших причин сосудистой дисфункции. Со временем стенки стареющих кровеносных сосудов утолщаются, их способность высвобождать вазоактивные медиаторы, особенно оксид азота II (NO), уменьшается,

в то время как сосудистая проницаемость увеличивается и обуславливает запуск сосудистого вялотекущего воспаления [1, 16, 17]. В то же время уровень этих провоспалительных факторов не дает полной картины происходящего процесса, а более важным является состояние, при котором наблюдается их продукция. Существует гипотеза, согласно которой воспаление, индуцированное повреждением ДНК, но не другими факторами (т.е. мышечным сокращением, антигенной стимуляцией), может приводить к развитию хронического воспаления [4].

Таким образом, клеточное старение запускается некоторыми механизмами и молекулами, отвечающими за старение, такими как укорочение теломер, увеличивающийся оксидативный стресс, воспалительные цитокины. В свою очередь, стареющая клетка перестает делиться и претерпевает изменение своего фенотипа, продукции медиаторов, например воспалительных цитокинов, которые ускоряют развитие хронического воспаления, протекающего независимо от патогенообусловленной активации иммунных клеток [6, 18].

Атеросклероз и эндотелиальная дисфункция

Состояние хронического воспаления, которое развивается с возрастом, потенциально может быть триггером таких распространенных возрастных заболеваний, как атеросклероз и другие сердечно-сосудистые болезни, метаболический синдром, сахарный диабет II типа и ожирение, саркопения и остеопороз, нейродегенеративные процессы, депрессии, деменции, а также злокачественные новообразования [4]. Повышенные уровни провоспалительных факторов являются маркерами развития патологического состояния. Так, у пожилых людей повышенный уровень ИЛ-6 может предсказывать начало снижения качества жизни и связан с высоким риском смертности, а высокие концентрации ИЛ-1 β ассоциированы с возникновением стенокардии, хронической сердечной недостаточности и дислипидемии [4].

Одна из систем организма человека, которая претерпевает морфологические и функциональные изменения в процессе старения, – сердечно-сосудистая система. В нормальных условиях эндотелиоциты в кровеносных сосудах способствуют регуляции артериального давления, защищая организм от развития атеросклероза и гипертензии посредством высвобождения вазоактивных и антиагрегантных медиаторов, а также влияя на функционирование антиоксидантной системы. Они также составляют барьер, предотвращающий лейкоцитарную инфильтрацию и воспаление в сосудистой стенке и окружающих тканях [1, 19, 20].

Эндотелиоциты являются главными детерминантами функции сосудов, поэтому их дисфункция

в сочетании с другими факторами риска приводит к прогрессированию заболевания и другим неблагоприятным явлениям. Эндотелиальная дисфункция, если она сохраняется, увеличивает количество свободных радикалов и усиливает воспаление сосудистой стенки, таким образом замыкая патологический круг. За этим может стоять физиологическое проявление сосудистой дисфункции и хроническое вялотекущее воспаление во время старения – инфламэйджинг. Повреждение эндотелия сосудистой стенки связано с оксидативным (окислительным) стрессом и старением, и в первую очередь с развитием атеросклероза [1, 21, 22].

Инфламэйджинг

На основании вышеизложенного можно заключить, что атеросклероз – это прежде всего хроническое воспалительное состояние, и, соответственно, атеросклеротические бляшки говорят о развитии клеточного старения. Цитокины играют роль на всех стадиях патогенеза атеросклероза, обладая как про-, так и антиатерогенным эффектом. Увеличение концентрации липопротеидов низкой плотности, гипертензия и повышение уровня цитокинов обуславливают увеличение проницаемости эндотелия и миграцию моноцитов и лимфоцитов в область повреждения эндотелия. Местное асептическое воспаление, индуцированное иммунными клетками, приводит к формированию пенных клеток и жировой полоски, что ведет к образованию бляшки, которая вследствие нестабильности может вызвать тромбоз и сердечно-сосудистые осложнения, связанные с ишемией в зоне поражения. Таким образом, хроническое неразрешающееся воспаление является одним из факторов развития атеросклероза.

Показано, что уровень медиаторов, уменьшающих активность воспаления, таких как резолвин D1, снижается в областях с нестабильными бляшками. Бляшки со склонностью к разрыву имеют определенные черты: усиленная воспалительная реакция, оксидативный стресс, очаги некроза, окруженные тонким защитным слоем коллагена (фиброзной оболочкой). В сформировавшихся атеросклеротических бляшках макрофаги проявляют более выраженную активность, что может способствовать разрыву бляшки [14].

За последние 3 десятилетия все больше результатов исследований указывают на то, что атеросклероз является воспалительным заболеванием, а иммунная система и воспалительные процессы постепенно приобретают ключевую роль в развитии и прогрессировании атеросклероза. Накопление воспалительных клеток в зонах атеросклеротических бляшек приводит к продукции активных форм кислорода и цитокинов, что лишь усиливает воспалительную реакцию [23].

В настоящее время противовоспалительные стратегии все чаще используют для лечения такого заболевания, как атеросклероз. Они считаются перспективными для дальнейшего снижения риска развития сердечно-сосудистых осложнений [23].

Стареющей эндотелий и другие ткани часто характеризуются хроническим вялотекущим воспалением. Индикаторами данного состояния считаются повышенные уровни провоспалительных медиаторов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α), которые включают множество патологических фенотипов, связанных с возрастом. Эти показатели изменяются в результате дисбаланса иммунного ответа (старения иммунной системы) [1, 24, 25].

Факторами, приводящими к развитию состояния инфламэйджинга, являются генетическая предрасположенность, ожирение, повышенная проницаемость кишечника и, как следствие, изменение в составе микрофлоры, клеточное старение, активация инфламмасом NLRP3, оксидативный стресс, вызванный дисфункцией митохондрий, дисрегуляция иммунных клеток и хронические инфекции.

За последнее время найдено большое количество маркеров, изменение показателей которых говорит о наличии провоспалительного статуса. Данное состояние характеризуется высоким уровнем циркулирующих в крови провоспалительных маркеров, включая ИЛ-1, -1 α , -6, -8, -13, -18, С-реактивный белок, интерфероны α , β , трансформирующий фактор роста β , ФНО- α и его растворимые рецепторы и SAA-1 (сывороточный амилоид A1). Эти маркеры накапливаются в организме человека, в частности в коже, Т-лимфоцитах, атеросклеротических бляшках, инсулинпродуцирующих β -клетках, почках, эндотелии, жировой ткани висцеральных органов, хряще сустава, печени, сердечной мышце и других тканях. Многочисленные исследования демонстрируют, что высокие уровни провоспалительных маркеров в крови, включая С-реактивный белок и ИЛ-6, позволяют прогнозировать риск развития сердечно-сосудистых заболеваний как у людей среднего возраста, так и у пожилых людей, независимо от других факторов риска [5]. Потенциально хроническое воспаление может быть вызвано в любой точке человеческого организма, поэтому ткани с наименьшим запасом прочности являются основными мишенями для развития этого состояния.

До настоящего времени нет ответа на вопрос, является ли воспаление непосредственной причиной ассоциированной патологии или биомаркером скорости биологического старения, или реактивным маркером основной патологии. Эти механизмы не исключают друг друга. Например, раннее повреждение, которое происходит во время воспаления эндотелиальных клеток сосудов, вносит вклад в патогенез атеросклеротических бляшек, тогда как в результате

развития самого атеросклероза продуцируются антигены, которые запускают и поддерживают воспалительную реакцию, а стареющие клетки часто обнаруживаются в больших количествах в атеросклеротических бляшках. Следовательно, существуют различные механизмы, которые усиливают роль воспаления в атерогенезе [5]. Фактически создается порочный круг – воспаление приводит к развитию заболевания, а прогрессирование заболевания может сопровождаться воспалительными реакциями.

Ремоделирование иммунной системы, воспаление и атеросклероз

Хроническое воспаление у пожилых людей имеет различные проявления и вызывает множество возрастных заболеваний, таких как атеросклероз, болезнь Альцгеймера, сахарный диабет и др. Существует большое число механизмов, которые обуславливают развитие данных патологических состояний, характеризующихся повышением уровня различных провоспалительных медиаторов.

Один из механизмов – ремоделирование иммунной системы, ключевую роль в развитии данного состояния играет дисрегуляция цитокинов, что указывает на неспособность контролировать системное воспаление и является маркером старения. Для инфламэйджинга характерен сдвиг в экспрессии цитокинов в сочетании с тенденцией к усилению провоспалительного фенотипа [14].

ИЛ-1 α , ИЛ-1 β и ИЛ-18 являются важными цитокинами – инициаторами стрессиндуцированного воспалительного каскада. ИЛ-1 β и ИЛ-18 переходят в активные формы благодаря ферменту каспаза-1, в то время как ИЛ-1 α активируется кальпаин-протеазой. Данные реакции приводят к активации ИЛ-1R, который ингибирует антагонист рецептора ИЛ-1R α , что блокирует сигнальную трансдукцию, опосредованную ИЛ-1. Повышение уровня ИЛ-1R α у пожилых людей ассоциируется с увеличением сопутствующих заболеваний, возрастных заболеваний и смертности. Определенные гаплотипы ИЛ-1 продуцируют ИЛ-1 β в больших количествах, а вариации генов, кодирующих синтез ИЛ-1, ассоциируются с более ранним началом или более тяжелым течением сердечно-сосудистых заболеваний и болезни Альцгеймера [14].

Показано, что стареющие клетки приобретают секреторный фенотип, связанный со старением (SASP), который включает секрецию широкого спектра растворимых молекул. Список этих молекул не является исчерпывающим, и молекулы могут варьировать в зависимости от типа клеток и запускающих факторов, но обычно включают интерлейкины (ИЛ-1 α , -1 β , -6), хемокины (ИЛ-8, ростовые факторы), регуляторный белок α , факторы роста (фактор роста фибробластов (FGF-2) и фактор роста гепатоцитов (HGF)),

металлопротеиназы (интерстициальная коллагеназа (ММР1), стромелизин-1 (ММР3) и коллагеназа-3 (ММР13)) и другие нерастворимые белки и компоненты внеклеточного матрикса. Эти секреторные молекулы в основном действуют паракринным образом и могут способствовать развитию клеточного старения в соседних клетках, некоторые из растворимых медиаторов попадают в кровоток и будут способствовать воспалению, действуя в отдаленных органах и тканях [5].

Старение приводит к изменениям в проницаемости кишечника, вследствие чего увеличивается количество циркулирующей бактериальной ДНК, связанной с атеросклерозом. В последнее время расширяются исследования микрофлоры как предиктора возрастного воспаления и атеросклероза [14].

Возрастные изменения микроРНК могут служить прогностическим фактором развития воспаления. Например, микроРНК-126-3р ингибирует воспаление эндотелия; низкий уровень микроРНК-126-3р был обнаружен у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями и диабетом. В то же время было обнаружено, что уровень микроРНК-21-5р обратно пропорционален уровню С-реактивного белка и фибриногена; уровень микроРНК-21-5р был выше у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями, чем в контрольной группе [5].

Исследователями также оценивалась активность некоторых клеточных ферментов, которая указывала на развитие воспалительного статуса. Так, сниженная активность альдегиддегидрогеназы (ALDH) или ее инактивация в митохондриях эндотелиоцитов приводит к неконтролируемому метаболизму альдегида, что снижает функционирование эндотелиоцитов и ускоряет эндотелиальную дисфункцию и, как следствие, процессы старения. Этот фермент (вернее, его дисфункция) ответственен за развитие процессов старения, в особенности сердечно-сосудистых заболеваний, связанных со старением, таких как атеросклероз, а также за развитие нейроваскулярных дегенеративных заболеваний, включая церебральную амилоидную ангиопатию [1, 24, 25].

Все больше данных убедительно подтверждают важную роль врожденного иммунитета в развитии воспаления. В частности, если рассматривать атеросклероз, моноциты и макрофаги в данной патологии являются ключевыми клеточными эффекторами. «Воспалительные» моноциты преимущественно попадают в очаг липидного пятна сосудистой стенки через хемокиновые рецепторы CCR2, CCR5 и CX3CR1 и их лиганды эндотелиоцитов. Резидентные моноциты также попадают в атерому через CCR5, однако значительно реже, чем «воспалительные» моноциты. Такое накопление клеток в дальнейшем приводит к образованию атеросклеротической бляшки [23].

В отдельных случаях кроветворные ткани костного мозга способны увеличивать пул провоспалительных моноцитов, усугубляющих атеросклероз. Попадая в кровоток, моноциты активируются окисленными липопротеидами (oxLDL) и переходят в гиперреактивное состояние. Эти циркулирующие иммунные клетки могут быть запрограммированы в направлении проатерогенной функции.

Приобретенный иммунитет также может играть важную роль с помощью антител. Ключевые компоненты приобретенного иммунитета — это Т-клетки, В-клетки и антигенпрезентирующие клетки. Другие воспалительные клетки, тучные клетки и различные подвиды дендритных клеток также вносят свой вклад в образование очагов поражений за счет распознавания антигена и выработки цитокинов. В-клетки могут вырабатывать антитела и при атеросклеротическом поражении сосудов. Они делятся на типы — В1 и В2. Клетки В1 преимущественно продуцируют антитела IgM и тем самым защищают от атеросклеротических поражений, клетки В2, в свою очередь, преимущественно продуцируют высокоспецифичные антитела IgG и способствуют развитию атеросклероза [23, 26].

Другим не менее важным механизмом развития воспаления является аутофагия, при которой высвобождаются эндогенные белки повреждения и перерабатываются компоненты инфламмасом. Повышенная активность аутофагии со стороны макрофагов и дендритных клеток увеличивает NLRP3-индуцированную продукцию ИЛ-1 и ИЛ-8, что влияет на развитие воспаления [6, 27, 28].

Инфламмасомы, играющие важную роль в механизме развития инфламэджинга, представляют собой макромолекулярные комплексы, которые после активации определенным сигналом (который может быть следствием экзо- или эндогенного стимула) запускают продукцию воспалительных цитокинов (ИЛ-1 β и ИЛ-18). Среди инфламмасом наиболее изученным является комплекс с рецептором для нуклеотидсвязывающего домена олигомеризации [6, 29]. Семейство NLR (Nod-подобных рецепторов), в состав которых входит пириновый домен, содержащий белок 3 (NLRP3) инфламмасом, запускает продукцию цитокинов, таких как ИЛ-1 β и ИЛ-18. Последние исследования показали, что передача сигналов с помощью инфламмасомы NLRP3, компонентов пути NLRP3, каспазы-1, ИЛ-1 β и ИЛ-18 была усилена в каротидных атеросклеротических бляшках, что говорит о важной роли инфламмасомы NLRP3 в развитии сосудистого воспаления и атеросклероза [23]. Накопление липидов в макрофагах или дендритных клетках легко индуцирует активацию мультибелкового комплекса. Из различных инфламмасом наиболее широко изучен комплекс NLRP3. Исследования по-

казали, что при атеросклеротических поражениях человека повышается экспрессия основных компонентов NLRP3, а ингибирование инфламмасомы NLRP3 снижает атеросклероз в экспериментах у мышей. Функциональная регуляция активной инфламмасомы NLRP3 в клетке представляет собой процесс «двух ударов», в котором 1-й сигнал запускает транскрипцию инфламмасомы, а 2-й сигнал одним и тем же и/или дополнительными стимулами активирует инфламмасому и индуцирует секрецию 2 провоспалительных цитокинов, ИЛ-1 β и ИЛ-18 [30]. Вероятно, комплекс инфламмасомы NLRP3 можно рассматривать как потенциальную мишень для лечения не только патологических состояний, связанных с возрастом, но и для коррекции процесса старения в целом [6, 31, 32].

Продукция ИЛ-1 β является вторичным эффектом активации инфламмасомы NLRP3, которая индуцируется кристаллами холестерина и другими белками повреждения (DAMP). Новые соединения, которые препятствуют передаче сигналов ИЛ-1 и ИЛ-6, находятся в стадии разработки. Исследование CANTOS показало, что противовоспалительная терапия канакинумабом, человеческим моноклональным анти-ИЛ-1 β -антителом, значительно уменьшала рецидивирующие сердечно-сосудистые заболевания в популяции свыше 10 тыс. стабильных пациентов, у которых было остаточное воспаление после инфаркта миокарда, независимо от пониженного уровня липидов [6]. Сигнальный путь ИЛ-1 β также рассматривается в качестве мишени воздействия для защиты от атеротромбоза.

Заключение

Таким образом, хотя молекулярные механизмы, связанные со старением и болезнями, обусловленными возрастными изменениями, не до конца ясны, вялотекущее хроническое воспаление считается одним из ведущих механизмов развития атеросклероза и других патологических процессов у лиц пожилого возраста. Иммунная система и инфламмасомы NLRP3 играют ключевую роль в поддержании хронического воспаления в связи со способностью улавливать множество опасных сигналов, связанных с возрастом, которые обуславливают иммунный ответ и следующее за ним воспаление. Атеросклероз — одно из заболеваний, которое ассоциируется со старением. Немаловажную роль в его патогенезе, особенно в начале, играют провоспалительные цитокины, вырабатываемые как клетками сосудистой стенки (эндотелиоцитами и ГМК, клетками с секреторным фенотипом), так и макрофагами, которые, в свою очередь, окисляют холестерол и оказывают влияние на формирование атеросклеротической бляшки.

Хроническое воспаление, как фактор развития атеросклероза, поддерживается различными механизмами, такими как ремоделирование иммунной

системы, аутофагия с выработкой эндогенных белков повреждения, продукция провоспалительных цитокинов, эндотелиальная дисфункция. Нарастание

воспалительной реакции в бляшках может привести к их разрыву и тромбообразованию, и впоследствии к закупорке сосуда.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Nannelli G., Ziche M., Donnini S., Morbidelli L. Endothelial Aldehyde Dehydrogenase 2 as a Target to Maintain Vascular Wellness and Function in Ageing. *Biomedicines* 2020;8(1):4. DOI: 10.3390/biomedicines8010004.
- Wagner D.D., Frenette P.S. The vessel wall and its interactions. *Blood* 2008;111(11):5271–81. DOI: 10.1182/blood-2008-01-078204.
- Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J. et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013;9(10):1057–69. DOI: 10.7150/ijbs.7502.
- Calder P.C., Bosco N., Bourdet-Sicard R. et al. Health relevance of the modification of low grade inflammation in ageing (inflammageing) and the role of nutrition. *Ageing Res Rev* 2017;40:95–119. DOI: 10.1016/j.arr.2017.09.001.
- Ferrucci L., Fabbri E. Inflammageing: chronic inflammation in ageing, cardiovascular disease, and frailty. *Nat Rev Cardiol* 2018;15(9):505–22. DOI: 10.1038/s41569-018-0064-2.
- Sebastian-Valverde M., Pasinetti G.M. The NLRP3 Inflammasome as a Critical Actor in the Inflammaging Process. *Cells* 2020;9(6):1552. DOI: 10.3390/cells9061552.
- Bonilla F.A., Oettgen H.C. Adaptive immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2 Suppl 2):S33–40. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int* 2009;22(11):1041–50. DOI: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x.
- Ferrando-Martínez S., Ruiz-Mateos E., Hernandez A. et al. Age-related deregulation of naive T cell homeostasis in elderly humans. *Age* 2010;33(2):197–207. DOI: 10.1007/s11357-010-9170-8.
- Weng N.-P. Aging of the Immune System: How Much Can the Adaptive Immune System Adapt? *Immunity* 2006;24(5):495–9. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.05.001.
- Medzhitov R., Janeway S.H. et al. Innate Immunity. *N Engl J Med* 2000;343(5):338–44. DOI: 10.1056/NEJM200008033430506.
- de Almeida A.J.P.O., de Almeida Rezende M.S., Dantas S.H. et al. Unveiling the Role of Inflammation and Oxidative Stress on Age-Related Cardiovascular Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2020;2020:1954398. DOI: 10.1155/2020/1954398.
- Zuccolo E., Badi I., Scavello F. et al. The microRNA-34a-Induced Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) Favors Vascular Smooth Muscle Cells Calcification. *Int J Mol Sci* 2020;21(12):4454. DOI: 10.3390/ijms21124454.
- Rea I.M., Gibson D.S., McGilligan V. et al. Age and Age-Related Diseases: Role of inflammation Triggers and Cytokines. *Front Immunol* 2018;9:586. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00586.
- Mortensen R.F. C-Reactive Protein, Inflammation, and Innate Immunity. *Immunol Res* 2001;24(2):163–76. DOI: 10.1385/IR:24:2:163.
- Daiber A., Oelze M., Wenzel P. et al. Nitrate tolerance as a model of vascular dysfunction: Roles for mitochondrial aldehyde dehydrogenase and mitochondrial oxidative stress. *Pharmacol Rep* 2009;61(1):33–48. DOI: 10.1016/S1734-1140(09)70005-2.
- Monti M., Donnini S., Giachetti A. et al. DeltaPKC inhibition or varepsilonPKC activation repairs endothelial vascular dysfunction by regulating eNOS post-translational modification. *J Mol Cell Cardiol* 2010;48(4):746–56. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.002.
- Summers C., Rankin S.M., Condlie A.M. et al. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* 2010;31(8):318–24. DOI: 10.1016/j.it.2010.05.006.
- Haybar H., Shahrabi S., Rezaeeyan H. et al. Endothelial Cells: From Dysfunction Mechanism to Pharmacological Effect in Cardiovascular Disease. *Cardiovasc Toxicol* 2019;19(1):13–22. DOI: 10.1007/s12012-018-9493-8.
- Donnini S., Cantara S., Morbidelli L. et al. FGF-2 overexpression opposes the beta amyloid toxic injuries to the vascular endothelium. *Cell Death Differ* 2006;13(7):1088–96. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401803.
- Morbidelli L., Donnini S., Ziche M. Targeting endothelial cell metabolism for cardio-protection from the toxicity of antitumor agents. *Cardiooncology* 2016;2(1):3. DOI: 10.1186/s40959-016-0010-6.
- Ungvari Z., Tarantini S., Kiss T. et al. Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature. *Nat Rev Cardiol* 2018;15(9):555–65. DOI: 10.1038/s41569-018-0030-z.
- Li B., Li W., Li X., Zhou H. Inflammation: A Novel Therapeutic Target/Direction in Atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 2017;23(8):1216–27. DOI: 10.2174/1381612822666161230142931.
- Trott D.W., Fadel P.J. Inflammation as a mediator of arterial ageing. *Exp Physiol* 2019;104(10):1455–71. DOI: 10.1113/EP087499.
- Caruso P., Signori R., Moretti R. Small vessel disease to subcortical dementia: a dynamic model, which interfaces ageing, cholinergic dysregulation and the neurovascular unit. *Vasc Health Risk Manag* 2019;15:259–81. DOI: 10.2147/VHRM.S190470.
- Kroemer G., Zitvogel L. CD4+ T Cells at the Center of Inflammaging. *Cell Metab* 2020;32(1):4–5. DOI: 10.1016/j.cmet.2020.04.016.
- Nguyen G.T., Green E.R., Mecsas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:373. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00373.
- Peng Z., Zhan H., Shao Y. et al. 13-Methylberberine improves endothelial dysfunction by inhibiting NLRP3 inflammasome activation via autophagy induction in human umbilical vein endothelial cells. *Chin Med* 2020;15:8. DOI: 10.1186/s13020-020-0286-1.
- Tortorella C., Piazzolla G., Spaccavento F. et al. Age-related effects of oxidative metabolism and cyclic AMP signaling on neutrophil apoptosis. *Mech Ageing Dev* 1999;110(3):195–205. DOI: 10.1016/S0047-6374(99)00055-x.
- Bäck M., Yurdagül A.Jr., Tabas I. et al. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol* 2019;16(7):389–406. DOI: 10.1038/s41569-019-0169-2.
- Fülöp T., Larbi A., Douzief N. et al. Signal transduction and functional changes in neutrophils with aging. *Ageing Cell* 2004;3(4):217–26. DOI: 10.1111/j.1474-9728.2004.00110.x.
- Ito Y., Kajkenova O., Feuers R.J. et al. Impaired glutathione peroxidase activity accounts for the age-related accumulation of hydrogen peroxide in activated human neutrophils. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1998;53(3):M169–75. DOI: 10.1093/gerona/53a.3.m169.

Вклад авторов

П.А. Зиновьев: сбор и анализ данных литературы, написание текста обзора;

И.Ж. Шубина: разработка дизайна обзора, подготовка текста;

В.В. Яменсков: анализ данных литературы;

М.В. Киселевский: интерпретация данных литературы.

Authors contributions

P.A. Zinovev: collecting and analysis of literature data, writing the review;

I.Zh. Shubina: design of the review, preparation of the text;

V.V. Yamenskov: analysis of literature data;

M.V. Kiselevskiy: interpretation of the literature data.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.А. Зиновьев / P.A. Zinovev: <https://orcid.org/0000-0001-5355-7943>

И.Ж. Шубина / I.Zh. Shubina: <https://orcid.org/0000-0002-9374-3158>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Financing. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 15.12.2020. Принята к публикации: 16.04.2021.

Article submitted: 15.12.2020. Accepted for publication: 16.04.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-19-30>

Скаффолд как способ доставки вирусных векторов

А.А. Лаевская, В.В. Косенчук, С.И. Якушов, П.С. Тимашев, 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: Илья Валентинович Уласов ulasov_i_v@staff.sechenov.ru

Для экспериментальной терапии опухолей разрабатываются и применяются многочисленные подходы. Среди них особое значение приобрело получение скаффолдов – трехмерных (3D) моделей, которые имитируют структуру тканей человека и животных в физиологическом и патологическом состояниях. Как правило, клетки, используемые для доставки вирусов, подвергаются частичной дифференцировке и преждевременному старению. Учитывая, что для обеспечения эффективного инфицирования различными вирусными векторами необходимо определенное состояние клеток, доставка вируса в клетку-мишень является основной функцией скаффолда. За последние годы разработаны подходы к получению скаффолдов на основе различных материалов, в числе которых матригель, полиалациновая кислота, полилактид-ко-гликолид, винил-стилбены и биоактивные полимеры. В нашем обзоре описаны потенциальные преимущества доставки вирусного вектора в ткани с помощью 3D-скаффолдов в целях получения противовоспалительного и регенеративного эффектов, а также достижения вирус-опосредованной экспрессии биологически активных веществ, препятствующих ангиогенезу и пролиферации малигнизированных клеток или, наоборот, стимулирующих заживление ран. 3D-материалы, такие как гидрогели и скаффолды, являются одними из наиболее перспективных инноваций в области биоматериалов. Вирусные векторы обеспечивают уникальную специфичность и эффективность доставки генов в клетки-мишени. Из всех вирусных агентов векторы на основе аденовирусов человека серотипов 2/5 получили наиболее широкое применение в онколитической виротерапии для доставки терапевтических генов. Однако широкому применению таких векторов в клинической практике препятствует иммуногенность белкового вирусного капсида. Эти ограничения могут быть преодолены посредством использования скаффолдов с вирусными векторами для безопасной и устойчивой доставки целевых генов в потенциальные мишени. Согласно данным литературы, использование скаффолдов значительно снижает иммунный ответ организма на чужеродный агент. Наш обзор будет интересен исследователям, работающим в области производства биоматериалов и заинтересованным в создании скаффолдов, одновременно обеспечивающих эффективную доставку генов в клетки-мишени и обладающих низкой иммуногенностью.

Ключевые слова: вирусный вектор, скаффолд, клетки

Для цитирования: Лаевская А.А., Косенчук В.В., Якушов С.И. и др. Скаффолд как способ доставки вирусных векторов. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):19–30. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-19-30.

Viral delivery using scaffolds

Anastasia A. Laevskaya, Valeriy V. Kosenchuk, Semyon I. Yakushov, Pyotr S. Timashev, Ilya V. Ulasov

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

Contacts: Ilya Valentinovich Ulasov ulasov_i_v@staff.sechenov.ru

In experimental oncology there are multiple approaches have been developed to target tumor cells. Many of them are based on scaffolds, a 3D models that mimics the structure of tissue in normal and pathophysiological state. It is known that to deliver a viral load to target cells, cells-carriers undergo limited differentiation, and premature aging. Since viral agents require cells to be in specific proliferative state, the delivery of the virus to the target cell is the main goal of the functional framework such as scaffold. Over decade, multiple studies demonstrate the production of scaffolds using matrigel, polyalacinic acid, poly-lactide-co-glycolide, vinyl stilbens, or bioactive polymers. Our review will describe the potential benefits of delivering the viral vector using 3D scaffolds for virus-mediated expression of biologically active substances that prevent angiogenesis, neoplasm proliferation, or, conversely,

stimulate wound healing. 3D materials such as hydrogels and scaffolds are among the key innovations in the field of material chemistry. Moreover, viral vectors provide specific delivery of genes to target cells. However, the immunogenicity of a viral capsid consisting of viral proteins hinders the clinical use of such vectors widely. These limitations can be surmounted by using scaffolds. Therefore, our review might interest researchers working in the fields of chemistry, materials science and natural sciences, as well as in the field of bioengineering and medical technologies.

Key words: scaffold, viral vectors, cells

For citation: Laevskaya A.A., Kosenchuk V.V., Yakushov S.I. et al. Viral delivery using scaffolds. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20 (2):19–30. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-19-30.

Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, злокачественные новообразования приводят к 9 млн смертей ежегодно и стоят на 2-м месте после сердечно-сосудистых заболеваний среди основных причин смерти [1]. При лечении рака применяют 3 классических метода: хирургическую резекцию, лучевую и лекарственную терапию. Тем не менее ни один из этих методов не является специфичным. Таргетная терапия помогает повысить эффективность лечения онкологических заболеваний, обеспечивая меньшее количество побочных эффектов.

Один из методов противоопухолевой таргетной терапии — онколитическая виротерапия. Она предполагает использование рекомбинантных или неизменных вирусных векторов для заражения и избирательного уничтожения раковых клеток, не затрагивая их окружение. После завершения жизненного цикла вируса в клетке происходит высвобождение вирионов, которое сопровождается лизисом клетки и активацией факторов врожденного и приобретенного иммунитета. Ключевым моментом онколитической виротерапии является доставка вируса непосредственно в опухоль и развитие в клетках цитотоксического и иммуностимулирующего эффектов. Доставка вектора может осуществляться несколькими методами: инъекция только вируса [2, 3], доставка вируса инфицированными стволовыми клетками [4–6] и конструирование скаффолдов. По сравнению с другими методами доставка, основанная на использовании биоматериалов, обеспечивает продолжительную экспрессию трансгенов, увеличенную продолжительность активности вектора, низкую иммуногенность, а также преимущества в преодолении внеклеточных барьеров [7]. В этом обзоре мы сфокусируемся на скаффолдах, выделим их преимущества и недостатки, определим модель идеального скаффолда и приведем примеры уже существующих.

Модель идеального скаффолда

Идеальный скаффолд должен отвечать таким требованиям онколитической виротерапии, как эффективная доставка вектора в клетки-мишени и низкая

иммуногенность в процессе доставки. Для того чтобы сбалансировать все основные характеристики скаффолда, необходимо определить биоматериал, вектор и способ заселения скаффолда вирусом: прямое прикрепление вируса непосредственно к биоматериалу или заселение скаффолда инфицированными клетками. Существует 2 основных типа скаффолдов — из синтетических и из природных (органических) полимеров. Природные полимеры более физиологичны для организма человека, благодаря чему вызывают меньший воспалительный ответ [8], однако было показано, что некоторые из них инкапсулируются в соединительной ткани реципиента [9]. Кроме того, органические полимеры не образуют токсических соединений в процессе распада, поэтому более безопасны для болюсного введения [8, 10]. Но по сравнению с синтетическими полимерами органические более подвержены биодеградации в связи с возможностью ферментативного расщепления коллагеназами и гиалуронидазами хозяина. Поскольку для обеспечения эффективного онколизиса необходима долговременная доставка вируса в раковые клетки, скаффолды из органических полимеров не совсем подходят для этих целей. Тем не менее для снижения скорости биодеградации скаффолда применяется химическая модификация органических полимеров, что приводит к выраженной воспалительной реакции со стороны хозяина [11]. В свою очередь, синтетические полимеры обладают большим трансдукционным потенциалом, чем органические полимеры [12–15], особенно в присутствии коллагена и фибронектина, способных усиливать поверхностную иммобилизацию вируса на синтетических полимерах [16]. Следовательно, оба типа полимеров имеют определенные преимущества и недостатки, однако для доставки онколитических вирусов больше подходят синтетические скаффолды благодаря своим механическим свойствам и способности поддерживать высокий уровень трансдукции клеток.

Выбор метода прикрепления вируса к скаффолду также играет немаловажную роль для обеспечения эффективного заражения. Различают прямое прикрепление вируса к биоматериалу скаффолда и заселение

скаффолда заранее инфицированными клетками. Следует сразу отметить, что прикрепление вирусных частиц непосредственно к скаффолду обеспечивает более эффективную трансдукцию клеток, что связано с ограниченным жизненным циклом предварительно трансдуцированных клеток и цитотоксическим воздействием вируса. Таким образом, скаффолд с адгезированными на нем вирионами – наиболее оптимальный выбор для достижения целей онколитической терапии. Такой метод прикрепления имеет свои особенности. Существует 2 типа высвобождения частиц: непосредственно из структуры полимеров или на основе субстрат-опосредованного высвобождения. Первый подразумевает высвобождение вирионов при деградации полимерных структур. Для внедрения вируса в структуру полимеров наиболее подходящим является электроспиннинг [17]. Однако, поскольку для целей онколитической виротерапии больше подходят скаффолды с продолжительной биodeградацией, то предпочтительнее использовать субстрат-опосредованное высвобождение, при котором вектор доставляется на поверхности специфически обработанного скаффолда к клеткам [7].

Метод доставки всей конструкции в организм не менее важен. Применение перорально или в форме инъекции, в том числе в магистральные кровеносные сосуды, может приводить к системному воспалительному ответу. Что касается онколитической виротерапии, наиболее предпочтительный способ доставки скаффолда – имплантация в опухоль или около места локализации опухоли, что к тому же предотвращает диффузию вектора в нетаргетные ткани.

Исходя из всего вышесказанного, идеальная модель скаффолда теоретически должна представлять собой долгоживущую и высокоемкостительную конструкцию, состоящую из малоиммуногенных синтетических полимеров с иммобилизованным на поверхности вирусом, причем имплантировать эту конструкцию следует в место локализации опухоли. Такая модель могла бы обеспечить эффективную и стабильную трансдукцию раковых клеток с минимальной диффузией в здоровые ткани.

Методы культивирования вирусов на скаффолдах

Перед посевом клеток на скаффолд следует, во-первых, выбрать соответствующий материал скаффолда и, во-вторых, соответствующие клетки, в зависимости от терапевтической мишени. Стволовые клетки стали стандартом в тканевой инженерии и регенеративной медицине из-за простоты их культивирования, потенциала к дифференцировке, гибкой и активной миграции в месте внедрения [18, 19]. Наиболее простой метод прикрепления – это посев клеток на скаффолд определенной формы как на обычный суб-

страт. Причем нанесение гликопротеинов, например фибронектина, позволяет повысить адгезивность клеток к субстрату [20, 21].

Клеточная доставка вируса имеет определенные преимущества: вирусная нагрузка в месте доставки оказывается больше, чем при неклеточной доставке, в связи с пролонгированной репродукцией вирионов в ранее трансдуцированных клетках; также при данном типе доставки требуется примерно на 2 порядка меньше вирусных частиц [22, 23]. У такого типа доставки вируса на скаффолде в клетки есть и свои недостатки. Не аутологичные клетки могут вдобавок к внедрению скаффолда усилить воспалительный ответ в тканях реципиента, в основном за счет макрофагов и выделяемых ими провоспалительных цитокинов, в то время как использование аутологичных клеток является дорогостоящей процедурой [22, 24]. Значительный минус клеточной доставки вируса – отсутствие соответствующего данной клетке микроокружения, в результате чего их экспрессия может отличаться от ожидаемой [25]. Например, в исследовании S. Richardson и соавт. в трансдуцированных клетках, прикрепленных к скаффолду из поли-L-молочной кислоты, из 3 трансгенов экспрессия возросла только для коллагена II типа, при этом экспрессия коллагена I типа и агреккана практически не изменилась [26]. Стоит отметить, что трансдукция клеток до прикрепления к скаффолду – не единственный вариант. Также возможно изначально прикрепить вирус к скаффолду и впоследствии посеять на него интактные клетки. Таким образом, 2-й вариант предполагает сначала неклеточную доставку вируса.

Прикрепить вирионы к скаффолду можно различными способами. И оболочечные, и безоболочечные вирусы могут быть напрямую прикреплены к скаффолду. Самый простой путь – это заморозка с лиофилизацией вируса на поверхности скаффолда (определенной формы – диска, микросферы и т.д.). Уровень трансдукции клеток *in vitro* при таком методе достигал 80 %, а экспрессия трансгенов *in vivo* наблюдалась в месте внедрения конструкции у мышей в течение 28 дней, причем максимум экспрессии достигался на 7-й день. Тем не менее при таком подходе вирионы находятся только на поверхности скаффолда, поэтому диффузия их в окружающую среду является неизбежным побочным эффектом при длительном хранении [16, 27].

Безоболочечные вирусы обычно имеют отрицательный заряд, вследствие чего они могут быть нековалентно связаны с положительно заряженным скаффолдом, для этого эффективно используют покрытие поли-L-лизинном (PLL). Без PLL только 1 % клеток, посеянных на скаффолд, трансдуцируются оставшимися вирионами. На PLL-покрытом скаффолде (в исследованиях – на поликапролактоне (PCL)) уровень трансдукции достигал 81 % [12, 28, 29].

Большинство методов прикрепления к скаффолду требуют определенных условий: высокая температура, дегидратация, электрическое воздействие и др. Такие условия могут негативно влиять на вектор, поэтому следует быть осторожными в выборе нужного метода связывания вируса.

Еще один важный вопрос – как доставить скаффолд на место повреждения ткани. Ранее наиболее приемлемым вариантом считалась имплантация через хирургический доступ, однако были открыты материалы (термопластический уретан (PPF), сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA), хитозан и др.), которые в определенной форме (наиболее оптимальная – микросферы) могут быть введены в виде инъекции [36, 37]. Локальное введение таких материалов безопаснее и эффективнее, поскольку посредством системного введения через внутривенную инъекцию лишь 10 % от первоначальной дозы достигает органа-мишени [38, 39]. Однако эти данные на сегодняшний момент подтверждены лишь для повреждений тканей сердечно-сосудистой системы, костей, хрящей и кожи, в то время как доставка скаффолдов в другие ткани и органы все еще требует изучения. Например, было показано, что нейральные стволовые клетки, интактные или с модифицированным геномом, тропны к повреждениям тканей и опухолям головного мозга [40, 41].

Таким образом, выбор метода доставки вируса на скаффолде зависит от типа мишени и имеющихся ресурсов. Наиболее оптимальна неклеточная доставка, так как трансдуцированные после внедрения скаффолда клетки более стабильны, чем предварительно трансдуцированные, и экспрессия их генов способна меняться в соответствующем микроокружении. Техника прикрепления вируса к скаффолду определяется целью лечения, особенностями биотехнологического производства, стоимостью конечного продукта и предположительными эффектами на пациента, в том числе побочными.

Виды скаффолдов, подходящих для доставки вирусов

Вирусная доставка посредством скаффолда используется для самых разных целей. Однако существуют критерии, определяющие свойства и структуру скаффолда: скорость разложения материала и способность поддерживать необходимый уровень экспрессии трансгена во времени.

Выбор материала в основном зависит от патологических процессов, происходящих в месте имплантации. В некоторых случаях продукты разложения могут влиять на формирование новой ткани, окружающей скаффолд [12]. При воспалительных процессах наилучшим выбором являются органические материалы, так как их ремоделирование под действи-

ем среды протекает без развития реакции на инородное тело. Однако скорость разложения таких материалов крайне высока, в то время как стойкие к разложению синтетические полимеры, деградация которых чаще опосредована гидролизом [15, 42, 43], могут вызывать отторжение и фиброз [13–15, 42, 44, 45]. В частных случаях материалы полностью определяют уровень иммобилизации вируса в скаффолде [16, 44].

Наноструктура органических материалов (например, коллагена) имеет вид, приближенный к физиологическому, что дает возможность клеткам, культивируемым на поверхности скаффолда, пролиферировать и накапливать тканеспецифичный матрикс внутри. Экспрессия вирусных векторов, иммобилизованных в такие скаффолды, наблюдается только в границах самого скаффолда [12, 29]. Напротив, использование синтетических материалов позволяет получать организованные компактные структуры, способствующие высвобождению и распространению вируса вокруг скаффолда. Такие структуры обычно имеют вид нитей или пористого вещества [16, 28, 44]. 3D-структура скаффолда также способна определять его свойства. Например, создание плоских скаффолдов позволяет с легкостью оценивать уровень иммобилизации и выживаемости вирусных векторов внутри [16, 22]. Чаще всего используются сферические неполные системы, однако такое решение накладывает ограничение на создание гетерогенных интерфейсов. Поэтому сферические скаффолды обычно представляют собой гомогенные системы из определенного материала [29], иногда также дополненные протекторами вирусов (например, сахарозой) для улучшения иммобилизации вирусных частиц [16]. Другие материалы (шелк, гидрогель, желатин) [46–49] и формы (цилиндрическая) [22] используются реже (рис. 2). Чтобы получить гетерогенный интерфейс, создают многокомпонентные скаффолды. Для каждой части отдельно проводят процедуры иммобилизации и культивирования клеток, после чего все компоненты соединяют. Их формы определяются нативными границами гетерогенных систем [12, 50].

Поскольку создание гетерогенных структур подразумевает дальнейшую их замену на нативные ткани посредством ремоделирования [12, 29], использование органических материалов обязательно; следовательно, важным отличием является способ сшивания компонентов. Прежде всего данная процедура необходима для создания целостной структуры с физиологическими гетерогенными переходами. Еще одна функция нанесения швов – продление срока разложения. Один из способов – химическое сшивание, которое придает устойчивость к ферментативному разложению [51, 52]. Однако такой способ может вызвать фиброзную инкапсуляцию, что особенно

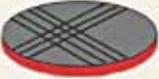
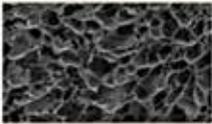
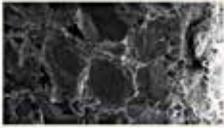
3D-модель / 3D model	Форма / Form	Материал / Material	Наноструктура / Nanostructure
	Диск / Disc	Поликапролактон / Polycaprolactone	
	Полусфера / Hemisphere	Матрица из обработанного хряща / Matrix of treated cartilage	
	Цилиндрический скаффолд / Cylindric scaffold	Волокна поликапролактона / Polycaprolactone fibers	
	Пористая сфера / Sphere with pores	Полилактид-ко-гликолид / Poly lactide-co-glycolide	

Рис. 2. Примеры существующих скаффолдов, используемых для доставки вирусов, с изображением примерной 3D-модели и наноструктуры, с указанием формы и используемого биоматериала. Представленные скаффолды не использовались в контексте онколитической виротерапии

Fig. 2. Examples of existed scaffolds used for virus delivery, based on 3D model, nanostructures depend on shape and source of biomaterial. The presented scaffolds have not been used for oncolytic virotherapy

недопустимо в условиях воспаления *in vivo*. Аналогичный метод, физическое сшивание посредством дегидрометрической обработки, сохраняет возможность ферментативного ремоделирования и не вызывает реакцию в ответ на инородное тело [12].

Культивируемые на поверхности скаффолда клетки, влияние которых на эффективность доставки опосредовано использованием определенных вирусных трансгенов, можно рассматривать в качестве модификации всей системы скаффолда. Мезенхимальные стволовые клетки человека используют для поддержания высоких концентраций определенных факторов роста или сигнальных молекул, контролирующей дифференцировку клеток [12, 22, 28, 44, 53]. Индукция дифференцировки клеток в присутствии иммобилизованных вирусных векторов на скаффолде позволила получить остеондральную структуру и использовать ее *in vivo* [12].

Как и в случае выбора материала, решение о выборе определенных вирусов принимается в соответствии с поставленной задачей, но можно охарактеризовать вирусы, используемые в сочетании с различными материалами и методами иммобилизации. Характеристики, которым должны соответствовать вирусы, — это способность поддерживать

определенный уровень экспрессии трансгена и специфичность трансдукции.

Чаще всего используемые вирусы — лентивирус и аденовирус — отвечают требованиям благодаря своим свойствам, позволяющим продуцировать генный материал внутри как делящихся, так и неделящихся клеток, и относительно невысокому уровню иммуногенности [12, 16, 28, 29, 44]. Эффективность трансдукции при иммобилизации вирусов в скаффолд невысока (от 20 до 85 %) [12, 16, 28, 29, 44], тем не менее использование лентивируса с синтетическими скаффолдами из PCL повышает эффективность в сравнении с использованием его с органическими материалами [22, 28, 44], тогда как аденовирус стабильно имеет высокую эффективность трансдукции и с органическими, и с синтетическими материалами [27]. Добавление покрытий из экстраклеточного матрикса (ECM), содержащих белки (коллаген, фибронектин), предназначенные для ассоциирования вирусных частиц, дает эффект только для аденовируса [16]. Даже с учетом этих данных в сравнении с болюсной инъекцией или доставкой голых плазмид [54] доставка вируса посредством скаффолд-систем показывает наилучшие результаты [55]. Также она позволяет использовать значительно более низкие концентрации

Биоматериалы и вирусные векторы для доставки транскгена в клетки-мишени
 Biomaterials and viral vectors for transgene delivery into target cells

Материалы Materials	Вектор Vector	Биоматериал Biomaterial	Техника иммобилизации и способ доставки Immobilization technique and delivery mechanism	Результат Outcome	Источник литературы Reference
	Лентивирус Lentivirus	Волокна PLL-PCL (PCL-скаффолды, покрытые PLL) PCL yarns, covered with PLL (PCL woven scaffolds)	Нековалентное связывание вирусных частиц через взаимодействие между положительно заряженным PLL и отрицательно заряженным лентивирусом. МСК были посеяны на скаффолд Non-covalent association of viral particles through charge interaction between the positively charged PLL and negatively charged lentivirus. MSC were seeded on the scaffold	<i>In vitro</i> : 84,5 % МСК экспрессировали транскген в течение 36 дней <i>In vitro</i> : 84.5 % of MSC were expressing transgene. Transgene expression lasted for 36 days	[22]
Синтетические Synthetic	Лентивирус и аденовирус Lentivirus and adenovirus	3D-микрористый PLG-скаффолд или пористый межклеточным матриксом PLG-скаффолд. Сахароза в качестве криопротектора поддерживала активность вектора. Фибронектин увеличил трансдукцию аденовируса 3D microporous PLG scaffold or extracellular matrix-coated PLG scaffold. Sucrose as the cryoprotectant maintained the vector's activity. Fibronectin increased transduction of adenovirus	Поверхностная доставка. Вирус был нековалентно иммобилизован замораживанием и последующей лиофилизацией Surface delivery. The virus was non-covalently immobilized by freezing and subsequent lyophilization	<i>In vitro</i> : лиофилизованный на поверхности скаффолда вирус обеспечил эффективную и локализованную экспрессию транскгена. В течение 24 ч 80 % вируса было высвобождено. Эффективность трансдукции лентивируса была в 5 раз ниже трансдукции с аденовирусом. <i>In vivo</i> : скаффолды с иммобилизованным лентивирусом были имплантированы мышам подкожно. Транскген экспрессировался только в области имплантации. Экспрессия транскгена длилась 4 нед <i>In vitro</i> : surface-lyophilized lentivirus provided effective and localized transgene expression. Within 24 h 80 % of virus was released. The transduction efficiency achieved with lentivirus was approximately fivefold less than that obtained with adenovirus. <i>In vivo</i> : scaffolds with immobilized lentivirus were implanted into mice subcutaneously. Transgene expression was localized to the implantation site. Transgene expression persisted for 4 weeks	[16]
		PLLA PLLA	Трансдукция в клетки перед прикреплением на скаффолд Transduction in cells before attachment to the scaffold	Производство коллагена II типа возросло, зафиксировано небольшое изменение экспрессии коллагена I типа и агрегана Production of type II collagen was increased, but there was a little change of the expression type I collagen and aggrecan	[26]
	Аденовирус Adenovirus	Gelfoam (желатиновая губка) Gelfoam (gelatin sponge)	Поверхностная доставка. Вирус был нековалентно иммобилизован лиофилизацией Surface delivery. The virus was non-covalently immobilized by lyophilization	Ткань кости, в которую был доставлен транскген с помощью скаффолда, регенерировала и покрыла на 80 % больше дефектов по сравнению с доставкой без использования скаффолда The regenerated bone covered greater than 80 % of defects in by lyophilized adenovirus vector in compare delivery without scaffold	[27]

Продолжение таблицы
Continuation of table

Материалы Materials	Вектор Vector	Биоматериал Biomaterial	Техника иммобилизации и способ доставки Immobilization technique and delivery mechanism	Результат Outcome	Источник литературы Reference
Синтетические Synthetic	Аденоассоциированные вирусы Adeno-associated viruses	ELP и PCL ELP and PCL	Электроспиннинг: раствор одного или нескольких полимеров помещается в электрическое поле с заданной температурой, вирусные частицы помещаются в раствор перед электроспиннингом Electrospinning: solution of one or more polymers is exposed to a strong electric field at a defined temperature, virions are included in the solution of polymers before electrospinning	Доля клеток, экспрессирующих трансген, равна 80 % The rate of transduced cells at these scaffolds is about 80 %	[17]
	Ретровирус Retrovirus	Коллагеновые скелеты с PLL-покрытием. Фибробласты были посеяны на скелет с покрытием. Fibroblasts were seeded on the scaffold	Нековалентная иммобилизация вируса через ионные взаимодействия зарядов между PLL и отрицательно заряженным ретровирусом Non-covalent virus immobilization through charge interaction between the positively charged PLL and negatively charged retrovirus	<i>In vitro</i> : 20 % фибробластов экспрессировали трансген после отделения от скелета спустя 14 дней. Высокие уровни экспрессии трансгена положительно коррелировали с высокой плотностью PLL-покрытия на скелете <i>In vitro</i> : transgene expression was detected in 20 % of fibroblasts recovered from collagen scaffolds after 14 days culture in media, demonstrating sustained and integrated transgene expression from the retroviral vector. High levels of transgene expression correlated with high PLL densities on the scaffold	[29]
Натуральные Natural	Лентивирус Lentivirus	Скелет из хрящевого матрикса (с покрытием коллагена) с PLL-покрытием PLL coat cartilage-derived matrix scaffold (collagen-rich)	Поверхностная доставка. Вирус был нековалентно иммобилизован замораживанием и последующей лиофилизацией Surface delivery. The virus was non-covalently immobilized by freezing and subsequent lyophilization	Экспрессия трансгена длилась 56 дней. Скелет-опосредованная лентивирусная доставка обеспечила высокоэффективную сайт-специфичную трансдукцию. Эффективность трансдукции составила 57 ± 5 % в MSC (ниже, чем эффективность лентивирусной трансдукции на синтетических PCL-скелетах (75–85 %)) Transgene expression was observed until day 56. Scaffold-mediated lentiviral gene delivery provided highly efficient, site-specific transduction. Transduction efficiency was 57 ± 5 % in MSC (lower than 75–85 % transduction efficiencies observed with scaffold-mediated lentiviral gene delivery on synthetic PCL scaffolds)	[12]
	Аденовирус Adenovirus	Пористый хитозан/коллагеновый скелет Porous chitosan/collagen scaffold	Вирус нековалентно иммобилизован заморозкой и последующей лиофилизацией The virus was non-covalently immobilized by freezing and subsequent lyophilization	<i>In vitro</i> : максимально высокая экспрессия трансгена была зафиксирована на 3–6-й день инкубации и впоследствии постепенно снижалась. Экспрессия трансгена длилась 3 нед. <i>In vivo</i> : скелеты имплантированы мышам без тимуса подожного. Не зафиксировано воспалительных реакций. Трансплантаты находились в организме 2 нед. Спустя 2 нед форма скелетов и экспрессия трансгена были сохранены. Скелет был покрыт соединительнотканной капсулой	[9]

Окончание таблицы
End of table

Материалы Materials	Вектор Vector	Биоматериал Biomaterial	Техника иммобилизации и способ доставки Immobilization technique and delivery mechanism	Результат Outcome	Источник литературы Reference
				<p><i>In vitro</i>: the maximum transgene activity was detected after 3–6th days incubation and then followed by the moderate decline.</p> <p>Transgene expression lasted for three weeks.</p> <p><i>In vivo</i>: scaffolds were implanted into athymic mice subcutaneously. No inflammatory reactions were detected. The transplantants were excised at 2 weeks post-transplantation. After 2 weeks transplantation scaffolds kept their initial shape. The transgene expression was still up-regulated. The scaffold was encapsulated by host connective tissue</p>	[9]
	Аденовирус Adenovirus	Стирольный гель на основе желатина с иммобилизованным вирусом Styrenated gelatin-based adenovirus-immobilized gel	Фотосшиваемый желатиновый гель. Высвобождение вируса было инициировано фотоотверждением A photo-cross-linkable gelatin gel. The virus release was induced by photocuring	Количество высвобожденного вируса было наибольшим в 1-й день инкубации и в последующем резко снижалось The amount of released adenovirus was the largest on day 1 of incubation and sharply decreased with incubation time	[49]
Натуральные Natural		Скаффолды из шелкового фиброина Silk fibroin scaffolds	Поверхностная доставка. 3D-скаффолды из фиброина были помещены в раствор с аденовирусами и заморожены Surface delivery. 3D-silk fibroin scaffolds were mixed with adenovirus solution and were placed in freezer	<p><i>In vitro</i>: высвобождение вируса длилось 21 день. Эффективность инфицирования составила 100 % в 1-й день и постепенно снижалась до 75 % на 7-й день. На 14-й и 20-й дни эксперимента эффективность составила 20 и 5 % соответственно.</p> <p><i>In vivo</i> эксперименты показали, что скаффолды из фиброина способны доставлять аденовирус <i>In vitro</i> studies demonstrated that the viruscarrying silk fibroin scaffold released virus particles for 21 days. Infection efficiency reached 100 % on day 1 and gradually declined till 75 % on day 7. On the 14th and 21st days of the experiment was 20 and 5 % respectively.</p> <p><i>In vivo</i> experiments revealed that silk scaffolds were capable of delivering adenovirus</p>	[46]
	Аденоассоциированные вирусы Adeno-associated viruses	Хитозан с покрытием авидином Avidin-coated chitosan	Нековалентная конъюгация вирусных частиц и скаффолда, опосредованная прочной связью авидин-биотин Non-covalent conjugation of viruses to scaffold is achieved by strong avidin-biotin interaction	95–100 % прикрепление вирусных частиц по сравнению с 40–60 % на других скаффолдах 95–100 % biotinylated viruses particles are attached to this chitosan against 40–60 % on other scaffolds	[33]

Примечание. PCL – поликапролактон; PLL – поли-L-лизин; PLG – полилактид-ко-гликолид; PLLA – поли-L-молочная кислота; ELP – эластин-подобные полипептиды; MSC – мезенхимальные стволовые клетки.

Note. PCL – polycaprolactone; PLL – poly-L-lysine; PLG – polylactide-co-glycolide; PLLA – poly-L-lactic acid; ELP – elastin-like polypeptides; MSC – mesenchymal stem cells.

иммобилизируемого вирусного вектора, сохраняя при этом локализованный характер трансдукции с достаточным уровнем экспрессии во времени [22, 28, 44]. Однако тот факт, что лентивирусы способны реплицироваться в неделящихся клетках, остается нерешенной проблемой виротерапии, применяемой в лечении опухолей [56].

Заключение

В результате обзора научной литературы мы пришли к выводу, что на данный момент не было зафиксировано ни одного исследования скаффолд-опосредованной доставки вирусного вектора в контексте онколитической виротерапии. В большинстве исследований биоматериалы и векторы применяются для регенеративных целей, однако опыт исследований, безусловно, может быть применен для терапии онкологических заболеваний [57–60]. Наиболее значимые для данного обзора исследования суммированы в таблице. Помимо явных преимуществ в виде сниженной иммуногенности, таргетированной локализации и длительного поддержания высоких концентраций вирусного вектора, скаффолд-опосредованная доставка позволит комплексно видоизменять матрикс

опухолевой ткани, таким образом терапевтически воздействуя на строму [61–63].

Возможность широкой настройки свойств скаффолда посредством выбора материалов и культивирования клеток на его поверхности может стать серьезным подспорьем в лечении опухолей различных органов и тканей. Методы иммобилизации позволяют нековалентно связывать вирусные частицы с поверхностью скаффолда, сохраняя на протяжении длительного времени эффективный уровень трансдукции вируса *in vivo*, в сравнении с доставкой невирусных векторов либо с болюсной доставкой.

Имплантиция скаффолд-систем в место локализации опухоли позволит обеспечить длительную трансдукцию раковых клеток, исключая или минимизируя диффузию в здоровые ткани, а возможность влиять на состав внеклеточного матрикса (в теории) позволяет ожидать терапевтического эффекта [64–66] и предотвращения образования метастазов [64, 67, 68]. Таким образом, мы бы хотели привлечь внимание ученых к исследованию вирусной скаффолд-опосредованной доставки в рамках терапии рака, так как полагаем, что данная технология позволит улучшить эффективность как виротерапии, так и онкотерапии в целом.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Vardell E. Global Health Observatory Data Repository. Med Ref Serv 2020;39(1):67–74. DOI: 10.1080/02763869.2019.1693231.
- Lang F.F., Conrad C., Gomez-Manzano C. et al. Phase I study of DNX-2401 (delta-24-RGD) oncolytic adenovirus: replication and immunotherapeutic effects in recurrent malignant glioma. J Clin Oncol 2018;36(14):1419–27. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.8219.
- Streby K.A., Geller J.I., Currier M.A. et al. Intratumoral injection of HSV1716, an oncolytic herpes virus, is safe and shows evidence of immune response and viral replication in young cancer patients. Clin Cancer Res 2017;23(14):3566–74. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2900.
- Draganov D.D., Santidrian A.F., Minev I. et al. Delivery of oncolytic vaccinia virus by matched allogeneic stem cells overcomes critical innate and adaptive immune barriers. J Transl Med 2019;17(1):100. DOI: 10.1186/s12967-019-1829-z.
- Kazimirsky G., Jiang W., Slavin S. et al. Mesenchymal stem cells enhance the oncolytic effect of Newcastle disease virus in glioma cells and glioma stem cells via the secretion of TRAIL. Stem Cell Res Ther 2016;7(1): 149. DOI: 10.1186/s13287-016-0414-0.
- Mooney R., Majid A.A., Batalla-Covello J. et al. Enhanced Delivery of Oncolytic Adenovirus by Neural Stem Cells for Treatment of Metastatic Ovarian Cancer. Mol Ther Oncolytics 2020;17:508. DOI: 10.1016/j.omto.2020.05.005.
- Pannier A.K., Shea L.D. Controlled release systems for DNA delivery. Mol Ther 2004;10(1):19–26. DOI: 10.1016/j.ymthe.2004.03.020.
- Dang J.M., Leong K.W. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. Adv Drug Deliv Rev 2006;58(4):487–99. DOI: 10.1016/j.addr.2006.03.001.
- Zhang Y., Cheng X., Wang J. et al. Novel chitosan/collagen scaffold containing transforming growth factor- β 1 DNA for periodontal tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun 2006;344(1):362–9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.03.106.
- Perea-Gil I., Prat-Vidal C., Bayes-Genis A. *In vivo* experience with natural scaffolds for myocardial infarction: the times they are a-changin'. Stem Cell Res Ther 2015;6:248. DOI: 10.1186/s13287-015-0237-4.
- Brown B.N., Londono R., Tottet S. et al. Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials. Acta Biomater 2012;8(3):978–87. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.11.031.
- Rowland C.R., Glass K.A., ETTYREDDY A.R. et al. Regulation of decellularized tissue remodeling via scaffold-mediated lentiviral delivery in anatomically-shaped osteochondral constructs. Biomaterials 2018;177:161–75. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.049.
- Reyes R., Delgado A., Solis R. et al. Cartilage repair by local delivery of transforming growth factor- β 1 or bone morphogenetic protein-2 from a novel, segmented polyurethane/poly(lactic-co-glycolic) bilayered scaffold. J Biomed Mater Res A 2014;102(4):1110–20. DOI: 10.1002/jbma.34769.
- Shao X., Goh J.C.H., Huttmacher D.W. et al. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. Tissue Eng 2006;12(6):1539–51. DOI: 10.1089/ten.2006.12.1539.
- Asawa Y., Sakamoto T., Komura M. et al. Early stage foreign body reaction against biodegradable polymer scaffolds affects tissue regeneration during the autologous

- transplantation of tissue-engineered cartilage in the canine model. *Cell Transplant* 2012;21(7):1431–42. DOI: 10.3727/096368912X640574.
16. Shin S., Salvay D.M., Shea L.D. Lentivirus delivery by adsorption to tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2010;93(4):1252–9. DOI: 10.1002/jbm.a.32619.
 17. Lee S., Kim J.S., Chu H.S. et al. Electrospun nanofibrous scaffolds for controlled release of adeno-associated viral vectors. *Acta Biomater* 2011;7(11):3868–76. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.06.035.
 18. Howard D., Buttery L.D., Shakesheff K.M., Roberts S.J. Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat* 2008;213(1):66–72. DOI: 10.1111/j.1469-7580.2008.00878.x.
 19. Willerth S.M., Sakiyama-Elbert S.E. Combining Stem Cells and Biomaterial Scaffolds for Constructing Tissues and cell delivery. In: *StemBook*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. 2008. DOI: 10.3824/stembook.1.1.1.
 20. Bhati R.S., Mukherjee D.P., McCarthy K.J. et al. The growth of chondrocytes into a fibronectin-coated biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res* 2001;56(1):74–82. DOI: 10.1002/1097-4636(200107)56:1<74::aid-jbm1070>3.0.co;2-m.
 21. Mohamadyar-Toupkanlou F., Vasheghani-Farahani E., Hanaee-Ahvaz H. et al. Osteogenic Differentiation of MSCs on Fibronectin-Coated and nHA-Modified Scaffolds. *ASAIO J* 2017;63(5):684–91. DOI: 10.1097/MAT.0000000000000551.
 22. Glass K.A., Link J.M., Brunger J.M. et al. Tissue-engineered cartilage with inducible and tunable immunomodulatory properties. *Biomaterials* 2014;35(22):5921–31. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.073.
 23. Cam C., Segura T. Matrix-based gene delivery for tissue repair. *Curr Opin Biotechnol* 2013;24(5):855–63. DOI: 10.1016/j.copbio.2013.04.007.
 24. Qi K., Li N., Zhang Z., Melino G. Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cell Immunol* 2018;326:86–93. DOI: 10.1016/j.cellimm.2017.11.010.
 25. Guo X., Zheng Q., Kulbatski I. et al. Bone Regeneration With Active Angiogenesis by Basic Fibroblast Growth Factor Gene Transfected Mesenchymal Stem Cells Seeded on Porous beta-TCP Ceramic Scaffolds. *Biomed Mater* 2006;1(3):93–9. DOI: 10.1088/1748-6041/1/3/001.
 26. Richardson S.M., Curran J.M., Chen R. et al. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials* 2006;27(22):4069–78. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.03.017.
 27. Hu W.W., Wang Z., Hollister S.J., Krebsbach P.H. Localized viral vector delivery to enhance *in situ* regenerative gene therapy. *Gene Ther* 2007;14(11):891–901. DOI: 10.1038/sj.gt.3302940.
 28. Brunger J.M., Huynh N.P., Guenther C.M. et al. Scaffold-mediated lentiviral transduction for functional tissue engineering of cartilage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(9):E798–806. DOI: 10.1073/pnas.1321744111.
 29. Phillips J.E., Burns K.L., Le Doux J.M. et al. Engineering graded tissue interfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(34):12170–5. DOI: 10.1073/pnas.0801988105.
 30. Stojanov S., Berlec A. Electrospun Nanofibers as Carriers of Microorganisms, Stem Cells, Proteins, and Nucleic Acids in Therapeutic and Other Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:130. DOI: 10.3389/fbioe.2020.00130.
 31. Maurmann N., Sperling L.E., Pranke P. Electrospun and Electrospayed Scaffolds for Tissue Engineering. *Adv Exp Med Biol* 2018;1078:79–100. DOI: 10.1007/978-981-13-0950-2_5.
 32. Zdechlik A.C., He Y., Aird E.J. et al. Programmable Assembly of Adeno-Associated Virus-Antibody Composites for Receptor-Mediated Gene Delivery. *Bioconjug Chem* 2020;31(4):1093–106. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00790.
 33. Hu W.W., Lang M.W., Krebsbach P.H. Development of adenovirus immobilization strategies for *in situ* gene therapy. *J Gene Med* 2008;10(10):1102–12. DOI: 10.1002/jgm.1233.
 34. Hu W.W., Wang Z., Krebsbach P.H. Virus immobilization on biomaterial scaffolds through biotin-avidin interaction for improving bone regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2016;10(2):E63–72. DOI: 10.1002/term.1774.
 35. Huynh N.P.T., Brunger J.M., Gloss C.C. et al. Genetic Engineering of Mesenchymal Stem Cells for Differential Matrix Deposition on 3D Woven Scaffolds. *Tissue Eng Part A* 2018;24(19–20):1531–44. DOI: 10.1089/ten.TEA.2017.0510.
 36. Dreifke M.B., Ebraheim N.A., Jayasuriya A.C. Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A* 2013;101(8):2436–47. DOI: 10.1002/jbm.a.34521.
 37. Chang B., Ahuja N., Ma C., Liu X. Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. *Mater Sci Eng R Rep* 2017;111:1–26. DOI: 10.1016/j.mser.2016.11.001.
 38. Ueda N., Atsuta I., Ayukawa Y. et al. Novel application method for mesenchymal stem cell therapy utilizing its attractant-responsive accumulation property. *Appl Sci* 2019;9(22):4908. DOI: 10.3390/app9224908.
 39. Ercan H., Durkut S., Koc-Demir A. et al. Clinical Applications of Injectable Biomaterials. *Adv Exp Med Biol* 2018;1077:163–82. DOI: 10.1007/978-981-13-0947-2_10.
 40. Ehtesham M., Yuan X., Kabos P. et al. Glioma tropic neural stem cells consist of astrocytic precursors and their migratory capacity is mediated by CXCR4. *Neoplasia* 2004;6(3):287–93. DOI: 10.1593/neo.3427.
 41. Kim S.U. Human neural stem cells genetically modified for brain repair in neurological disorders. *Neuropathology* 2004;24(3):159–71. DOI: 10.1111/j.1440-1789.2004.00552.x.
 42. Kim K., Lam J., Lu S. et al. Osteochondral tissue regeneration using a bilayered composite hydrogel with modulating dual growth factor release kinetics in a rabbit model. *J Control Release* 2013;168(2):166–78. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.03.013.
 43. Sun H., Mei L., Song C. et al. The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials* 2006;27(9):1735–40. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.09.019.
 44. Moutos F.T., Glass K.A., Compton S.A. et al. Anatomically shaped tissue-engineered cartilage with tunable and inducible anticytokine delivery for biological joint resurfacing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;113(31):E4513–22. DOI: 10.1073/pnas.1601639113.
 45. Lu S., Lam J., Trachtenberg J.E. et al. Dual growth factor delivery from bilayered, biodegradable hydrogel composites for spatially-guided osteochondral tissue repair. *Biomaterials* 2014;35(31):8829–39. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.006.
 46. Zhang Y., Fan W., Nothdurft L. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of adenovirus combined silk fibroin scaffolds for bone morphogenetic protein-7 gene delivery. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(8):789–97. DOI: 10.1089/ten.tec.2010.0453.
 47. Yang C., Blum N.T., Lin J. et al. Biomaterial scaffold-based local drug delivery systems for cancer immunotherapy. *Science Bul* 2020;65(17):1489–504. DOI: 10.1016/j.scib.2020.04.012.
 48. Khorshidi S., Karhaneh R. A review on gradient hydrogel/fiber scaffolds for osteochondral regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2018;12(4):e1974–e1990. DOI: 10.1002/term.2628.
 49. Okino H., Manabe T., Tanaka M., Matsuda T. Novel therapeutic strategy for prevention of malignant tumor recurrence after surgery: Local delivery and prolonged release of adenovirus immobilized in photocured, tissue-

- adhesive gelatinous matrix. *J Biomed Mater Res A* 2003;66(3):643–51. DOI: 10.1002/jbm.a.10016.
50. Rowland C.R., Colucci L.A., Guilak F. Fabrication of anatomically-shaped cartilage constructs using decellularized cartilage-derived matrix scaffolds. *Biomaterials* 2016;91:57–72. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.012.
 51. Pinheiro A., Cooley A., Liao J. et al. Comparison of natural crosslinking agents for the stabilization of xenogenic articular cartilage. *J Orthop Res* 2016;34(6):1037–46. DOI: 10.1002/jor.23121.
 52. Elder S., Pinheiro A., Young C. et al. Evaluation of genipin for stabilization of decellularized porcine cartilage. *J Orthop Res* 2017;35(9):1949–57. DOI: 10.1002/jor.23483.
 53. Burnsed O.A., Schwartz Z., Marchand K.O. et al. Hydrogels derived from cartilage matrices promote induction of human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation. *Acta Biomater* 2016;43:139–49. DOI: 10.1016/j.actbio.2016.07.034.
 54. Raisin S., Belamie E., Morille M. Non-viral gene activated matrices for mesenchymal stem cells based tissue engineering of bone and cartilage. *Biomaterials* 2016;104:223–37. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.017.
 55. Madrigal J.L., Stilhano R., Silva E.A. Biomaterial-guided gene delivery for musculoskeletal tissue repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2017;23(4):347–61. DOI: 10.1089/ten.TEB.2016.0462.
 56. Carter B., Burstein H., Peluso R. Adeno-associated Virus and AAV Vectors for Gene Delivery. In: *Gene and Cell Therapy*. CRC Press, 2003. P. 71–101. DOI: 10.1201/9780824758608.ch5.
 57. Li L., Liu S., Han D. et al. Delivery and Biosafety of Oncolytic Virotherapy. *Front Oncol* 2020;10:475. DOI: 10.3389/fonc.2020.00475.
 58. Marchini A., Scott E.M., Rommelaere J. Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade. *Viruses* 2016;8(1):9. DOI: 10.3390/v8010009.
 59. Merchan J., Toro Bejarano M. Targeting tumor vasculature through oncolytic virotherapy: recent advances. *Oncolytic Virother* 2015;4:169–81. DOI: 10.2147/OV.S66045.
 60. Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(9):660. DOI: 10.1038/nrd.2016.178.
 61. Valkenburg K.C., De Groot A.E., Pienta K.J. Targeting the tumour stroma to improve cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2018;15(6):366–81. DOI: 10.1038/s41571-018-0007-1.
 62. Khan Z., Marshall J.F. The role of integrins in TGF β activation in the tumour stroma. *Cell Tissue Res* 2016;365(3):657–73. DOI: 10.1007/s00441-016-2474-y.
 63. Bougnaud S., Golebiewska A., Oudin A. et al. Molecular crosstalk between tumour and brain parenchyma instructs histopathological features in glioblastoma. *Oncotarget* 2016;7:31955–71. DOI: 10.18632/oncotarget.7454.
 64. Kolb A.D., Bussard K.M. The bone extracellular matrix as an ideal milieu for cancer cell metastases. *Cancers* 2019;11(7):1020. DOI: 10.3390/cancers11071020.
 65. Filipe E.C., Chitty J.L., Cox T.R. Charting the unexplored extracellular matrix in cancer. *Int J Exp Pathol* 2018;99:58–76. DOI: 10.1111/iep.12269.
 66. Juurikka K., Butler G.S., Salo T. et al. The role of MMP8 in cancer: A systematic review. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4506. DOI: 10.3390/ijms20184506.
 67. Gao Y., Bado I., Wang H. et al. Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil. *Developmental Cell* 2019;49:375–91. DOI: 10.1016/j.devcel.2019.04.012.
 68. Seyfried T.N., Huysentruyt L.C. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog* 2013;18:43–73. DOI: 10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.40.

Вклад авторов

А.А. Лаевская, В.В. Косенчук, С.И. Якушов: анализ литературы, разработка идеи и структуры статьи, написание текста;
И.В. Уласов, П.С. Тимашев: разработка структуры статьи, концепции статьи и редактирование текста.

Authors contributions

A.A. Laevskaya, V.V. Kosenchuk, S.I. Yakushov: literature search, design and set up structure of manuscript;
I.V. Ulasov, P.S. Timashev: design structure of review and text editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.С. Тимашев / P.S. Timashev: <https://orcid.org/0000-0001-7773-2435>
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.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-02-00712).

Financing. Financial support was available by Russian Foundation for Basic Research (project No 20-02-00712).

Статья поступила: 29.11.2020. Принята к публикации: 16.04.2021.

Article submitted: 29.11.2020. Accepted for publication: 16.04.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-31-41>

Современные иммунотерапевтические таргетные системы доставки гранзимов в лечении злокачественных новообразований

И.В. Ярош¹, В.А. Мисюрин², И.И. Краснюк¹

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: Илья Валерьевич Ярош ilya96yarosh@gmail.com

Основное свойство, которым обладают киллерные клетки человека, – цитотоксичность. Реакция цитотоксичности киллерных клеток человека достигается при помощи комплекса молекул, в том числе перфоринов, гранзима, катепсина и др. При этом для гибели клеток-мишеней достаточно всего 1 молекулы – гранзима, тогда как остальные молекулы предназначены для его активации и доставки в цитоплазму клеток-мишеней.

Предметом настоящего обзора являются гранзимы, которые представляют собой семейство сериновых протеаз и выполняют свою функцию в организме человека как интегральные цитолитические эффекторы во время программируемой клеточной смерти раковых и патоген-инфицированных клеток. Секретируемые преимущественно цитотоксическими Т-лимфоцитами и натуральными киллерами, гранзимы осуществляют инициацию апоптоза по каспазозависимым и каспазозависимым путям. Данные природные свойства делают гранзимы одними из наиболее перспективных человеческих ферментов для использования при разработке целевых терапевтических стратегий в лечении различных видов рака. При этом наиболее привлекательным является гранзим В, так как он обладает наиболее сильными эффекторными свойствами. К настоящему времени разработано несколько подходов для доставки молекул гранзима к опухолевым клеткам и облегчения его проникновения через клеточную мембрану. Более того, предлагаются некоторые решения по преодолению резистентности клеток-мишеней к гранзим-опосредованному апоптозу.

Цель данного обзора литературы – систематизация информации о применении гранзима В в исследованиях как компонента наноструктурных систем доставки лекарственных препаратов для лечения солидных и гематологических злокачественных новообразований. Кроме того, в настоящем обзоре рассмотрены преимущества и сложности использования гранзимов.

Ключевые слова: гранзимы, перфорин, цитотоксические Т-лимфоциты, натуральные киллеры, катепсин С

Для цитирования: Ярош И.В., Мисюрин В.А., Краснюк И.И. Современные иммунотерапевтические таргетные системы доставки гранзимов в лечении злокачественных новообразований. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):31–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-31-41.

Novel immunotherapeutic targeted granzyme delivery systems in treatment of malignant tumors

Ilya V. Yarosh¹, Vsevolod A. Misyurin², Ivan I. Krasnyuk¹

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

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

Contacts: Ilya Valerievich Yarosh ilya96yarosh@gmail.com

Cytotoxicity is the main human killer cell property. The cytotoxicity reaction of human killer cells is achieved through a complex of molecules, including perforins, granzyme, cathepsin and others. However, only one molecule is enough for target cell death: granzyme. Other molecules are intended for granzyme activation and its delivery

to the target cell cytoplasm. Granzymes are a whole family of serine proteases that perform their function in the human body as integral cytolytic effectors during programmed cell death of cancer and pathogen-infected cells. Secreted mainly by cytotoxic T-lymphocytes and NK-cells, granzymes initiate apoptosis via caspase-dependent and caspase-independent pathways. These natural properties make granzymes one of the most promising human enzymes for use in the development of targeted therapeutic strategies in the treatment of various types of cancer. The most promising is granzyme B, because it has the most powerful effector properties. Due to the initiation of cascade reactions that activate apoptosis, granzyme is attractive as a basis for the development of medicines applicable in clinical oncology. At this time, several approaches have been developed for delivering granzyme molecules to tumor cells and facilitating its penetration through the cell membrane. Moreover, some solutions are proposed to overcome the resistance of target cells to granzyme-mediated apoptosis. These approaches are discussed in this review.

The purpose of this review was to systematize information on the use of granzyme B as a nanostructured drug delivery system in the treatment of solid and hematological malignancies. In addition, this review discusses ways to overcome the resistance of granzyme penetration into target cells.

Key words: granzymes, perforin, cytotoxic T-lymphocytes, natural killer cells, cathepsin C

For citation: Yarosh I.V., Misyurin V.A., Krasnyuk I.I. Novel immunotherapeutic targeted granzyme delivery systems in treatment of malignant tumors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(2):31–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-31-41.

Введение

Гранзимы — это группа протеолитических ферментов, сериновых протеаз, которые в основном экспрессируются, хранятся и специфически высвобождаются из цитоплазматических гранул цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) и натуральных киллеров (НК) для атаки клеток-мишеней. Гранзимы выполняют важную инициативную роль активации апоптоза в инфицированных и злокачественных клетках. Гранзим-опосредованный апоптоз проходит как по «классическому» пути — через активацию каспаз, сопровождаясь фрагментацией ДНК, так и с некоторыми свойствами некроза, такими как деградация плазматической мембраны [1–3].

Впервые гранзимы были очищены и охарактеризованы исследовательской группой Jürg Tschopp в 1987 г. Первоначально другой гранулированный белок, перфорин (также известный как цитолизин), считался единственным медиатором разрушения клеток-мишеней. Однако D. Masson и J. Tschopp, работая с линией мышей B6.1, доказали значимую роль гранзимов в активации апоптоза. Всего было очищено 8 типов гранзимов (A, B, C, D, E, F, G, H) мышей, частично определена их структура и субстратная специфичность. Два из них соответствуют белкам, кодируемым генами цитотоксической клеточной протеазы (CCP), клонированными лабораторией Bleackley. На протяжении 5 лет молекулы неофициально назывались Grs, до тех пор пока исследовательская группа лаборатории Bleackley не признала это наименование [3].

Типы гранзимов, их функции и отличия

У людей экспрессируются 5 типов гранзимов: A, B, H, K и M, в то время как у мышей — 11 типов. Гранзим A (ГрА) и гранзим B (ГрВ) являются наиболее биологически значимыми и экспрессируются чаще,

чем другие гранзимы, и поэтому наиболее изучены. ГрА ведет себя как триптаза благодаря тому, что расщепляет субстраты с основными остатками в положении P1 (аргинин и лизин). ГрА синтезируется в качестве неактивного белка-предшественника и активируется, когда катепсин С удаляет N-терминальный дипептид. ГрА при попадании в митохондрии разрушает цепь переноса электронов. Вследствие этого образуется синглетный кислород — активная форма кислорода, токсичная для клеток-мишеней. Кроме того, ГрА инициирует апоптоз клеток-мишеней путем активации белка, называемого SET, который отменяет ингибирование 2-го белка, NME-1. Интересно, что человеческий ГрА не был цитотоксичным при введении в опухолевые клетки человека или мыши, тогда как мышинный белок проявлял сильную цитолитическую активность. Гранзимы, по видимому, эволюционировали видоспецифичным образом, как посредством дупликации генов, так и посредством вариативности субстрата [2, 4–6].

ГрВ представляет собой 32 кДа аспартилсериновую протеазу, содержащуюся в основном в цитотоксических гранулах ЦТЛ, НК-клеток и лимфокин-активируемых киллеров [5–7]. Он также известен как ЦТЛ-ассоциированная серинэстераза 1 или протеиназа цитотоксических клеток 1 (CCP1), или гранзим 2, или фрагментин-2. Ген, кодирующий ГрВ, имеет длину ~3500 п. н., содержит 5 экзонов и 4 интрона и расположен на 14-й хромосоме человека. ГрВ является наиболее мощным из всех гранзимов человека, продуцируемых ЦТЛ. Из-за своей цитотоксической природы он экспрессируется как неактивный препрофермент и становится функциональным благодаря удалению 2 пропептидных остатков (дипептида Gly-Glu с его N-конца) лизосомальной дипептидилпептидазой I/катепсином С. Человеческий ГрВ

в 30 раз более цитотоксичен, чем мышинный белок, что было определено *in vitro* при совместной инкубации различных опухолевых клеток с очищенным перфорином и гранзимами [8].

Биологическая активность ГрВ во время опосредованного ЦТЛ или НК-клетками иммунного ответа зависит от совместного высвобождения с порообразующим белком, называемым перфорином, к клеткам-мишеням в межклеточных пространствах, называемых иммунологическими синапсами [9, 10]; успешного проникновения в цитозоль клетки (процесс, который до сих пор широко обсуждается и есть предположение, что он должен быть опосредован перфорином либо через образование пор в клеточной мембране, либо через дестабилизацию ионного градиента для образования пор в эндосомальных пузырьках) [11]; активации нескольких проапоптотических путей через протеолитическую атаку нескольких внутриклеточных белковых субстратов.

В настоящее время известно до 300 внутриклеточных субстратов, расщепляемых ГрВ. Из них только малая часть участвует в апоптозе, опосредованном ГрВ [5–8]. Среди субстратов наиболее значимыми являются члены семейства каспаз-3, -6, -7, -8, -9, -10 и проапоптотический белок (Bid). Ядерный проапоптотический путь связан с человеческим ГрВ и включает расщепление регуляторных белков клеточного цикла и/или активацию циклинзависимых киназ (CDC). Кроме того, был описан потенциал ГрВ для непосредственного запуска посткаспазного цитоплазматического пути апоптотической гибели. Способность активировать множественные пути индукции апоптоза (включая индукцию фрагментации ДНК) в клетках-мишенях позволяет проводить разработку наноструктурных систем доставки на основе ГрВ, что может быть привлекательным решением для терапии различных видов рака [5].

Гранзимы М, Н и F вызывают гибель клеток, которая сопровождается выходом цитохрома С из митохондрий [12]. Классы ферментов белков-гранзимов имеют следующие функции: гранзим Н представляет собой химазу, гранзим К – триптазу (подобно А) и гранзим М – метапу [2].

Механизм действия гранзима – активация апоптоза в неопластических клетках

В организме человека доставку гранзимов к опухолевым и патоген-инфицированным клеткам осуществляют ЦТЛ и НК-клетки [4, 13, 14]. Адгезия ЦТЛ, лимфокин-активируемых киллеров и НК-клеток с клетками-мишенями приводит к образованию иммунологического синапса. После этого цитотоксические секреторные гранулы, содержащие гранулин, перфорины, гранзимы и катепсин С, движутся

вдоль микротрубочек в цитоплазме киллерных клеток и высвобождаются в область синапса [15].

Вопрос о способе проникновения гранзима в клетку-мишень разрешен не до конца. Недавние исследования показали, что перфорин необходим для повреждения мембран, в то время как гранзимы необходимы для быстрой фрагментации ДНК клеток-мишеней. Перфорин может способствовать цитолизу посредством 2 различных механизмов. При одном механизме гранулин изменяет проницаемость мембраны и облегчает вставку перфорина в клеточные мембраны-мишени; перфорин образует гомополимерные поры, через которые гранзимы проникают в клетку-мишень. При другом механизме белок, известный как серглицин, собирает комплекс гранулина, перфорина и гранзимов в иммунном синапсе между эффекторными клетками и клетками-мишенями; комплекс поглощается клетками-мишенями с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза и помещается в цитоплазматическую эндосому; гранулин и перфорин создают поры в эндосомальной мембране, через которые выделяют гранзимы в цитоплазму [4–7, 16].

На данный момент существуют 2 основные модели, описывающие доставку гранзима в цитоплазму клетки-мишени: модель «взрыва везикул» и модель «доставки пор». В соответствии с моделью «взрыва везикул» гранзимы, высвобождаемые в синаптическое пространство, могут связывать рецепторы маннозы-6-фосфата (M6P, MPR) непосредственно на поверхности клеток-мишеней, эндоцитозироваться и высвобождаться в цитоплазму, вызывая апоптоз. Дальнейшие исследования подтвердили эту модель, показав, что сульфат гепарина (среди других протеогликанов), связанный с рецепторами M6P, как стабилизировал, так и усиливал поглощение ГрВ *in vitro* в отсутствие перфорина [1, 5–8]. Однако *in vivo* это наблюдение имеет сомнительное значение, поскольку перфорин необходим для цитотоксического эффекта, опосредованного через путь экзоцитоза гранул. Другая модель, называемая моделью «доставки пор», соответствует требованию к эффективному гранулированному уничтожению и считается «классическим» механизмом [5]. Он характеризуется диффузией гранзимов через поры полиперфорина в цитоплазму из пузырьков *de novo*, возникших в результате эндоцитоза клеткой-мишенью [1, 2].

Хотя MPR и перфорин, как полагают, важны для доставки ГрВ, несколько исследовательских групп сообщили об альтернативном механизме проникновения ГрВ в клетку. Этот процесс может облегчаться другими белками, связанными с клеточной поверхностью, такими как белок теплового шока 70 (Hsp70). Hsp70, присутствующий на поверхности опухолевых клеток, не только облегчает движение ГрВ в опухолевую

Опыт международных исследований по применению гранзима В

Ввиду способности гранзима активировать апоптоз, неоднократно проводились попытки его использования в качестве терапевтического агента. Разработка таргетных терапевтических средств на основе гранзимов сопровождается рядом проблем. На поверхности GrV содержится ряд основных аминокислот, вследствие чего для белка характерна высокая изоэлектрическая точка. Это приводит к неспецифическому связыванию или поглощению GrV отрицательно заряженными клетками. Более того, подобное свойство увеличивает вероятность иммуногенности, тем самым снижая терапевтический потенциал иммунотоксина [17]. Ферментативная активность GrV строго контролируется присутствием ингибитора серпина В9 (PI-9, также известного как ингибитор протеиназы 9). PI-9 необходим для защиты ЦТЛ и окружающих клеток в случае спонтанного высвобождения GrV.

PI-9 – природный ингибитор апоптоза, представляет собой протеазу, которая инактивирует другие протеазы, в том числе GrV. Инактивирование достигается путем простой ассоциации 1 молекулы PI-9 с 1 молекулой GrV и ее последующим расщеплением [18, 19]. Как известно, синаптическое высвобождение GrV из ЦТЛ может вызвать «братоубийство» и «самоубийство» ЦТЛ и НК-клеток. Это происходит, когда GrV возвращается обратно в иммунную клетку. Кроме того, секретируемый GrV может подвергнуться эндоцитозу ЦТЛ или окружающими клетками, высвободиться в цитоплазме после эндолизосомного стресса, кульминацией которого является «братоубийство» и/или «самоубийство» путем GrV-опосредованного апоптоза. Все эти негативные эффекты GrV успешно подавляются PI-9 [20].

Однако PI-9 может экспрессироваться не только в нормальных или киллерных клетках, но также и в опухолевых. В случае значительной активности PI-9 делает методы лечения на основе GrV неэффективными. Чтобы устранить эти недостатки, некоторые исследователи вносили изменения в структуру GrV [18, 19]. К настоящему моменту известно о нескольких подходах, позволяющих решить или обойти эти проблемы. Около 10 лет назад использование GrV в таргетной терапии было начато лабораториями Майкла Дж. Розенблюма (MD Anderson Cancer Center, Хьюстон, Техас, США) и Стефана Барта (IDM, Факультет медицинских наук, Университет Кейптауна, Южная Африка). Суть разработки заключалась в слиянии фрагмента антитела или производного природного лиганда с карбоксильным концом GrV. Полученная форма нацеливала поверхностный белок или рецептор на опухолевую клетку. Соответствующие гибридные белки, называемые иммунопротеазами,

подвергались селективному лиганд-опосредованному поглощению и доставке GrV в клетки-мишени при отсутствии перфорина (см. рис. 1) [21]. Было разработано несколько вариантов цитолитических химерных белков человека (hCFP) на основе GrV, направленных на разные поверхностные белки на клетках-мишенях для различных заболеваний (табл. 1) [22–25].

Разрабатывались и другие подходы по доставке активного GrV в цитозоль клеток-мишеней после системного применения без каких-либо терапевтических ограничений. Данные по улучшенным версиям химерных цитолитических белков человека на основе GrV, произведенных исследователями F.C. Kurschus, C.H. Bird и др. за последнее десятилетие, представлены в табл. 2 и 3 [17, 26–28].

Было показано, что гибридный белок GrV-H22 (scFv) эффективен в уничтожении клеток CD64+ U937 (лимфобластов легких человека) и клеток пациентов с острым миелоидным лейкозом, экспрессирующих CD64 на поверхности [29]. Значительная активация каспазы-3 в лизате клеток, обработанных GrV, по сравнению с необработанным контролем, подтвердила способность гибридного белка GrV-H22 (scFv) инициировать апоптоз в клетках-мишенях [30].

Используя аналогичный подход, группа М.Дж. Розенблюма в своих ранних исследованиях также продемонстрировала терапевтический потенциал конструкций на основе GrV. Слияние GrV с одноцепочечным фрагментом антитела против меланомы (scFvMEL), нацеленным на клетки меланомы A375-M человека, вызывало апоптоз через 8 ч после обработки. Результаты показали, что такие пути апоптоза, как расщепление каспазы-3 и высвобождение цитохрома С из митохондрий в цитозольный компартмент, опосредованы конструкцией GrV-scFvMEL [30]. Таким образом, несколько цитолитических гибридных белков на основе GrV были разработаны для терапии различных карцином [18, 20, 30, 31].

В другом международном исследовании J. Yang и соавт. выявили потенциальную цитотоксическую роль GrV крупного рогатого скота в уничтожении клеток, инфицированных паразитом *Theileria parva* [32].

Кроме того, есть международный опыт исследования роли GrA в уничтожении бактерий штамма *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), однако он отрицательный [33]. В данной работе S. Uranga и соавт. сообщают, что ранее было проанализировано влияние перфорина и GrA на течение туберкулезной инфекции *in vivo*, но эти молекулы не имеют существенного вклада в бактериальный клиренс. Результаты проведенного исследования показали, что, хотя GrA экспрессируется цитотоксическими клетками в легких мышей во время течения легочной инфекции,

Таблица 1. Цитолитические химерные белки человека (hCFP) на основе гранзима В, устойчивые к ингибированию серпина В9, направленные на поверхностные белки, экспрессируемые при различных злокачественных заболеваниях [22–25]

Table 1. Human cytolytic chimeric proteins (hCFP) based on granzyme B, resistant to inhibition of serpin B9, targeting surface proteins expressed in various cancers [22–25]

Конструкция гранзима В Granzyme B variant	Показание Indication	Мишень Target	Клеточные линии Cell lines	Экспрессия PI-9 на клеточной линии PI-9 expression in cell line	Цитотоксичность Cytotoxicity	Источник литературы Reference
GrB (wt)-H22 (scFv), GrBR201K-H22 (scFv)	ХММЛ CMML	CD64+	Клетки от пациентов с ОММЛ и ХММЛ Cells from AMML and CMML patients	Да Yes	Не указано Not specified	[22]
			CD64+ HL60	Нет No	4–7 нМ 4–7 nM	
GrB (wt)-ki4 (scFv), GrBR201K-Ki4 (scFv)	κЛХ cHL	CD30+	L428	Да Yes	–	[23]
			L540cy	Нет No	–	
GrBR201K-scFv1711	Эпидермоидные раковые клетки Epidermoid cancer cells	EGFR+	A431	Да Yes	133,3 нМ 133.3 nM	[24]
			RD-таргетные клетки RD target cells	Да Yes	21,1 нМ 21.1 nM	
GrBR201K-αEpCAM (scFv)	ТНРМЖ TNBC	EpCAM+	MDA-MB-231	Да Yes	Не указано Not specified	[25]
			MDA-MB-468	Да Yes	221 нМ 221 nM	
			MDA-MB-453	Нет No	307 нМ 307 nM	

Примечание. ОММЛ – острый миеломоноцитарный лейкоз; ХММЛ – хронический миеломоноцитарный лейкоз; κЛХ – классическая лимфома Ходжкина; ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы.

Note. AMML – acute myelomonocytic leukemia; CMML – chronic myelomonocytic leukemia; cHL – classical Hodgkin's lymphoma; TNBC – triple-negative breast cancer.

его дефицит у нокаутных мышей не влияет на контроль инфекции *M. tuberculosis*. GrA не оказывает должного цитотоксического эффекта в отношении туберкулезной инфекции [33]. Кроме того, исследование показало, что отсутствие GrA не влияет на защиту, вызываемую живой аттенуированной вакциной против *M. tuberculosis* МТВВАС [34]. В целом результаты авторов находятся в явном противоречии с ранее опубликованными результатами *in vitro* и предполагают, что GrA не играет решающей роли *in vivo* в защитном ответе на туберкулезную инфекцию.

В 2019 г. было проведено международное исследование с участием китайских ученых X. Qian и соавт., посвященное конструированию таргетной системы доставки на основе GrB [34]. В качестве основного механизма апоптоза принят GrB/перфориновый механизм. Авторы создавали компонент, который бы

обладал такими же мембранолитическими – поробразующими свойствами, как и перфорин. В качестве такого вещества исследователями был использован пептид ТАТ, который в комплексе с GrB не только имитировал функцию перфорины, но и улучшил способность GrB проникать в клетки и инициировать апоптоз клеток-мишеней. Разработанный положительно заряженный конъюгированный комплекс GrB-Т был упакован в специальные наночастицы (называемые TCiGNPs) с помощью модифицированной p-2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолином (ПМФХ) гиалуроновой кислоты (ГК) для внеклеточного высвобождения комплекса GrB-Т. Полученные наночастицы (TCiGNPs) обладали способностью накапливаться в солидных опухолях благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания. ГК будет по своей природе нацеливаться на раковые

Таблица 2. Модифицированные формы гранзимы В (GrB) для улучшения специфического связывания и снижения токсичности вне мишени
 Table 2. Modified forms of granzyme B (GrB) for improved specific binding and reduced off-target toxicity

Конструкция гранзимы В Granzyme B variant	Мутация Mutation	Последствия мутации Implication of mutation	Результат Result	Источник литературы Reference
GzmB ^{HisD}	Последовательность кк1тпкк на С-конце заменена кислотным пептидом DSVLA человеческого комплементного фактора D The kktmkky sequence at the C-terminus was replaced with the acidic peptide DSVLA derived from human complement factor D	Этот мотив последовательности не является положительно заряженным и должен обладать небольшим иммуногенным потенциалом, поскольку фактор комплемента D встречается на относительно высоких уровнях в плазме человека This sequence motif is not positively charged and should have little immunogenic potential because complement factor D occurs at relatively high levels in human plasma	Связывание с клетками HL60 было полностью отменено Binding to HL60 cells was completely abolished	[26]
GzmB ^{KD}	Область вокруг K127 и K131 функционирует как сайт связывания гепарина в тромбине. Чтобы стабилизировать это, оба лизина были заменены остатками аспаргата The region around K127 and K131 is known to function as a heparin binding site in thrombin. To stabilize this, both lysines were replaced with aspartate residues	Уменьшено связывание HS Reduced HS binding	Снижение связывания с клетками HL60 по сравнению с GrB дикого типа Reduced binding to HL60 cells compared to wild type GrB	[26]
GzmB ^{KD-FacD}	Двойной мутант, состоящий из замены аспаргата в положении K127 и K131 и кислотного С-концевого пептида DSVLA Double mutant consisting with aspartate replacement at position K127 and K131 and the acidic C-terminal peptide DSVLA	Совокупный эффект мутации Combined effect of mutation	Эффективность связывания и интернализации была полностью отменена The binding and internalization efficiency was completely abolished	[26]
cs1	Аргинин в положениях 110, 114 и 116 (R110, R114 и R116) заменен аланином. Составляет измененный классический GAG-связывающий мотив Arginine in position 110, 114 and 116 (R110, R114, and R116) replaced with alanine. Constitutes an altered classical GAG-binding motif	Большинство белков связывают GAG. Мутация в этой области изменяет связывание GrB с отрицательно заряженными клетками Most proteins bind GAG. Mutation in this region alters binding of GrB to negatively charged cells	Цитотоксичность в 20 раз меньше по сравнению с GrB дикого типа. Связывание с гепариновой областью не происходит Reduced cytotoxic activity, 20-fold less cytotoxic compared to wild type Gr B. Abolished binding to Heparin region	[17]
cs2	Лизин в положениях 239, 240, 243 и 244 (K239, K240, K243 и K244) заменен аланином. Составляет измененную С-концевую спираль Lysine in position 239, 240, 243 and 244 (K239, K240, K243, and K244) replaced with alanine. Constitutes an altered C-terminal helix	Амфипатическая С-концевая спираль с парными основными остатками, связывающими GAG. Мутация в этой области изменяет связывание GrB с отрицательно заряженными клетками Amphipathic C-terminal helix that has paired basic residues that bind GAGs. Mutation in this region alters binding of GrB to negatively charged cells	Цитотоксичность в 2,5 раза ниже по сравнению с GrB дикого типа. Связывание с областью гепарина уменьшено Reduced cytotoxic activity, 2.5-fold less cytotoxic compared to wild type Gr B. Reduced binding to Heparin region	[17]
cs1 + cs2	Комбинированная мутация cs1 и cs2 Combined mutation of cs1 and cs2	Комбинированная мутация cs1 и cs2 Combined mutation of cs1 and cs2	Цитотоксичность в 20 раз меньше по сравнению с GrB дикого типа. Связывание с гепариновой областью не происходит Reduced cytotoxic activity, 20-fold less cytotoxic compared to wild type Gr B. Abolished binding to Heparin region	[17]

Таблица 3. Модифицированные формы гранзима В для улучшения цитотоксичности и обхода ингибирования серпина В9

Table 3. Modified forms of granzyme B to improve cytotoxicity and bypass the inhibition of serpin B9

Конструкция гранзима В Granzyme B variant	Мутация Mutation	Последствия мутации Implication of mutation	Источник литературы References
R28A	Замена остатка аргинина аланином (составляет нейтральный заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with alanine (constitutes a neutral charge at position 28)	В присутствии P1-9 мутант GrBR28A сохраняет 54 % активности In the presence of P1-9 the GrBR28A mutant contains 54 % activity	[27]
R28E	Замена остатка аргинина глутаматом (составляет противоположный заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with glutamate (constitutes an opposite charge at position 28)	В присутствии P1-9 мутант GrBR28E сохраняет 25 % активности In the presence of P1-9 the GrBR28E mutant contains 25 % activity	[27]
R28K	Замена остатка аргинина лизинном (составляет идентичный заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with lysine (constitutes an identical charge at position 28)	В присутствии P1-9 GrBR28K и мутанты сохранили 76 % их исходной активности In the presence of P1-9, the GrBR28K and mutants retained 76 % of their original activity	[27]
R201A	Замена остатка аргинина аланином (составляет нейтральный заряд в положении 201) Substitution of arginine residue with alanine (constitutes a neutral charge at position 201)	В присутствии P1-9 мутанты GrBR201A сохранили 46 % своей исходной активности In the presence of P1-9, the GrBR201A mutants retained 46 % of their original activity	[27]
R201E	Замена остатка аргинина глутаматом (составляет противоположный заряд в положении 201) Substitution of arginine residue with glutamate (constitutes an opposite charge at position 201)	Неактивен в присутствии P1-9 No activity in the presence of P1-9	[27]
R201K	Замена остатка аргинина лизинном (составляет одинаковый заряд в положении 28) Substitution of arginine residue with lysine (constitutes an identical charge at position 28)	В присутствии P1-9 мутант GrBR201K сохранил 94 % своей активности In the presence of P1-9, the GrBR201K mutant retained 94 % of its activity	[27]
K27A	Замена остатка лизина аланином (составляет нейтральный заряд в положении 27) Substitution of lysine residue with alanine (constitutes a neutral charge at position 27)	Нечувствительный к активности P1-9 и мутант K27A показали заметное снижение способности связывать и расщеплять субстрат (субстрат 3), содержащий остатки P1-9 Insensitive to P1-9 activity and K27A mutant showed a marked decrease in the ability to bind and cleave a substrate (substrate 3) containing P1-9 residues	[27]
R28A & R201A	Двойной мутант; аргинин заменен на аланин в положении 28 и 201 Double mutant; arginine replaced with alanine at position 28 and 201	В присутствии P1-9 двойной мутант сохраняет 0,5 % активности In the presence of P1-9 the double mutant contains 0.5 % activity	[27]
K27E & R28A (EA)	Двойной мутант; лизин заменен на глутамат в положении 27, а аргинин заменен на аланин в положении 28 Double mutant; lysine replaced with glutamate at position 27 and arginine replaced with alanine at position 28	В присутствии 50 % человеческого сыворотки ферментативная активность EA сохранялась на уровне более 40 % в течение 24 ч In the presence of 50 % human serum, the enzymatic activity of EA remained over 40 % over 24 h	[28]
K27L & R28A (LA)	Двойной мутант; лизин заменен на лейцин в положении 27, а аргинин заменен на аланин в положении 28 Double mutant; lysine replaced with leucine at position 27 and arginine replaced with alanine at position 28	LA двойной мутант, по-видимому, ведет себя промежуточно по отношению к белку дикого типа (GrB/VEGF121) и конструкции EA LA double mutant appeared to behave intermediate to the wild-type protein (GrB/VEGF121) and the EA construct	[28]

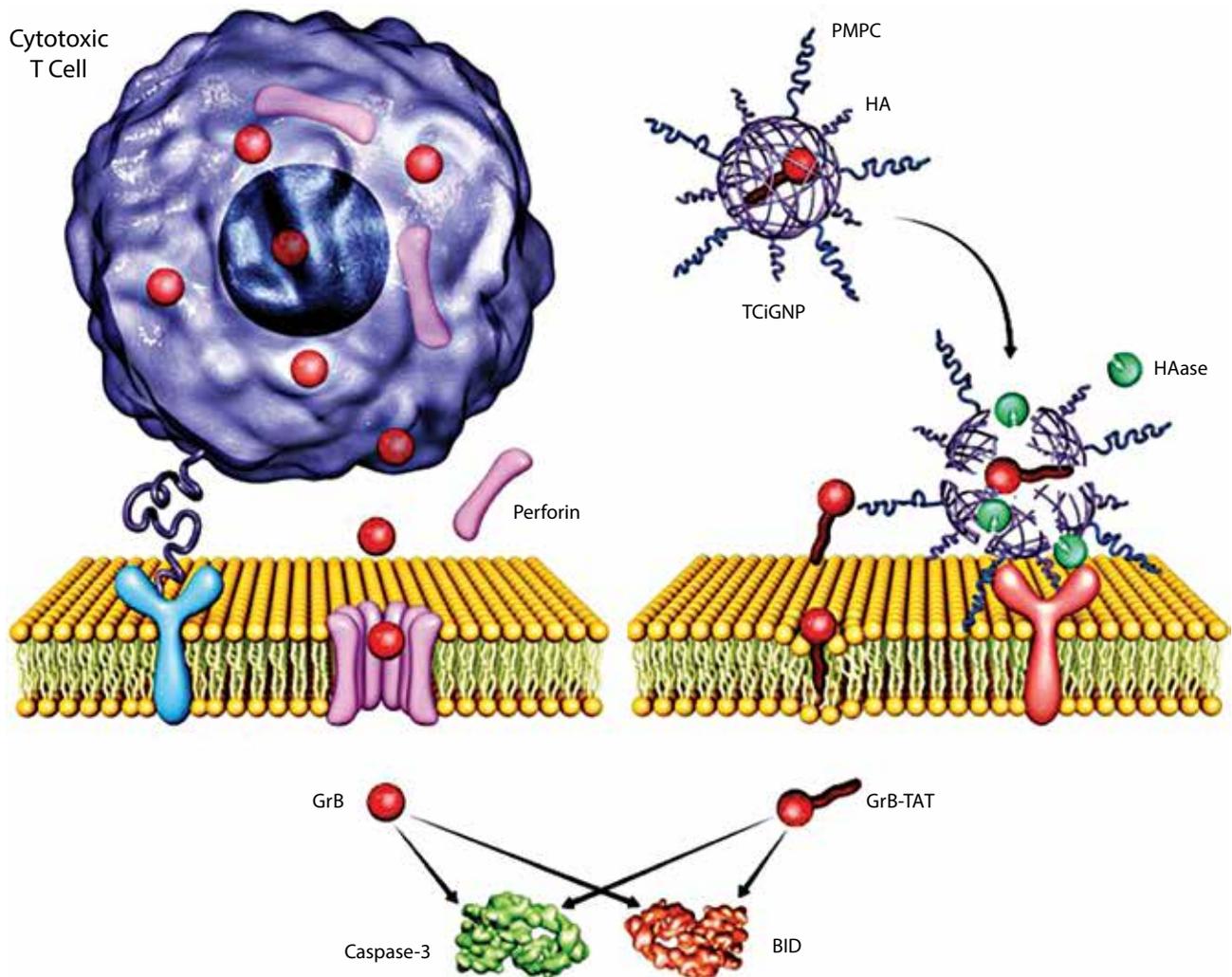


Рис. 2. Системы доставки гранзима В (GrB), которые функционально и структурно имитируют цитотоксические Т-лимфоциты (Cytotoxic T-Cell, CTL) для уничтожения раковых клеток-мишеней [34]: а – CTL доставляют GrB непосредственно в цитозоль клетки-мишени через поры плазматической мембраны, образованные перфорином; б – система доставки, состоящая из наночастиц TCiGNP, которые содержат ядро GrB-T (GrB-TAT) и оболочку гиалуроновая кислота/p-2-метакрилоилоксиэтилфосфорилхолин (HA/PMPC)

Fig. 2. Granzyme B (GrB) delivery system, which functionally and structurally mimics cytotoxic T-lymphocytes (Cytotoxic T-Cell, CTLs) to destroy target cancer cells [34]: a – CTLs deliver GrB directly to the cytosol via plasma membrane pores formed by perforin; б – TCiGNPs have a GrB-TAT core and an HA/PMPC shell

клетки из-за экспрессии CD44 на опухолевых клетках. Однако из-за экранирующего эффекта ПМФХ частицы TCiGNP задерживаются на поверхности клетки до тех пор, пока оболочки ГК не разрушаются гиалуронидазой, сверхэкспрессируемой в микроокружении опухоли, вызывая высвобождение GrB-T. При попадании в цитозоль клеток-мишеней GrB-T стимулирует апоптоз клеток 2 основными путями: либо через BID-зависимую проницаемость митохондрий, либо посредством прямой обработки и активации каспазы, что приводит к значительному противоопухолевому эффекту, как изображено на рис. 2. Результаты исследований показали, что система доставки на основе наночастиц TCiGNP имитировала процесс распознавания иммунными клетками клеток-мишеней, а также продемонстрировала значи-

тельное подавление опухоли на модели животных *in vivo*. Таким образом, удалось разработать новую систему доставки GrB с ядром GrB-T и оболочкой ПМФХ/ГК, которая имитировала механизм иммунотерапии рака, опосредованной ЦТЛ и НК-клетками [34]. Эта система доставки решает проблему неспособности GrB самостоятельно проходить через клеточную мембрану [10, 35].

Не остались в стороне и российские исследователи, которые также разработали современную систему доставки GrB с функциональными суперпарамагнитными наночастицами оксида железа [36]. Суперпарамагнитные наночастицы оксида железа появились в качестве потенциальных клинических инструментов для тераностики рака. Связанный с мембраной белок теплового шока 70 кДа (Hsp70)

экспрессируется на клеточной мембране различных типов опухолей и представляет специфическую опухолевую мишень, так как на поверхности нормальных клеток не вырабатывается. Было показано, что ГрВ, который продуцируется в качестве эффекторной молекулы ЦТЛ и НК-клетками, специфически нацелен на Hsp70 на опухолевых клетках. После связывания с Hsp70 ГрВ быстро проникает в опухолевые клетки. В ходе исследования авторы выяснили, что комплексное соединение ГрВ с суперпарамагнитными наночастицами действует как агент, усиливающий контраст для магнитно-резонансной томографии и индуцирует специфический апоптоз опухолевых клеток. Кроме того, авторы определили, что комбинаторные схемы, использующие стереотаксическую лучевую терапию и/или магнитное нацеливание, дополнительно повышают терапевтическую эффективность комплексного исследуемого соединения в различных ксенографтных моделях с опухолями [36].

Подобные системы доставки ГрВ имеют большие перспективы для лечения рака, аналогично иммунотерапии, индуцированной ЦТЛ и НК-клетками.

Заключение

Проанализировав опыт применения систем доставки ГрВ в клетки солидных и гематологических опухолей, мы приходим к выводу, что ГрВ имеет перспективы в лечении рака, аналогично иммунотерапии, проводимой при помощи ЦТЛ или НК-клеток.

Для увеличения эффективности доставки ГрВ в клетку-мишень его можно модифицировать. Так, заменив несколько аминокислотных остатков, выступающих на поверхности белка, можно привести изоэлектрическую точку к нейтральному значению. Кроме того, можно создать химерные белки, состоящие из собственно ГрВ и фрагмента антитела, содержащего вариабельный участок, позволяющий связаться с поверхностью клетки-мишени. В то же время проблема ингибирования цитотоксической активности решается посредством синтеза белка с заменами аминокислот, делающих ГрВ нечувствительным для PI-9. Перспективы разработки противоопухолевого препарата на основе гранзима этим не исчерпываются. Таргетные системы доставки ГрВ привлекательны в качестве основы для создания лекарственных препаратов, применимых в клинической онкологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kataoka T., Nagai K. Molecular dissection of cytotoxic functions mediated by T cells. *ProGrBiotechnol* 2002;22:13–23. DOI: 10.1016/s0921-0423(02)80039-9.
- De Armas L.R., Podack E.R. Natural killer cytolytic activity. In: *Natural Killer Cells*. Ed. by M.T. Lotze, A.W. Thomson. Elsevier Ltd., 2010. Pp. 215–227. DOI: 10.1016/b978-0-12-370454-2.00016-8.
- Masson D., Tschopp J. A family of serine esterases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes. *Cell* 1987;49(5):679–85. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90544-7.
- Bladergroen B.A., Meijer C.J., ten Berge R.L. et al. Expression of the granzyme B inhibitor, protease inhibitor 9, by tumor cells in patients with non-Hodgkin and Hodgkin lymphoma: a novel protective mechanism for tumor cells to circumvent the immune system? *Blood* 2002;99(1):232–7. DOI: 10.1182/blood.v99.1.232.
- Boivin W.A., Cooper D.M., Hiebert P.R., Granville D.J. Intracellular *versus* extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma. *Lab Invest* 2009;89(11):1195–220. DOI: 10.1038/labinvest.2009.91.
- Granville D.J. Granzymes in disease: bench to bedside. *Cell Death Differ* 2010;17(4):565–6. DOI: 10.1038/cdd.2009.218.
- Pinkoski M.J., Hobman M., Heibein J.A. et al. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin mediated apoptosis. *Blood* 1998;92(3):1044–54. PMID: 9680374.
- Cremer C., Hehmann-Titt G., Schiffer S. et al. Engineered Versions of Granzyme B and Angiogenin Overcome Intrinsic Resistance to Apoptosis Mediated by Human Cytolytic Fusion Proteins. In: *Resistance to Immunotoxins in Cancer Therapy*. Ed. by R.S. Verma, B. Bonavida. Springer, 2015. Pp. 185–219. DOI: 10.1007/978-3-319-17275-0_8.
- Kurschus F.C., Fellows E., Stegmann E., Jenne D.I. Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(37):13799–804. DOI: 10.1073/pnas.0801724105.
- Besenčar M.P., Metkar S., Wang B. et al. Granzyme B translocates across the lipid membrane only in the presence of lytic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371(3):391–4. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.04.071.
- Bots M., Medema J.P. Granzymes at a glance. *J Cell Sci* 2006;119(24):5011–14. DOI:10.1242/jcs.03239.
- Киселевский Д.Б. Гранзимы и митохондрии. *Биохимия* 2020;85(2):155–64. [Kiselevskiy D.B. Granzymes and mitochondria. *Biokhimiya = Biochemistry* 2020;85(2):155–64. (In Russ.)]. DOI: 10.31857/S0320972520020013.
- Bird C.H., Christensen M.E., Mangan M.S.J. et al. The granzyme B-Serpinb9 axis controls the fate of lymphocytes after lysosomal stress. *Cell Death Differ* 2014;21(6):876–7. DOI: 10.1038/cdd.2014.7.
- Cullen S.P., Martin S.J. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 2008;15(2):251–62. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402244.
- Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3(5):361–70. DOI: 10.1038/nri1083.
- Voskoboinik I., Dunstone M.A., Baran K. et al. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev* 2010;235(1):35–54. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2010.00896.x.
- Bird C.H., Sun J., Ung K. et al. Cationic Sites on Granzyme B Contribute to Cytotoxicity by Promoting Its Uptake into Target Cells. *Mol Cell Biol* 2005;25(17):7854–67. DOI: 10.1128/mcb.25.17.7854-7867.2005.
- Azzi J., Ohori S., Ting C. et al. Serine protease inhibitor-6 differentially affects the survival of effector

- and memory alloreactive CD8-T cells. *Am J Transplant* 2015;15(1):234–41. DOI: 10.1111/ajt.13051.
19. Ashton-Rickardt P.G. An emerging role for Serine Protease Inhibitors in T lymphocyte immunity and beyond. *Immunol Lett* 2013;152(1):65–76. DOI: 10.1016/j.imlet.2013.04.004.
 20. Kaiserman D., Bird P.I. Control of granzymes by serpins. *Cell Death Differ* 2010;17(4):586–95. DOI: 10.1038/cdd.2009.169.
 21. Rosenblum M.G., Barth S. Development of novel, highly cytotoxic fusion constructs containing granzyme B: Unique mechanisms and functions. *Curr Pharm Des* 2009;15(23):2676–92. DOI: 10.2174/138161209788923958.
 22. Schiffer S., Rosinke R., Jost E. et al. Targeted *ex vivo* reduction of CD64-positive monocytes in chronic myelomonocytic leukemia and acute myelomonocytic leukemia using human granzyme B-based cytolytic fusion proteins. *Int J Cancer* 2014;135(6):1497–508. DOI: 10.1002/ijc.28786.
 23. Mathew M., Verma R.S. Humanized immunotoxins: a new generation of immunotoxins for targeted cancer therapy. *Cancer Sci* 2009;100(8):1359–65. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01192.x.
 24. Niesen J., Hehmann-Titt G., Woiatok M. et al. A novel fully-human cytolytic fusion protein based on granzyme B shows *in vitro* cytotoxicity and *ex vivo* binding to solid tumors overexpressing the epidermal growth factor receptor. *Cancer Lett* 2016;374(2):229–40. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.02.020.
 25. Amoury M., Kolberg K., Pham A.T. et al. Granzyme B-based cytolytic fusion protein targeting EpCAM specifically kills triple negative breast cancer cells *in vitro* and inhibits tumor growth in a subcutaneous mouse tumor model. *Cancer Lett* 2016;372(2):201–9. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.027.
 26. Kurschus F.C., Kleinschmidt M., Fellows E. et al. Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett* 2004;562(1–3):87–92. DOI: 10.1016/s0014-5793(04)00187-5.
 27. Losasso V., Schiffer S., Barth S., Carloni P. Design of human granzyme B variants resistant to serpin B9. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2012;80(11):2514–22. DOI: 10.1002/prot.24133.
 28. Mohamedali K.A., Cheung L.H., Rosenblum M.G. Tumor-targeted fusion constructs containing engineered granzyme B variants with optimized stability and potency. *Cancer Res* 2015;75(15 suppl):632. DOI: 10.1158/1538-7445.AM2015-632.
 29. Stahnke B., Thepen T., Stöcker M. et al. Granzyme B-H22(scFv), a human immunotoxin targeting CD64 in acute myeloid leukemia of monocytic subtypes. *Mol Cancer Ther* 2008;7(9):2924–32. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-08-0554.
 30. Alimonti J.B., Shi L., Bajjal P.K., Greenberg A.H. Granzyme B Induces BID-mediated Cytochrome c Release and Mitochondrial Permeability Transition. *J Biol Chem* 2001;276(10):6974–82. DOI: 10.1074/jbc.m008444200.
 31. D’Eliseo D., Pisu P., Romano C. et al. Granzyme B is expressed in urothelial carcinoma and promotes cancer cell invasion. *Int J Cancer* 2009;127(6):1283–94. DOI: 10.1002/ijc.25135.
 32. Yang J., Pemberton A., Morrison W.I., Connelley T. Granzyme B Is an Essential Mediator in CD8⁺ T Cell Killing of *Theileria parva*-infected cells. *Infect Immun* 2018;87(1):e00386–18. DOI: 10.1128/iai.00386-18.
 33. Uranga S., Marinova D., Martin C. et al. Granzyme A is expressed in mouse lungs during *Mycobacterium tuberculosis* infection but does not contribute to protection *in vivo*. *PLoS One* 2016;11(4):e0153028. DOI: 10.1371/journal.pone.0153028.
 34. Qian X., Shi Z., Qi H. et al. A novel Granzyme B nanoparticle delivery system simulates immune cell functions for suppression of solid tumors. *Theranostics* 2019;9(25):7616–27. DOI: 10.7150/thno.35900.
 35. Schanoski A.S., Le T.T., Kaiserman D. et al. Granzyme A in Chikungunya and Other Arboviral Infections. *Front Immunol* 2020;10:3083. DOI: 10.3389/fimmu.2019.03083.
 36. Shevtsov M., Stangl S., Nikolaev B. et al. Granzyme B Functionalized Nanoparticles Targeting Membrane Hsp70-Positive Tumors for Multimodal Cancer Theranostics. *Small* 2019;15(13):e1900205. DOI: 10.1002/smll.201900205.

Вклад авторов

И.В. Ярош: обзор публикаций по теме статьи и написание текста рукописи;
 В.А. Мисюрин: разработка дизайна исследования и редактирование рукописи;
 И.И. Краснюк: анализ данных, оформление рукописи.

Authors contribution

I.V. Yarosh: reviewing of publications of the article’s theme, article writing;
 V.A. Misyurin: developing the research design and article editing;
 I.I. Krasnyuk: data analysis, manuscript formatting.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.В. Ярош / I.V. Yarosh: <https://orcid.org/0000-0002-3347-9674>
 В.А. Мисюрин / V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
 И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0003-4382-7377>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declares 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: 16.04.2021.

Article submitter: 13.01.2021. Accepted for publication: 16.04.2021.

Диагностика и лечение анемического синдрома у больных раком молочной железы на фоне неoadъювантной химиотерапии

В. Н. Блиндарь¹, М. Н. Хагажеева¹, Т. В. Давыдова¹, А. В. Снеговой¹, М. М. Добровольская¹,
Н. В. Любимова¹, Н. Е. Кушлинский¹, И. Б. Кононенко¹, З. З. Тоашева¹, А. М. Келеметов², Д. А. Рябчиков¹

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

²АО «Медицина»; Россия, 125047 Москва, 2-й Тверской-Ямской пер., 10

Контакты: Валентина Николаевна Блиндарь bld51@list.ru

Введение. За последние годы появились отдельные публикации, свидетельствующие о том, что интерлейкин 6 (ИЛ-6) и белок гепсидин 25 (ГП25) играют значительную роль в развитии функционального дефицита железа (ФДЖ) у онкологических больных с распространенным опухолевым процессом. Важно дифференцировать ФДЖ и железодефицитную анемию (ЖДА), так как они имеют одинаковые морфологические характеристики, но их лечение принципиально различается.

Цель исследования – изучение основных метаболитов феррокинетики, показателей экспрессии ИЛ-6 и С-реактивного белка (СРБ) у пациенток с раком молочной железы (РМЖ) на фоне неoadъювантной химиотерапии для разработки индивидуальных подходов к диагностике и лечению анемического синдрома (АС), прогнозирования, раннего выявления анемии и адекватной ее коррекции.

Материалы и методы. Исследование проведено среди 31 пациентки с РМЖ в течение 6 циклов химиотерапии. Изучали основные метаболиты феррокинетики: ГП25, ферритин, растворимые рецепторы трансферрина, трансферрин, железо, эритропоэтин, показатели ИЛ-6 и СРБ. Контрольную группу составили 29 практически здоровых женщин.

Результаты. У 14 (45,1 %) пациенток с РМЖ выявлен АС. Преобладала ЖДА с микроцитарными, гипохромными характеристиками эритроцитов, низкой концентрацией ферритина, железа, ГП25, ИЛ-6, СРБ и высоким уровнем трансферрина и растворимых рецепторов трансферрина. У отдельных пациенток, преимущественно с III и IV стадиями РМЖ, диагностирован ФДЖ. В отличие от пациенток с ЖДА, у них отмечались высокая концентрация ферритина, СРБ и значительная продукция ГП25, ИЛ-6. Уровень эритропоэтина не был оптимальным для большинства пациенток с АС. В единичных случаях на фоне лечения рекомбинантными эритропоэтинами выявили дефицит витаминов В₁₂ (цианокобаламина) и фолиевой кислоты.

Заключение. Ранняя диагностика, персонализированный подход к назначению препаратов железа, рекомбинантных эритропоэтинов, витаминов В₁₂ и фолиевой кислоты пациенткам с АС позволили провести 6 циклов неoadъювантной химиотерапии без значительного снижения показателей эритроцитов, гемоглобина и гематокрита у большинства из них. Полученные данные по ИЛ-6, ГП25 и СРБ свидетельствуют об их взаимосвязи в развитии ФДЖ у пациенток с РМЖ с распространенным опухолевым процессом и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: анемический синдром, гепсидин 25, интерлейкин 6, С-реактивный белок, ферритин

Для цитирования: Блиндарь В. Н., Хагажеева М. Н., Давыдова Т. В. и др. Диагностика и лечение анемического синдрома у больных раком молочной железы на фоне неoadъювантной химиотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):42–52. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-42-52.

Diagnostics and treatment of anemic syndrome in patients with breast cancer on the background of neoadjuvant chemotherapy

Valentina N. Blindar¹, Madina N. Khagazheeva¹, Tatiana V. Davydova¹, Anton V. Snegovoy¹, Marina M. Dobrovolskaya¹,
Nina V. Lyubimova¹, Nikolay E. Kushlinsky¹, Inessa B. Kononenko¹, Zarina Z. Toasheva¹, Aslan M. Kelemetov²,
Denis A. Ryabchikov¹

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

²JSC "Medicine"; 10 2nd Tverskoy-Yamskoy lane, Moscow 125047, Russia

Contacts: Valentina Nikolaevna Blindar bld51@list.ru

Introduction. In recent years, a separate publications have appeared indicating that interleukin 6 (IL-6) and the protein hepcidin 25 (GP25) play a significant role for the development of functional iron deficiency (FID) in oncological patients with a widespread tumor process. It is important to differentiate between FID and iron deficiency anemia (IDA), since they have the same morphological characteristics, but their treatment is fundamentally different.

The aim of this study was to study the main metabolites of ferrokinetics, IL-6 and C-reactive protein (CRP) expression parameters in patients with breast cancer on the background of neoadjuvant chemotherapy to develop individual approaches to the diagnosis and treatment of anemic syndrome (AS), prediction, early detection of anemia and its adequate correction.

Materials and methods. The study was conducted in 31 breast cancer patients, during of 6 cycles of chemotherapy. The main metabolites of ferrokinetics were studied: GP25, ferritin, soluble transferrin receptors, transferrin, iron, erythropoietin, IL-6 and CRP indices. The control group consisted of 29 apparently healthy women.

Results. AS was detected in 14 (45.1 %) of breast cancer patients. IDA prevailed with microcytic, hypochromic characteristics of erythrocytes, a low concentration of ferritin, iron, GP25, IL-6, CRP, and a high level of transferrin and soluble transferrin receptors. A some patients were diagnosed with FID, mainly with the III and IV stages of the disease. Unlike IDA, they had a high concentration of ferritin, CRP and significant production of GP25, IL-6. Erythropoietin level was not optimal for the majority of patients with AS. A few patients on the background of treatment with recombinant erythropoietins revealed a deficiency of vitamins B₁₂ (cyanocobalamin) and folic acid.

Conclusion. Early diagnosis, a personalized approach to the prescription of iron preparations, recombinant erythropoietins, vitamins B₁₂ and folic acid in patients with AS allowed for 6 cycles neoadjuvant chemotherapy without a significant decrease in erythrocytes, hemoglobin and hematocrit in most of them. The data obtained on IL-6, GP25, and CRP indicate relationship between them in the development of FID in breast cancer patients with a widespread tumor process and require further study.

Key words: anemic syndrome, hepcidin 25, interleukin 6, C-reactive protein, ferritin

For citation: Blindar V.N., Khagazheeva M.N., Davydova T.V. et al. Diagnostics and treatment of anemic syndrome in breast cancer patients on the background of neoadjuvant chemotherapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):42–52. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-42-52.

Введение

Известно, что у онкологических больных при диагностике заболевания или в процессе лечения часто выявляется анемический синдром (АС), который существенно ухудшает качество жизни и является самостоятельным негативным фактором, снижающим продолжительность жизни [1].

Патогенез АС онкологических больных чрезвычайно сложен. Он представлен большим разнообразием факторов, лежащих в основе его развития, и недостаточно изучен. При развитии опухолевого процесса АС претерпевает различные модификации, связанные с дисбалансом провоспалительных цитокинов [2]. Считают, что в результате гиперэкспрессии гепсидина 25 (ГП25), под воздействием интерлейкина 6 (ИЛ-6) блокируется основной клеточный транспортер железа ферропортин. Железо не поступает к эритроцитам (RBC) костного мозга, развивается функциональный дефицит железа (ФДЖ). Важно дифференцировать ФДЖ и железodefицитную анемию (ЖДА), так как они имеют одинаковые морфологические характеристики, но их лечение принципиально различается. Терапевтическое воздействие на ГП25 и ИЛ-6 — многообещающая перспектива для

коррекции анемии онкологических больных [3, 4]. Необходимость идентификации вариантов АС для выбора адекватных методов терапии делает актуальной проблему дифференциальной диагностики анемии.

Целью исследования являлось изучение основных метаболитов феррокинетики (ГП25, ферритин (ФР), растворимые рецепторы трансферрина (рРТФ), трансферрин (ТРФ), железо, эритропоэтин (ЭПО)), показателей экспрессии ИЛ-6 и С-реактивного белка (СРБ) у пациенток с раком молочной железы (РМЖ) на фоне неoadъювантной химиотерапии (ХТ). Это необходимо для разработки индивидуальных подходов к диагностике и лечению АС, прогнозирования, раннего выявления анемии и адекватной ее коррекции.

Материалы и методы

В исследование была включена 31 пациентка с РМЖ, поступившая на лечение в клинику ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» в 2019–2020 гг. Возраст пациенток — от 30 до 70 лет (средний возраст 46,7 ± 1,9 года). РМЖ с неблагоприятным прогнозом, люминальным типом В (Her2/neu положительный

или отрицательный) и трижды негативным типом. II стадия заболевания РМЖ выявлена у 10 пациенток; III стадия – у 20; IV стадия – у 1 пациентки. Исследование периферической крови проведено в динамике в процессе 6 циклов химиотерапии (ЦХТ).

Пациентки получали неоадьювантную ХТ по программе: 4 курса доксорубина 60 мг/м^2 и циклофосфана $600 \text{ мг/м}^2 + 12$ еженедельных введений паклитаксела $80 \text{ мг/м}^2 \pm$ карбоплатин AUC 1,5 либо 4 курса доцетаксела 75 мг/м^2 . После окончания ХТ требовалось хирургическое лечение в объеме радикальной мастэктомии либо радикальной резекции молочной железы с последующей лучевой терапией. Периферическую кровь исследовали перед каждым курсом ХТ.

Проводилась коррекция АС в зависимости от этиологии возникновения анемии, лабораторных показателей метаболизма железа и продукции ЭПО: железа (III) гидроксид сахарозный комплекс – внутривенно струйно 200 мг 3 раза в нед либо внутривенно капельно 7 мг/кг , однократная доза – не более 500 мг железа, минимальное время введения – $3,5 \text{ ч}$; эритропоэтинстимулирующие препараты – эпоэтин альфа 150 МЕ/кг 3 раза в нед подкожно 12000 МЕ ; витамин B_{12} (цианокобаламин) $0,5 \text{ мг/мл}$ – $1,0 \text{ мл}$ подкожно через день; фолиевая кислота – 2 мг/сут .

Контрольную группу составили 29 практически здоровых женщин соответствующего возраста.

Расширенный клинический анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе фирмы Sysmex (Япония), в том числе исследовали среднее содержание гемоглобина (HGB) в ретикулоците (RET-HE), индекс продукции ретикулоцитов (reticulocyte production index, RPI), отражающий активность эритропоэза в процессе ХТ, и количество фрагментоцитов эритроцитов (FRG). В плазме крови методом иммуноферментного анализа определяли содержание эндогенного ЭПО с использованием наборов фирмы Biomerica (США), ГП25 – с использованием наборов Peninsula Laboratories International, Inc. (США). Для исключения аутоиммунной гемолитической анемии выполняли прямую пробу Кумбса на основе гелевых технологий (прямой антиглобулиновый тест). Определение свободного HGB в плазме крови проводили гемиглобинцианидным методом. Результаты оценивали на аппарате Multiskan Spectrum Microplate Spectrophotometer. Подсчитывали лейкоцитарную формулу и проводили детальный анализ морфологии RBC с помощью микроскопа фирмы Leica (США). Исследование биохимических показателей обмена железа проводили в сыворотке крови больных на автоматическом анализаторе Cobas c501 (Roche, Швейцария). Определение железа проводили колориметрическим методом при помощи набора реактивов Iron Gen.2. Уровни ФР, ТРФ и рРТФ определяли иммунотурбидиметрическими методами с латексным усилением

на основе специфических антисывороток с использованием тест-систем Tina-quant Ferritin Gen 4, Tina-quant Transferrin ver. 2 и Tina-quant Soluble Transferrin Receptor соответственно. ИЛ-6 определяли в сыворотке крови с использованием тест-системы Elecsys IL-6 на автоматическом электрохемилюминесцентном анализаторе Cobas e601 (Roche, Швейцария). СРБ исследовали иммунотурбидиметрическим методом с латексным усилением на основе специфических антисывороток с использованием тест-системы C-Reactive Protein Gen.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с помощью программных пакетов MS Excel Biostat, 2016. Для оценки достоверности результатов использовали *t*-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05.

Исследования выполняли в соответствии с принципами Хельсинкской декларации, разработанной Всемирной медицинской ассоциацией [5].

Результаты и обсуждение

Исследование показало, что при проведении ХТ отмечалась значительная вариабельность показателей периферической крови. Значения варьировали в широком диапазоне – от очень низких до высоких, превышающих верхнюю границу нормы. Средние значения показателей RBC и, соответственно, гематокрита имели тенденцию к снижению с каждым последующим ЦХТ и достигали статистически значимого снижения к 5–6-му ЦХТ, как по сравнению с контрольными показателями, так и с 1-м ЦХТ. Такую же особенность прослеживали и при анализе показателей HGB (рис. 1).

Напротив, разброс показателей среднего объема RBC (MCV) и среднего содержания HGB в RBC (MCH) сужался с каждым последующим ЦХТ; объем RBC, среднее содержание HGB в RBC нарастали и к 6-му ЦХТ нижний диапазон значений приближался к норме. Другая закономерность прослеживалась при анализе показателей, отражающих качественные характеристики RBC. Так, на всех ЦХТ выявляли разные популяции RBC – как со сниженным объемом и средним содержанием HGB, так и с большим объемом и гиперхромией. При морфологическом исследовании в мазках крови встречались единичные нормобласты начиная со 2-го ЦХТ и на последующих этапах лечения. Отмечали пойкилоцитоз RBC (каплевидные и мишеневидные формы, стоматоциты и шизоциты), более выраженный перед 5-м и 6-м ЦХТ, что свидетельствовало о неэффективном эритропоэзе. Значительное повышение показателя FRG (числа разрушенных RBC) также может отражать неэффективный эритропоэз (табл. 1).

Общее число ретикулоцитов варьировало от очень низких ($0,4\text{--}0,7\%$) до высоких ($2,9\text{--}4,9\%$) значений

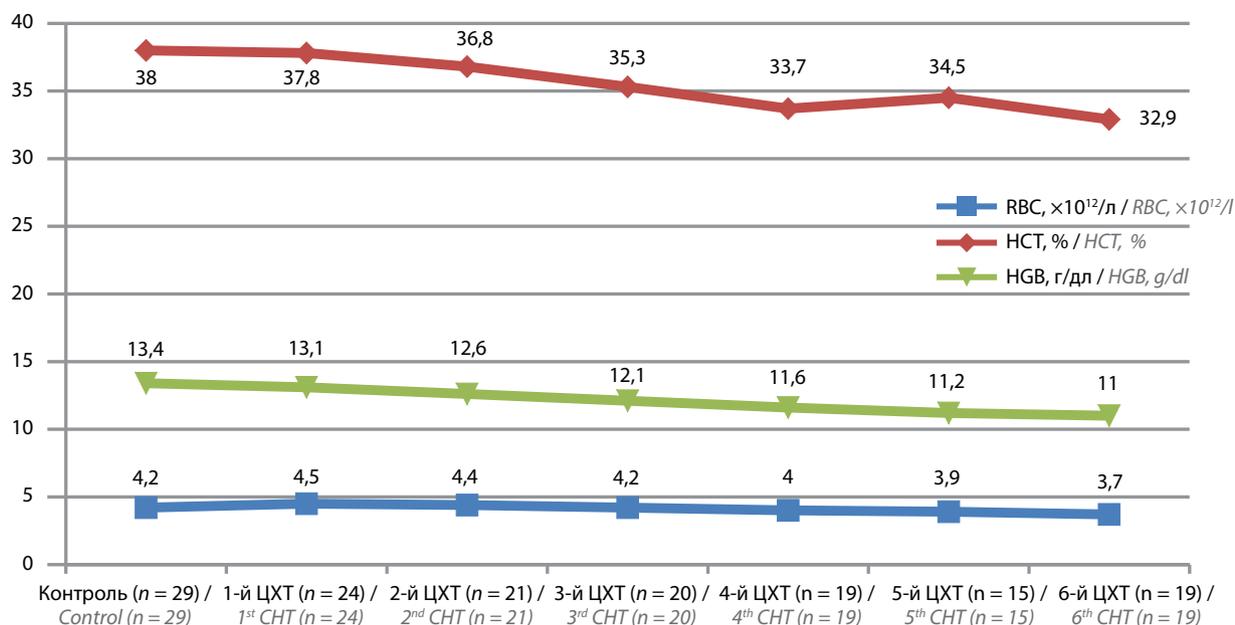


Рис. 1. Динамика показателей эритроцитов (RBC), гематокрита (HCT) и гемоглобина (HGB) в процессе 6 циклов химиотерапии (ЦХТ) у пациенток с раком молочной железы

Fig. 1. Dynamics of erythrocyte (RBC), hematocrit (HCT) and hemoglobin (HGB) indices during 6 cycles of chemotherapy (CHT) in breast cancer patients

Таблица 1. Продукция острофазных белков, интерлейкина 6 и количество фрагментоцитов у пациенток с раком молочной железы в зависимости от стадии заболевания ($X \pm m$)

Table 1. Production of acute phase proteins, interleukin 6 and the number of fragmentocytes in breast cancer patients, depending on the stage of the disease ($X \pm m$)

Группа больных Patient group	ФР, нг/мл FR, ng/ml	ГП25, нг/мл GP25, ng/ml	ИЛ-6, пг/мл IL-6, pg/ml	СРБ, мг/л CRP, mg/l	FRG, %
II стадия (n = 10) Stage II (n = 10)	58,6 ± 15,9	9,3 ± 4,5	1,5 ± 0,3	2,9 ± 1,2	0,06 ± 0,01
III–IV стадия (n = 21) Stage III–IV (n = 21)	79 ± 31,3	17,8 ± 2,4*	3,9 ± 0,6*	3,9 ± 1,3	0,69 ± 0,2*

*Различия показателей по сравнению с 1-й группой (II стадия) статистически значимы.

*Differences in indicators compared with 1st group (stage II) are statistically significant.

Примечание. ФР – ферритин; ГП25 – гепсидин 25; ИЛ-6 – интерлейкин 6; СРБ – С-реактивный белок; FRG – фрагменты разрушенных эритроцитов.

Note. FR – ferritin; GP25 – hepcidin 25; IL-6 – interleukin 6; CRP – C-reactive protein; FRG – fragments of destroyed erythrocytes.

на разных ЦХТ. Анализ показателей ретикулоцитарных индексов, параметров, отражающих степень зрелости ретикулоцитов, выявил увеличение популяции более молодых ретикулоцитов (IRF). Эта закономерность прослеживалась на всех ЦХТ. Среднее содержание HGB в ретикулоците (индекс RET-HE) в среднем по всем группам было в пределах нормы, однако отмечался значительный разброс показателей, встречались как очень низкие, так и высокие значения. Индекс продукции ретикулоцитов, RPI, отражающий активность эритропоэза, был значительно снижен на всех этапах исследования, что свидетельствовало

о низкой эритропоэтической активности костного мозга на фоне ХТ. Диапазон значений RPI был широким – кроме пациентов с низкими показателями RPI (0,4 ед) выявлены отдельные пациенты с высокой активностью эритропоэза, с показателями, превышающими норму более чем в 2 раза (3,2 ед).

Отмечали значительную вариабельность показателей концентрации ФР. Наряду с высокими показателями уровня ФР (676–1077 нг/мл) выявлены отдельные случаи очень низкой его концентрации (3,7–16,2 нг/мл); также встречались показатели, которые не превышали верхней границы нормы (до 150 нг/мл).

Такую же закономерность прослеживали по уровню железа, ТРФ в сыворотке крови. Значительную концентрацию ФР у больных на фоне ХТ можно объяснить поступлением избытка так называемого цитозольного ФР в результате распада клеток опухоли и снижением скорости эритропоэза в костном мозге в процессе ХТ, а также поступлением железа в результате лечения АС.

Показатели ФР не всегда объективно отражают состояние метаболизма железа, так как ФР является белком острой фазы воспаления и его уровень значительно увеличивается при нарушении функции печени и у онкологических больных, особенно на фоне ХТ. Более информативным тестом является измерение рРТФ. В отличие от ФР, концентрация рРТФ повышается при недостатке железа и существенно не изменяется при хронических заболеваниях. Концентрация рРТФ в обследуемых группах, в отличие от ФР, была в пределах нормы, однако со значительными колебаниями показателей — от очень низких (1,7 мкг/мл) до более умеренных, приближающихся к верхней границе нормы (3,7 мкг/мл), и отдельных высоких (17,2 мкг/мл) значений. Такая же закономерность прослеживалась по ГП25, ИЛ-6, СРБ и ЭПО, для которых, наряду с низкими показателями, встречались высокие концентрации.

Анализ данных гемограмм позволил выделить среди 31 пациентки с РМЖ на первых 3 ЦХТ 2 подгруппы: 1-я — с нормальными показателями эритропоэза ($n = 21$; 67,7 %), 2-я — с АС ($n = 10$; 32,3 %). Несмотря на отсутствие АС, на фоне нормальных показателей гемограммы у небольшой части пациенток ($n = 6$; 19,3 %) выявили относительно низкое содержание ФР (менее 20 нг/мл), что не исключало начальной или латентной стадии ЖДА (латентного дефицита железа (ЛДЖ)). Начиная с 4-го ЦХТ число пациенток с АС увеличилось до 14 (45,1 %), 3 пациентки перешли из статуса ЛДЖ и 1 пациентка на первых 3 ЦХТ была без АС. Среди пациенток с АС у 10 диагностирована ЖДА, а у 4 — ФДЖ. По основным морфологическим характеристикам (рис. 2) и ряду показателей, отражающих метаболизм железа (рРТФ, ТРФ, железо), они существенно не отличались друг от друга.

Однако, наряду с высокой концентрацией ФР, по всем острофазным белкам и ИЛ-6 выявлено отличие. Так, ИЛ-6, ГП25, СРБ были статистически значимо ($p < 0,05$) выше у пациенток с ФДЖ по сравнению с пациентками с ЖДА (рис. 2–4). Как можно видеть на представленных рисунках и как показал корреляционный анализ, между показателями концентрации ИЛ-6 и ГП25, между показателями ИЛ-6 и СРБ у пациенток с АС выявляется тесная корреляционная связь — коэффициенты корреляции (r) составили 0,60 и 0,96 соответственно. При этом показатели ИЛ-6

у пациенток без АС слабо коррелировали с другими маркерами воспаления (ГП25, СРБ), особенно с ГП25 ($r < 0,19$). Это может означать, что причиной гиперэкспрессии ГП25 кроме ИЛ-6 могут быть другие источники. Как видно на рис. 3, экспрессия ГП25 была высокой не только у пациенток с ФДЖ, но и без АС, а также при ЛДЖ.

Большое значение для дифференциальной диагностики АС имеет определение ЭПО в плазме крови. Среди больных с АС повышение уровня ЭПО более 100 мЕ/мл отмечено только у 2 пациенток с ЖДА. У остальных 8 пациенток уровень ЭПО находился в пределах от 2,4 до 65,3 мЕ/мл ($29,3 \pm 12,3$ мЕ/мл), медиана — 6,7 мЕ/мл, т.е. был неадекватным степени тяжести АС на всех ЦХТ. Более низкую продукцию ЭПО отмечали у пациенток с ФДЖ.

Прямая проба Кумбса была отрицательной у всех пациенток, как с АС, так и без него. Анализ показателей свободного HGB не выявил значительных отклонений от нормальных значений контрольной группы (0,09–0,4 г/л).

Был проведен анализ частоты встречаемости различных типов АС в зависимости от стадии заболевания. АС, ЛДЖ и ЖДА чаще выявлялись у пациенток с III–IV стадиями РМЖ (см. табл. 1, табл. 2). Отмечено значительное различие по параметрам ГП25, ИЛ-6, FRG: показатели были выше у пациенток с III–IV стадиями заболевания ($p < 0,01$) и ФДЖ встречался чаще.

Традиционным методом коррекции сниженного HGB и жизнеугрожающих ситуаций, связанных с острой кровопотерей (обширные операции), являются заместительные трансфузии эритроцитной массы [1, 6]. После операции и лучевой терапии исследовали периферическую кровь, при выявлении АС проводили

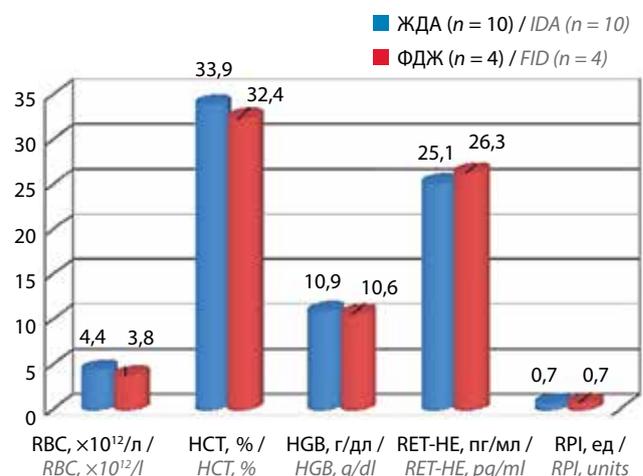


Рис. 2. Основные показатели красной крови пациенток с раком молочной железы с разными вариантами анемического синдрома: железодефицитная анемия (ЖДА) и функциональный дефицит железа (ФДЖ)

Fig. 2. The main indicators of red blood in breast cancer patients with different types of anemic syndrome: iron deficiency anemia (IDA) and functional iron deficiency (FID)

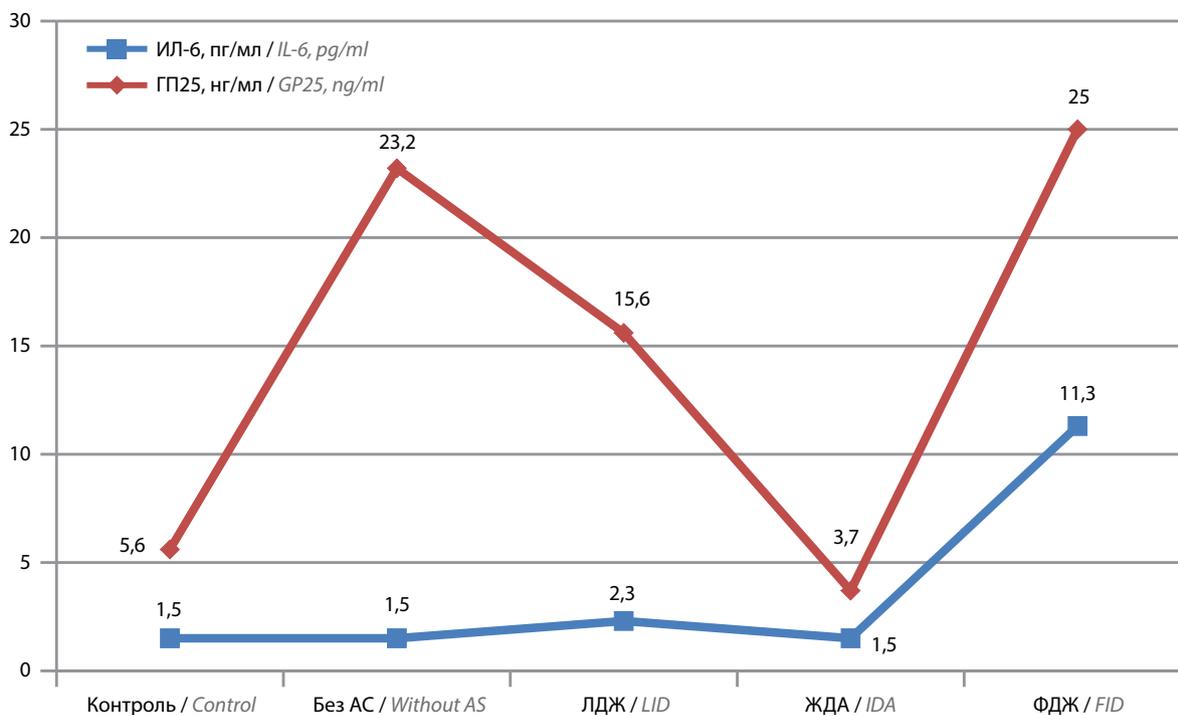


Рис. 3. Концентрация интерлейкина 6 (ИЛ-6) и гепсидина 25 (ГП25) у пациенток с раком молочной железы с разными вариантами анемического синдрома (АС). ЛДЖ – латентный дефицит железа; ЖДА – железodefицитная анемия; ФДЖ – функциональный дефицит железа

Fig. 3. Concentration of interleukin 6 (IL-6) and hepcidin 25 (GP25) in breast cancer patients with different types of anemic syndrome (AS). LID – latent iron deficiency; IDA – iron deficiency anemia; FID – functional iron deficiency

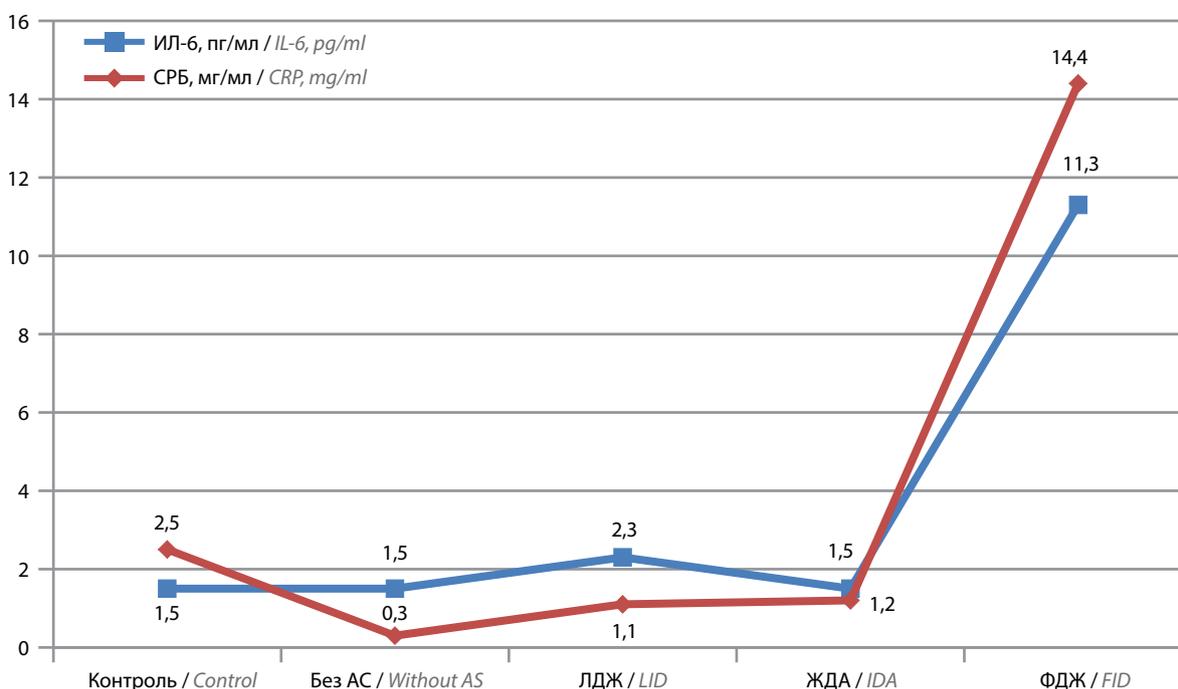


Рис. 4. Концентрация интерлейкина 6 (ИЛ-6) и С-реактивного белка (СРБ) у пациенток с раком молочной железы с разными типами анемического синдрома (АС). ЛДЖ – латентный дефицит железа; ЖДА – железodefицитная анемия; ФДЖ – функциональный дефицит железа

Fig. 4. Concentration of interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in breast cancer patients with different types of anemic syndrome (AS). LID – latent iron deficiency; IDA – iron deficiency anemia; FID – functional iron deficiency

Таблица 2. Частота встречаемости различных типов анемического синдрома у пациенток с раком молочной железы на фоне неoadъювантной химиотерапии в зависимости от стадии заболевания

Table 2. Frequency of occurrence of various types of anemic syndrome in breast cancer patients on the background of neoadjuvant chemotherapy, depending on the stage of the disease

Группа больных Patient group	Без АС, n (%) Without AS, n (%)	ЛДЖ, n (%) LID, n (%)	АС, n (%) AS, n (%)	ЖДА, n (%) IDA, n (%)	ФДЖ, n (%) FID, n (%)
II стадия (n = 10) Stage II (n = 10)	6 (60,0)	1 (10,0)	3 (30,0)	2 (20,0)	1 (10,0)
III–IV стадия (n = 21) Stage III–IV (n = 21)	11 (52,3)	5 (23,8)	11 (52,4)	8 (38,0)	3 (14,3)

Примечание. АС – анемический синдром; ЛДЖ – латентный дефицит железа у пациенток без АС; ЖДА – железодефицитная анемия; ФДЖ – функциональный дефицит железа.

Note. AS – anemic syndrome; LID – latent iron deficiency in patients without AS; IDA – iron deficiency anemia; FID – functional iron deficiency.

Таблица 3. Динамика показателей концентрации ферритина, растворимых рецепторов трансферрина, трансферрина и гемоглобина у пациенток с раком молочной железы (n = 10) в процессе лечения железодефицитной анемии на фоне химиотерапии (X ± m)

Table 3. Dynamics of indicators of the concentration of ferritin, soluble receptors of transferrin, transferrin and hemoglobin in breast cancer patients (n = 10) during iron deficiency anemia treatment against the background of chemotherapy (X ± m)

Группа больных и этап лечения Patient group and stage of treatment	ФР, нг/мл FR, ng/ml	pРТФ, мкг/мл sTfR, mcg/ml	ТРФ, мг/дл TRF, mg/dl	HGB, г/дл HGB, g/dl
Контроль Control	57,7 ± 3,1	3,2 ± 0,06	246,3 ± 9,4	13,4 ± 0,4
1-й ЦХТ 1 st СХТ	10,1 ± 0,7*	8,1 ± 1,2*	321,3 ± 10,4*	10,9 ± 0,5*
2-й ЦХТ 2 nd СХТ	36,8 ± 2,3**	9,9 ± 1,7*	305,5 ± 8,1*	10,7 ± 0,2*
3-й ЦХТ 3 rd СХТ	68,1 ± 3,5**	3,8 ± 0,05**	286,7 ± 11,2	11,4 ± 0,1*
4-й ЦХТ 4 th СХТ	118,8 ± 7,4**	3,9 ± 0,07**	280,9 ± 5,3	11,2 ± 0,2*
5-й ЦХТ 5 th СХТ	114,2 ± 6,9**	3,4 ± 0,0,12**	273,9 ± 4,9	11,3 ± 0,2*
6-й ЦХТ 6 th СХТ	229 ± 9,2**	3,1 ± 0,9**	250,3 ± 8,7	11,6 ± 0,1

*Различия в показателях по сравнению с контрольной группой статистически значимы; **различия в показателях по сравнению с показателями перед 1-м или 2-м ЦХТ статистически значимы.

*Differences in indicators compared to the control group are statistically significant; **differences in indicators compared with indicators before 1st or 2nd СХТ are statistically significant.

Примечание. ЦХТ – цикл химиотерапии; ФР – ферритин; pРТФ – растворимые рецепторы трансферрина; ТРФ – трансферрин; HGB – гемоглобин.

Note. СХТ – cycle of chemotherapy; FR – ferritin; sTfR – soluble transferrin receptors; TRF – transferrin; HGB – hemoglobin.

коррекцию анемии. Однако для лечения АС, связанного с опухолевым процессом (распад опухоли, интоксикация) и противоопухолевым лечением, гемотрансфузии не являются безопасным и эффективным методом. Переливание эритроцитарной массы может сопровождаться гемолитическими реакциями, в том числе фатальными (частота 1:1000), трансфузионными поражениями легких (частота 1:5000), бактериальной контаминацией, в том числе фатальным сепсисом (частота 1:10000), передачей вирусов гепатита В (частота 1:30000), гепатита С и вируса иммунодефицита

человека (частота 1:1000000). Наряду с вышесказанным иммунодепрессия, вызванная переливанием RBC, приводит к повышению риска тромбозов, инфекционных осложнений, снижению безрецидивной и общей выживаемости при ряде опухолевых заболеваний. Повышение концентрации HGB после гемотрансфузий является кратковременным и для поддержания ее нормального значения их необходимо повторять. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения рекомендует максимально регламентировать заместительные гемотрансфузии у онкологических

больных и использовать альтернативные методики коррекции HGB. Согласно Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации № 348Н от 03.06.2013, гемотрансфузии при снижении концентрации HGB менее 80–70 г/л показаны только в случае острых постгеморрагических анемий при одномоментном снижении гематокрита до уровня менее 25 % [7]. При хронических анемиях главной задачей является устранение причины, вызвавшей это состояние, и гемотрансфузии назначаются только для коррекции клинически значимых симптомов, обусловленных гипоксией вследствие снижения HGB и не поддающихся патогенетической терапии [1, 7].

Альтернативным методом коррекции АС, ассоциированного со злокачественными заболеваниями, является назначение рекомбинантных ЭПО (гЕРО) в режиме монотерапии или в комбинации с препаратами железа. Их применение показано при снижении HGB менее 100 г/л. Использование гЕРО позволяет повысить продукцию RBC костным мозгом и увеличить содержание HGB без переливания донорских RBC. У пациентов с солидными опухолями и больных, получающих платиносодержащую ХТ, применение гЕРО более эффективно, чем при других типах опухолей и других программах ХТ [1, 7].

Содержание сывороточного ФР менее 100 нг/мл у онкологического больного свидетельствует об абсолютном дефиците железа и необходимости терапии препаратами железа. При этом предпочтительны лекарственные формы для внутривенного введения, так как при приеме внутрь железо плохо всасывается. Более высокое содержание сывороточного ФР (100–800 нг/мл), снижение средней концентрации HGB в ретикулоците и появление в периферической крови гипохромных RBC более 5 % свидетельствуют о ФДЖ [4, 7].

Динамическое исследование основных метаболических феррокинетических у пациенток с ЖДА в процессе 6 ЦХТ выявило восстановление метаболизма железа на фоне лечения АС (табл. 3). Отмечено постепенное повышение концентрации ФР (от очень низкой перед 1-м ЦХТ до нормы или несколько выше начиная с 3-го ЦХТ), которая достигала максимума к 6-му ЦХТ. Напротив, уровень рРТФ на 3-м и последующих ЦХТ снизился до нормальных величин. Такая же закономерность прослеживалась при анализе показателя ТРФ – белка, который осуществляет транспорт ионов железа. Он был высоким перед 1-м ЦХТ и восстанавливался до референсных значений к 6-му ЦХТ. Детальный анализ лабораторных данных показал, что анемия у пациенток перед 1-м ЦХТ была I и II степени тяжести. Среднее значение концентрации HGB перед 1-м ЦХТ составило $10,9 \pm 0,5$ г/дл с разбросом показателей от 9,2 до 11,8 г/дл. Отмечена стабилизация концентрации HGB на последующих ЦХТ, сред-

нее значение к 6-му ЦХТ составило $11,6 \pm 0,1$ г/дл. Кроме того, качество жизни пациенток значительно улучшилось в процессе лечения АС. Восстановился аппетит, исчезли боли в икроножных мышцах из-за нормализации миоглобина, уменьшилась слабость, нормализовался сон.

Следует отметить, что анализ результатов лечения АС некоторых пациенток с ФДЖ (единичные случаи) не выявил положительной динамики показателей красной крови на фоне лечения АС в процессе ХТ. Концентрация белка ГП25 у пациенток с ФДЖ оставалась высокой на всех ЦХТ. Можно предположить, что причиной развития ФДЖ может быть гиперпродукция ГП25. Однако небольшое число наблюдений не позволяет сделать однозначные выводы.

Известно, что самыми информативными показателями эффективности проводимой терапии АС являются среднее содержание HGB в ретикулоците (RET-HE) и индекс продукции ретикулоцитов (RPI), отражающие активность эритропоэза. Значительное увеличение числа ретикулоцитов и содержания в них HGB служит достоверным показателем хорошей ответной реакции на лечение препаратами железа, гЕРО, витамином В₁₂ и фолиевой кислотой.

Так, при динамическом наблюдении ряда пациенток с ЖДА, которые получали для коррекции АС ферринжент (рис. 5), мы отметили постепенное повышение RET-HE, которое достигло нормальных величин к 5-му ЦХТ, что свидетельствовало об адекватной терапии ЖДА. Что касается RPI, то этот показатель восстанавливался медленнее, к 5-му ЦХТ скорость восстановления ретикулоцитов достигла только нижней границы нормы.

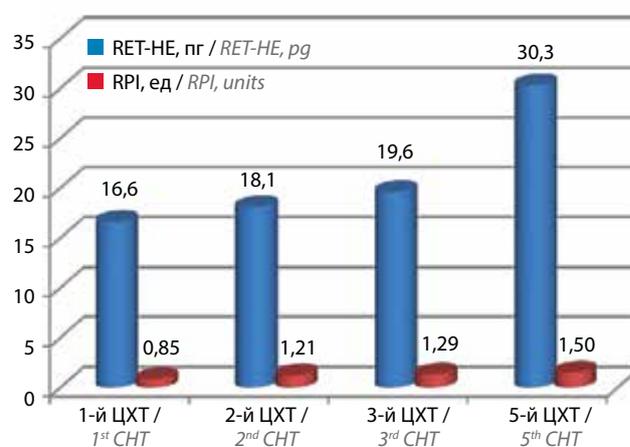


Рис. 5. Показатели среднего содержания гемоглобина в ретикулоците (RET-HE), индекс продукции ретикулоцитов (RPI) у пациенток с раком молочной железы в процессе лечения железодефицитной анемии ферринжентом. ЦХТ – цикл химиотерапии

Fig. 5. Indicators of the average content of hemoglobin in reticulocyte (RET-HE), reticulocyte production index (RPI) in breast cancer patients during treatment of iron deficiency anemia with ferinject. CHT – cycle of chemotherapy

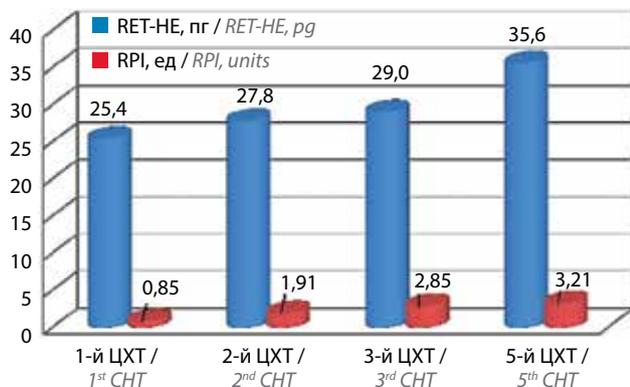


Рис. 6. Показатели среднего содержания гемоглобина в ретикулоците (RET-HE), индекса продукции ретикулоцитов (RPI) у пациенток с раком молочной железы в процессе лечения железодефицитной анемии феринжектом в комбинации с эпоэтином альфа. ЦХТ – цикл химиотерапии

Fig. 6. Indicators of the average content of hemoglobin in reticulocyte (RET-HE), reticulocyte production index (RPI) in breast cancer patients during treatment of iron deficiency anemia with ferinject in combination with epoetin alfa. CHT – cycle of chemotherapy

В то же время некоторым пациенткам с ЖДА вводили феринжект в комбинации с эпоэтином альфа. И, как видно на рис. 6, наряду с ростом показателя RET-HE, индекс RPI, отражающий активность эритропоэза, также вырос существенно – почти в 4 раза по сравнению со значениями до введения эпоэтина альфа, что может являться достоверным признаком усиления скорости образования RBC и подтверждением чувствительности к гЕРО.

Следует отметить, что у отдельных пациенток на фоне лечения гЕРО, высокой скорости эритропоэза и повышения потребности в витаминах развивался дефицит витамина B_{12} и фолиевой кислоты. Это сопровождалось появлением популяции макроцитар-

ных, гиперхромных RBC, ретикулоцитов с высоким содержанием HGB и низкой концентрацией этих витаминов в сыворотке крови. Представленная на рис. 7 динамика показателя RET-HE у пациентки в процессе лечения витамином B_{12} и фолиевой кислотой свидетельствует об адекватности проводимой терапии. Показатели RET-HE вернулись к нормальным значениям. Следует подчеркнуть, что у пациенток с ФДЖ отмечались самые низкие показатели скорости эритропоэза на всех ЦХТ, несмотря на лечение гЕРО.

Заключение

У 6 (19,3 %) пациенток с РМЖ без АС отмечено снижение запаса железа (ФР ниже 20 нг/мл), которое сопровождалось значительной экспрессией белка ГП25, что не исключало ЛДЖ. Отмечена слабая корреляционная связь ($r = 0,19$) между ИЛ-6 и ГП25, а это значит, что причиной гиперэкспрессии ГП25 кроме ИЛ-6 могут быть другие источники.

У 14 (45,1 %) пациенток с РМЖ в процессе неoadъювантной ХТ выявили АС: у 10 пациенток диагностирована ЖДА с низкими показателями железа, ФР, ГП25, ИЛ-6, СРБ и высокой концентрацией ТРФ, рРТФ; у 4 пациенток с III–IV стадиями заболевания РМЖ выявили АС с ФДЖ. АС пациенток с ФДЖ по морфологическим характеристикам (RBC и ретикулоциты) существенно не отличался от АС пациенток с ЖДА, однако показатели концентрации ИЛ-6, ГП25, СРБ и ФР по сравнению с аналогичными показателями у пациенток с ЖДА были значительно выше.

Отмечена тесная корреляционная связь показателей ИЛ-6 с другими маркерами воспаления (ГП25 ($r = 0,60$) и СРБ ($r = 0,96$)) у пациенток с АС (ЖДА

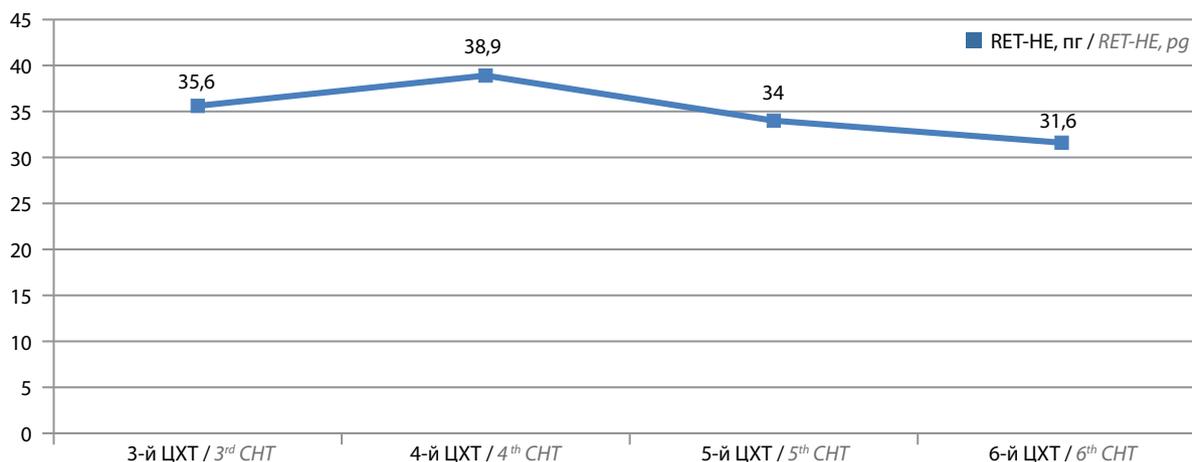


Рис. 7. Показатели среднего содержания гемоглобина в ретикулоците (RET-HE) у пациенток с раком молочной железы в процессе лечения дефицита витамина B_{12} и фолиевой кислоты. ЦХТ – цикл химиотерапии

Fig. 7. Indicators of the average content of hemoglobin in reticulocyte (RET-HE) in breast cancer patients during the treatment of vitamin B_{12} and folic acid deficiency. CHT – cycle of chemotherapy

и ФДЖ). Установлено значительное различие по параметрам ГП25 и ИЛ-6 — показатели были выше у пациенток с III–IV стадиями заболевания: ЛДЖ, АС, ЖДА, ФДЖ и высокое количество FRG чаще выявлялись у пациенток этой группы по сравнению с пациентками со II стадией заболевания РМЖ.

Неадекватная продукция ЭПО по сравнению со степенью тяжести АС отмечалась у всех пациенток с ФДЖ, в меньшей степени у пациенток с ЖДА. Анализ показателей эритропоэза в динамике в процессе ХТ свидетельствует об адекватной коррекции АС у большинства пациенток с РМЖ.

Таким образом, благодаря индивидуальному анализу исследований крови и адекватной коррекции АС удавалось сохранить необходимую дозоинтенсивность терапии и не удлинять интервал между ЦХТ в связи с анемией, улучшалось качество жизни пациенток, переливание компонентов крови на этапах ХТ и хирургического лечения пациенткам не потребовалось. Полученные данные по ГП25, ИЛ-6 и СРБ свидетельствуют о некоторой их взаимосвязи в развитии ФДЖ у пациенток с РМЖ с распространенным опухолевым процессом и требуют дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Снеговой А.В., Ларионова В.Б., Манзюк Л.В., Кононенко И.Б. Анемии в онкологии: возможности поддерживающей терапии. Клиническая онкогематология 2016;3(9):326–35. [Snegovoy A.V., Larionova V.B., Manzyuk L.V., Kononenko I.B. Anemia in Oncology: Possibilities of Supportive Therapy. Klinicheskaya onkogematologiya = Clinical Oncohematology 2016;3(9):326–35. (In Russ.)]. DOI: 10.21320/2500-2139-2016-9-3-326-335.
2. Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В. и др. Разработка стратегических подходов к современной диагностике анемического синдрома у больных раком молочной железы. Клиническая лабораторная диагностика 2019;64(4):210–5. [Blindar' V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V. et al. Development of strategic approaches to modern diagnostics of anemic syndrome in patients with breast cancer. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics 2019;64(4):210–5. (In Russ.)]. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-4-210-215.
3. Pinnix Z.K., Miller L.D., Wang W. et al. Ferritin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis. Sci Transl Med 2010;2(43):43ra56. DOI: 10.1126/scisignal.3001127.
4. Хагажеева М.Н., Снеговой А.В., Блиндарь В.Н. и др. Роль гепсидина 25 в развитии анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными заболеваниями. Российский биотерапевтический журнал 2020;10(4):29–34. [Hagazheeva M.N., Snegovoy A.V., Blindar' V.N. et al. The role of hepcidin 25 in the development of anemic syndrome associated with malignant diseases. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;10(4):29–34. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-29-34.
5. World Medical Association, Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. JAMA 2013;310(20):2191–4. DOI: 10.1001/jama.2013.281053.
6. Aapro M., Beguin Y., Bokemeyer C. et al. Management of anemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. Ann Oncol 2018;29(4):96–110. DOI: 10.1093/annonc/mdx758.
7. Снеговой А.В., Аapro М., Гладков О.А. и др. Практические рекомендации по лечению анемии у онкологических больных. Злокачественные опухоли 2016;4(2):368–77. [Snegovoy A.V., Aapro M., Gladkov O.A. et al. Practical recommendations for treatment of anemia in cancer patients. Zlokachestvennyye opuholi = Malignant tumours 2016;4(2):368–77. (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-4s2-368-377.

Вклад авторов

В.Н. Блиндарь: анализ материалов исследования и литературы, написание рукописи, дизайн работы;
 М.Н. Хагажеева: статистический анализ исследований, описание материалов и методов;
 Т.В. Давыдова, А.В. Снеговой: критический пересмотр рукописи с внесением ценного интеллектуального содержания;
 М.М. Добровольская: сбор материала, выполнение исследовательских работ, формирование базы данных;
 Н.В. Любимова: критический пересмотр рукописи, рисунков, таблиц с внесением ценного интеллектуального содержания;
 Н.Е. Кушлинский: анализ рукописи и литературы с внесением ценного интеллектуального содержания;
 И.Б. Кононенко: клинический анализ полученного материала;
 З.З. Тоашева: анализ клинического материала, таблиц и рисунков;
 А.М. Келеметов: клинический анализ исследований;
 Д.А. Рябчиков: концепция и дизайн работы.

Authors contributions

V.N. Blindar: analysis of analysis of research materials and literature, writing a manuscript, design of the work;
 M.N. Khagazheeva: statistical analysis of research, description of materials and methods;
 T.V. Davydova, A.V. Snegovoy: a critical revision with the introduction of valuable intellectual content;
 M.M. Dobrovolskaya: collecting material, performing research work, forming a database;
 N.V. Lyubimova: critical revision of the manuscript, figures, tables with the introduction of valuable intellectual content;
 N.E. Kushlinsky: an analysis of the manuscript and literature with the introduction of valuable intellectual content;
 I.B. Kononenko: clinical analysis of the material received;
 Z.Z. Toasheva: analysis of clinical material, tables and figures;
 A.M. Kelemetov: clinical analysis of research;
 D.A. Ryabchikov: concept and design of work.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

Т.В. Давыдова / T.V. Davydova: <https://orcid.org/0000-0002-5769-3114>

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

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

Н.В. Любимова / N.V. Lyubimova: <https://orcid.org/0000-0003-0430-2754>

Н.Е. Кушлинский / N.E. Kushlinsky: <https://orcid.org/0000-0002-3898-4127>

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

З.З. Тоашева / Z.Z. Toasheva: <https://orcid.org/0000-0001-7277-4185>

А.М. Келеметов / A.M. Kelemetov: <https://orcid.org/0000-0003-4170-6811>

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

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.
Financing. The study had no sponsor support.

Соблюдение прав пациентов. Пациенты подписали информированное согласие на публикацию их данных.
Compliance with patient rights. The patients gave written informed consent to the publication of their data.

Статья поступила: 19.03.2021. Принята к публикации: 16.04.2021.

Article submitted: 19.03.2021. Accepted for publication: 16.04.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-53-60>

Современное эффективное лечение внутримозговых метастазов меланомы кожи. Пример клинического наблюдения

М.И. Куржупов¹⁻³, А.В. Шабунин^{1,4}, К.С. Титов^{2,5}, Е.Л. Слобина⁶, Д.Н. Греков¹

¹ГБУЗ «Городская клиническая больница им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

²кафедра хирургии и онкологии ФНМО МИ ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 21, корп. 3;

³ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86;

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

⁵ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86, стр. 6;

⁶ФГБУ «Федеральный высокотехнологичный центр медицинской радиологии Федерального медико-биологического агентства»; Россия, Ульяновская обл., 433507 Димитровград, ул. Курчатова, 5в

Контакты: Михаил Иванович Куржупов ktim@mail.ru

Введение. Меланома кожи обладает самым высоким потенциалом метастазирования в головной мозг, занимает 15-е место по частоте встречаемости среди всех злокачественных опухолей и 3-е место по частоте возникновения внутримозговых метастазов. К современным методам лечения метастазов меланомы кожи в головной мозг относятся нейрохирургическое лечение, лучевая терапия и радиохирургия, противоопухолевая лекарственная терапия, включающая таргетную терапию, иммунотерапию и химиотерапию. В статье рассмотрены показания к отдельным методам лечения, приведены данные по выживаемости пациентов при использовании указанных методов лечения в самостоятельном режиме или в комбинации. Обсуждается клинический случай длительной выживаемости пациентки с меланомой кожи с прогрессированием в виде экстра- и интракраниального метастазирования.

Цель работы – оценка результата применения современных методов противоопухолевого лечения в реальной клинической практике у пациентки с метастазами меланомы кожи в головной мозг.

Материалы и методы. На клиническом примере рассмотрена возможная последовательность индивидуально-го подхода к лечению пациентки с экстракраниальными и внутримозговыми метастазами меланомы кожи на основе современных методов лечения и обследования.

Результаты. Применение современных методов противоопухолевой терапии позволило повысить общую и безрецидивную выживаемость пациентов с метастазами меланомы кожи в головной мозг и снизить необходимость нейрохирургических вмешательств. Продолжительность жизни пациентки после прогрессирования меланомы кожи в виде метастазов в головной мозг на фоне всего проводимого противоопухолевого лечения к настоящему времени составила 5,5 года, при этом нейрохирургическое лечение не проводилось по желанию пациентки, хотя и было показано, а были использованы возможности современной противоопухолевой терапии, включая последовательную лучевую терапию, таргетную терапию и иммунотерапию.

Заключение. Современные методы противоопухолевой терапии позволяют значительно повысить выживаемость пациентов с метастазами меланомы в головной мозг и индивидуализировать план лечения.

Ключевые слова: меланома, внутримозговые метастазы, иммунотерапия, таргетная терапия, лучевая терапия

Для цитирования: Куржупов М.И., Шабунин А.В., Титов К.С. и др. Современное эффективное лечение внутримозговых метастазов меланомы кожи. Пример клинического наблюдения. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):53–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-53-60.

Modern effective treatment of brain metastases of skin melanoma. The example of clinical observation

Mikhail I. Kurzhupov¹⁻³, Alexei V. Shabunin^{1,4}, Konstantin S. Titov^{2,5}, Elena L. Slobina⁶, Dmitriy N. Grekov¹

¹S.P. Botkin City clinical hospital, Moscow Department of Healthcare; 5, 2nd Botkinsky proezd, Moscow 125284, Russia;

²Department of Surgery and Oncology of the FCME of the Medical Institute of the RUDN University; Bld. 3, 21 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

³Russian Scientific Center of Roentgenoradiology, Ministry of Health of Russia; 86 Profsoyuznaya St., Moscow 117997, Russia;

⁴Department of Surgery of the Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 BARRIKADNAYA St., Moscow 125993, Russia;

⁵A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; Bld. 6, 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia;

⁶Federal High-Tech Center for Medical Radiology, Federal Medical Biological Agency; 5b Kurchatova St., Dimitrovgrad 433507, Ulyanovsk Region, Russia

Contacts: Mikhail Ivanovich Kurzhupov kmim@mail.ru

Introduction. Melanoma of the skin has the highest potential for metastasis to the brain, ranking 15th in the frequency of occurrence among all malignant tumors – it is in third place in the incidence of intracerebral metastases. Modern methods of treatment of metastases of skin melanoma to the brain include neurosurgical treatment, radiation therapy and radiosurgery, antitumor drug therapy, including targeted therapy, immunotherapy and chemotherapy. The article discusses the indications for different methods of treatment, provides data on patient survival when using these methods of treatment alone or in combination. Additionally, a clinical case of long-term survival of a patient with skin melanoma with progression in the form of extra- and intracranial metastasis is discussed.

Purpose. Evaluation of the result of using modern methods of antitumor treatment in real clinical practice in a patient with skin melanoma metastases in the brain.

Materials and methods. On a clinical example, a possible sequence of an individual approach to the treatment of a patient with extracranial and intracerebral metastases of skin melanoma based on modern methods of treatment and examination is considered.

Results. The use of modern methods of anticancer therapy has increased the overall survival and disease-free survival of patients with metastases of skin melanoma to the brain and reduces the need for neurosurgical interventions. As a confirmation of this, the life expectancy of the patient after the progression of skin melanoma in the form of metastases to the brain against the background of all the antitumor treatment carried out to date was 5.5 years, while neurosurgical treatment was not carried out at the request of the patient, although it was shown, but were used the possibilities of modern anticancer therapy, including sequential radiation therapy, targeted therapy and immunotherapy.

Conclusion. Modern methods of anticancer therapy can significantly increase the survival rate of patients with melanoma brain metastases and individualize the treatment plan.

Key words: melanoma, brain metastases, immunotherapy, targeted therapy, radiation therapy

For citation: Kurzhupov M.I., Shabunin A.V., Titov K.S. et al. Modern effective treatment of brain metastases of skin melanoma. The example of clinical observation. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):53–60. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-53-60.

Введение

Внутричерепные (церебральные) метастазы – наиболее часто встречающиеся интракраниальные злокачественные опухоли взрослого населения. В Российской Федерации нет точной статистики по выявляемости метастазов в головной мозг у онкологических больных. В США, по данным разных авторов, фиксируется от 98 тыс. до 170 тыс. новых случаев метастатического поражения головного мозга в год [1–3]. По данным аутопсий умерших онкологических пациентов большинство метастазов имеют округлую форму, хорошо отграничены от окружающих мозговых тканей, однако на микроскопическом уровне отличаются инфильтративным ростом [2].

Несмотря на определенные успехи нейроонкологов в лечении больных с метастазами злокачественных опухолей в головной мозг в течение последних лет, отдаленные результаты остаются неудовлетворительными.

По данным The Radiation Therapy Oncology Group (RTOG, 1997), пациенты с внутричерепными метастазами делятся на 3 класса (Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors) в зависимости от индекса Карновского, контролируемости первичного заболевания, возраста и наличия экстракраниальных метастазов (табл. 1) [4].

После выявления метастатического поражения головного мозга медиана выживаемости больных в зависимости от RPA-класса составляет: без лечения – в среднем 1 мес, при добавлении кортикостероидов – 2 мес, после облучения всего головного мозга – 2–7 мес, при использовании стереотаксической радиохирургии – 5,5–14 мес, при использовании хирургии или радиохирургии в сочетании с облучением всего головного мозга – 6–15 мес (табл. 2) [3, 4].

Меланома кожи составляет всего 1,5 % от всех злокачественных новообразований взрослых у мужчин и 2,1 % – у женщин [5]. Среди всех солидных

Таблица 1. Определение RPA-классов

Table 1. Defining of RPA-classes

Критерий Criteria	Класс 1 Class 1	Класс 2 Class 2	Класс 3 Class 3
Индекс Карновского Karnofsky scale	>70	>70	<70
Контролируемость первичного заболевания Controllability of the primary disease	Контролируемо Control	Неконтролируемо No control	Любой статус Any status
Возраст Age	<65	>65	Любой Any
Наличие экстракраниальных метастазов Presence of extracranial metastases	Нет No	Есть Yes	Любой статус Any status

опухолей меланома стоит на 1-м месте по потенциалу метастазирования в головной мозг. По результатам ряда клинических исследований больных меланомой кожи показано, что прижизненно интракраниальные метастазы в процессе развития заболевания диагностируются в 10–40 % случаев, а по данным аутопсии – до 75 % макроскопически и в виде микрометастазов [6, 7]. Неврологические осложнения при церебральных метастазах – наиболее частая причина смерти больных с меланомой. Считается, что метастазирование меланомы поздних стадий происходит уже в первые недели и месяцы после начала заболевания, неконтролируемая диссеминация опухоли определяется у многих больных уже в момент постановки диагноза [8]. Раннее метастазирование меланомы кожи объясняют тем, что в этой опухоли очень низкая дифференцировка стенок кровеносных сосудов, вследствие чего возникает непосредственный контакт клеток меланомы и эндотелия с проникновением их в просвет сосудов. К особенностям внутримозговых метастазов меланомы относится их предрасположенность к образованию множественных очагов. В 29–50 % случаев происходит кровоизлияние в опухоль. Течение заболевания при метастатическом поражении головного мозга чаще всего острое, с быстрым возникновением и нарастанием симптомокомплекса поражения церебральных структур, что характерно для инсультноподобного варианта развития опухолей головного мозга. Меланома является радиорезистентной опухолью при классическом режиме фракционирования дозы лучевой терапии [9].

Выбор хирургического лечения церебральных метастазов меланомы из всех методов локального контроля показан при наличии перифокального отека с масс-эффектом, стремительном нарастании неврологической симптоматики, кровоизлиянии в опу-

Таблица 2. Медиана выживаемости больных в зависимости от лечения и RPA-класса по данным RTOG

Table 2. Median patient survival depending on treatment and RPA-class according to RTOG data

Лечение Treatment	Число пациентов Number of patients	Медиана выживаемости, мес Median survival, months		
		Класс 1 Class 1	Класс 2 Class 2	Класс 3 Class 3
ОВГМ WBRT	1176	7,1	4,2	2,3
СРХ SRS	268	14,0	8,2	5,3
СРХ + ОВГМ WBRT + SRS	301	15,2	7,0	5,5
Нейрохирургия + ОВГМ Neurosurgery + WBRT	125	14,8	9,9	6,0

Примечание. ОВГМ – облучение всего головного мозга; СРХ – стереотаксическая радиохирургия.

Note. WBRT – whole-brain radiation therapy; SRS – stereotactic radiosurgery.

холь, необходимости гистологической верификации или размерах очага более 3 см [10]. В остальных случаях, особенно при множественном поражении, предпочтение следует отдать стереотаксической лучевой терапии. При этом данные критерии не являются абсолютными и тактика лечения определяется в каждом клиническом случае индивидуально, с преобладанием системной терапии.

Все вышеизложенное стимулирует поиск новых методик противоопухолевого лечения, которые позволят улучшить результаты лечения данной сложной категории онкологических пациентов без ухудшения качества жизни.

В последние годы в лечении метастатической меланомы кожи произошел значительный прогресс. После успешных клинических испытаний в практику вошли новые классы противоопухолевых препаратов. Это группа таргетных препаратов, применяющихся при наличии в опухоли мутации в гене *BRAF* – BRAF- и MEK-ингибиторы (вемурафениб и кобиметиниб; дабрафениб и траметиниб), а также новый класс иммуноонкологических препаратов – ингибиторы контрольных точек: анти-CTLA-4 (ипилимумаб) и анти-PD-1/PD-L1 (ниволумаб, пембролизумаб и пролголимаб), которые направлены на активацию и разблокировку клеток иммунной системы больного против меланомы. Непосредственной противоопухолевой активностью обладают активированные и перепрограммированные с помощью чекпойнт-ингибиторов цитотоксические Т-лимфоциты, которые

инфильтрируют опухолевую ткань и вызывают ее гибель.

Традиционно из регистрационных исследований лекарственных препаратов для лечения метастатической меланомы исключали пациентов с метастазами в головной мозг, поэтому данные об эффективности таких препаратов у этой категории пациентов ограничены.

В исследованиях II фазы по применению таргетных препаратов (COMBI-MB, BREAK-MB) продемонстрирована их значительная активность при метастазах меланомы в головной мозг, которые ранее не подвергались лечению: 39 % пациентов отвечали на терапию в монорежиме и до 58 % пациентов – при применении комбинации BRAF- и MEK-ингибиторов. Тем не менее длительность достигнутых ответов была короткой и у пациентов вновь отмечалось прогрессирование [11, 12].

Исследование эффективности ингибитора PD-1 пембролизумаба проводилось на небольшой группе пациентов. Среди включенных в исследование 18 пациентов с метастазами в головной мозг объективный ответ на терапию был достигнут у 22 % больных [13].

В исследовании II фазы, проводимом австралийским центром, 79 пациентов получали либо ингибитор PD-1 ниволумаб в комбинации с ингибитором CTLA-4 ипилимумабом, либо монотерапию ниволумабом при метастазах в головной мозг [14]. Исследование включало 3 группы пациентов. Шестнадцать пациентов, ранее получавших лечение, имели метастазы в головной мозг с выраженными неврологическими симптомами, а остальные пациенты не имели неврологических симптомов. Пациенты с асимптомными метастазами в головной мозг были рандомизи-

рованы соответственно в группы монотерапии ниволумабом или комбинации ниволумаб + ипилимумаб. Показано, что применение комбинации ниволумаб + ипилимумаб позволяет достичь объективных ответов в 56 % случаев, при этом ответы достигались как в интракраниальных, так и в экстракраниальных очагах. При монотерапии ниволумабом частота объективных ответов составила 21 %. Примечательно, что достигнутые ответы сохранялись длительное время. При применении комбинации ниволумаб + ипилимумаб при бессимптомных метастазах в головной мозг 1-летняя выживаемость без прогрессирования в интракраниальных и экстракраниальных очагах была близка к 60 и 70 % соответственно, а при симптомных метастазах в головной мозг 6-месячная выживаемость без прогрессирования была на уровне 29 и 33 % соответственно; при использовании ниволумаба медиана выживаемости при бессимптомных метастазах в головной мозг составляла 26,1 мес, а при симптомных – около 3 мес. При оценке же общей популяции (включая пациентов с предшествующей анти-BRAF + анти-MEK терапией) аналогичные показатели составили 46 и 20 % соответственно. Привлекает внимание тот факт, что через 36 мес наблюдения выживаемость без прогрессирования по интракраниальным очагам составила 43 %, а по экстракраниальным очагам – 50 % в группе комбинации ниволумаб + ипилимумаб, тогда как в группе ниволумаба – 21 и 15 % соответственно (рис. 1), общая же выживаемость на сроке 36 мес составила 49 и 42 % соответственно (рис. 2) [15].

Цель работы – оценка результата применения современных методов противоопухолевого лечения в реальной клинической практике у пациентки с метастазами меланомы кожи в головной мозг.

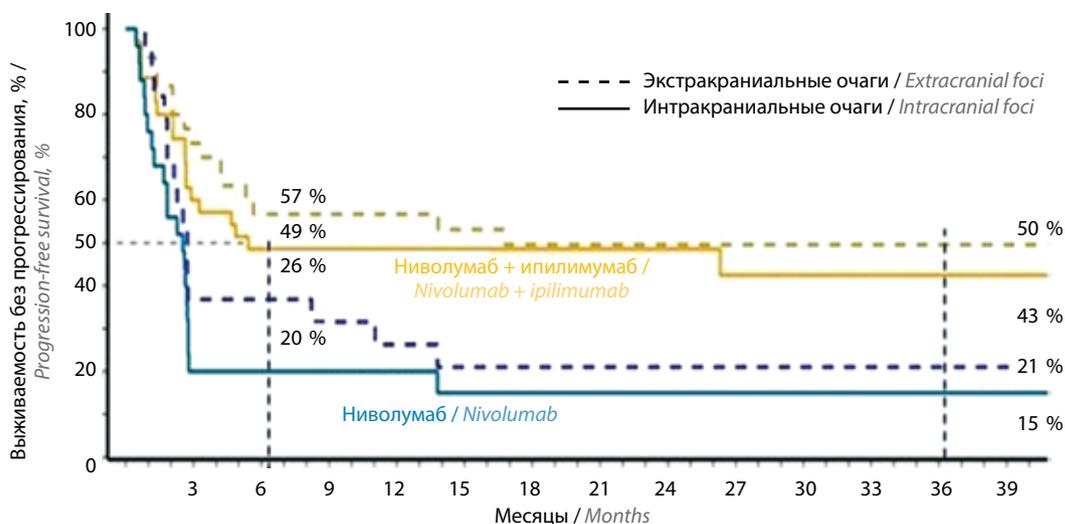


Рис. 1. Данные исследования CA209-170 по выживаемости без прогрессирования среди пациентов с бессимптомными метастазами в головной мозг

Fig. 1. Data from study CA209-170 on progression-free survival in patients with asymptomatic brain metastases

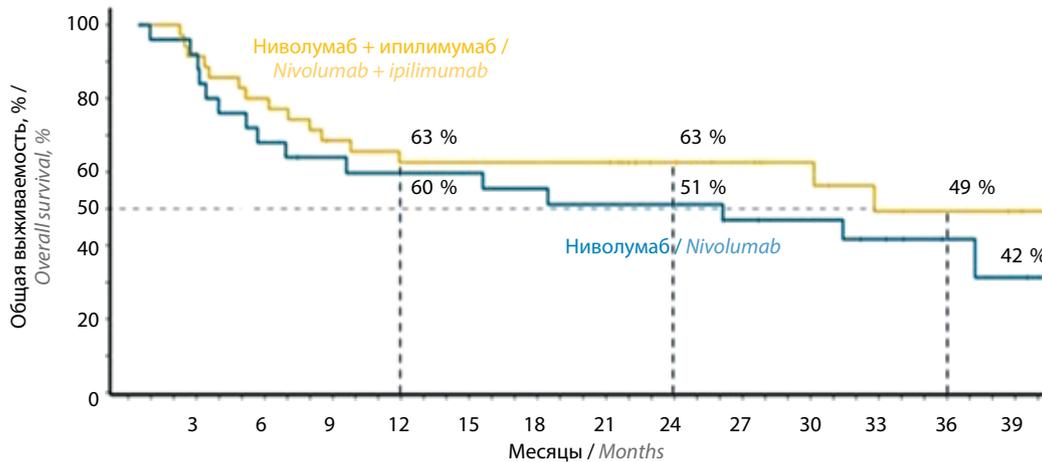


Рис. 2. Данные исследования CA209-170 по общей выживаемости среди пациентов с бессимптомными метастазами в головной мозг
Fig. 2. Data from study CA209-170 on overall survival among patients with asymptomatic brain metastases

Клинический случай

Пациентка С., 1953 г.р. В декабре 2006 г. проведено хирургическое лечение: широкое иссечение меланомы кожи центра спины с определением сторожевых лимфоузлов в правой и левой подмышечных областях. Гистологическое заключение: эпителиоверетенноклеточная меланома кожи, уровень инвазии по Кларку – IV, толщина опухоли по Бреслоу – 4,0 мм, удаленные сторожевые лимфоузлы без признаков метастатического поражения. Установлен диагноз: меланома кожи межлопаточной области, рТ3аN0M0, IIA стадия.

Далее в течение 12 мес проведена адъювантная иммунотерапия интерфероном α . Спустя 6 лет и 9 мес после ее окончания отмечено прогрессирование заболевания: выявлены метастазы в зоне послеоперационного рубца спины, в подмышечных лимфоузлах слева и в мягких тканях передней грудной стенки.

В октябре 2014 г. проведено хирургическое лечение: удаление всех метастатических очагов кожи и мягких тканей туловища. При гистологическом исследовании метастатических опухолей и первичной опухоли подтверждены метастазы меланомы, в опухоли обнаружена мутация V600E в гене BRAF. В январе 2015 г. до начала лечения отмечено прогрессирование: метастазы в левую подмышечную область, левую ягодичную мышцу и плевру слева.

С февраля 2015 г. пациентка принимала вемурафениб, и через 4 мес была отмечена полная регрессия всех метастатических очагов, после чего был прекращен прием препарата (что в данной клинической ситуации было запрещено делать инструкцией производителя и практическими рекомендациями [16]). Как следствие, произошло прогрессирование опухолевого процесса в виде олигометастазов в головной мозг, выявленное в ноябре 2015 г.: в правой височной области – 46 × 22 мм и в правой затылочно-височной области – 5 × 2 мм, сопровождавшееся неврологической симптоматикой. Пациентка

отказалась от предложенного ей нейрохирургического лечения, поэтому была возобновлена таргетная терапия вемурафенибом, которая проводилась в течение 4 мес с положительным эффектом в виде уменьшения размеров метастазов в головном мозге. Однако прием препарата был прерван в связи с его отсутствием. Спустя 1 мес после прекращения приема препарата отмечено нарастание неврологической симптоматики, что явилось следствием дальнейшего прогрессирования – продолженный рост метастазов в головном мозге до 57 × 28 мм и 37 × 18 мм соответственно. Предложено нейрохирургическое лечение, от которого пациентка отказалась. Для местного контроля в июле 2016 г. была проведена радиотерапия локально на метастазы в головном мозге в режиме гиподифракционирования дозы. А уже в августе 2016 г. отмечено дальнейшее прогрессирование – появление экстракраниальных очагов в мягких тканях передней грудной стенки, правой лопаточной области и плече, тканях левого плеча и левой ягодичной области.

Вновь возобновлена таргетная терапия вемурафенибом, которая проводилась в течение 4 мес с положительным эффектом в виде уменьшения размеров метастазов в головном мозге до 46 × 21 мм и 30 × 12 мм и экстракраниальных метастазов. Далее был продолжен прием вемурафениба – до ноября 2017 г., когда было отмечено прогрессирование в виде увеличения метастазов в головном мозге до 58 × 26 мм и 30 × 18 мм, появления метастазов в мягких тканях правого плеча и правой подмышечной области. Оптимальным лечением была бы смена таргетной терапии на иммунотерапию, однако на тот момент обеспечение иммуноонкологическими препаратами было крайне затруднено и пациентка была переведена на комбинированную таргетную терапию – дабрафениб + траметиниб, что допускается рядом клинических исследований и рекомендациями NCCN (National Comprehensive Cancer Net-

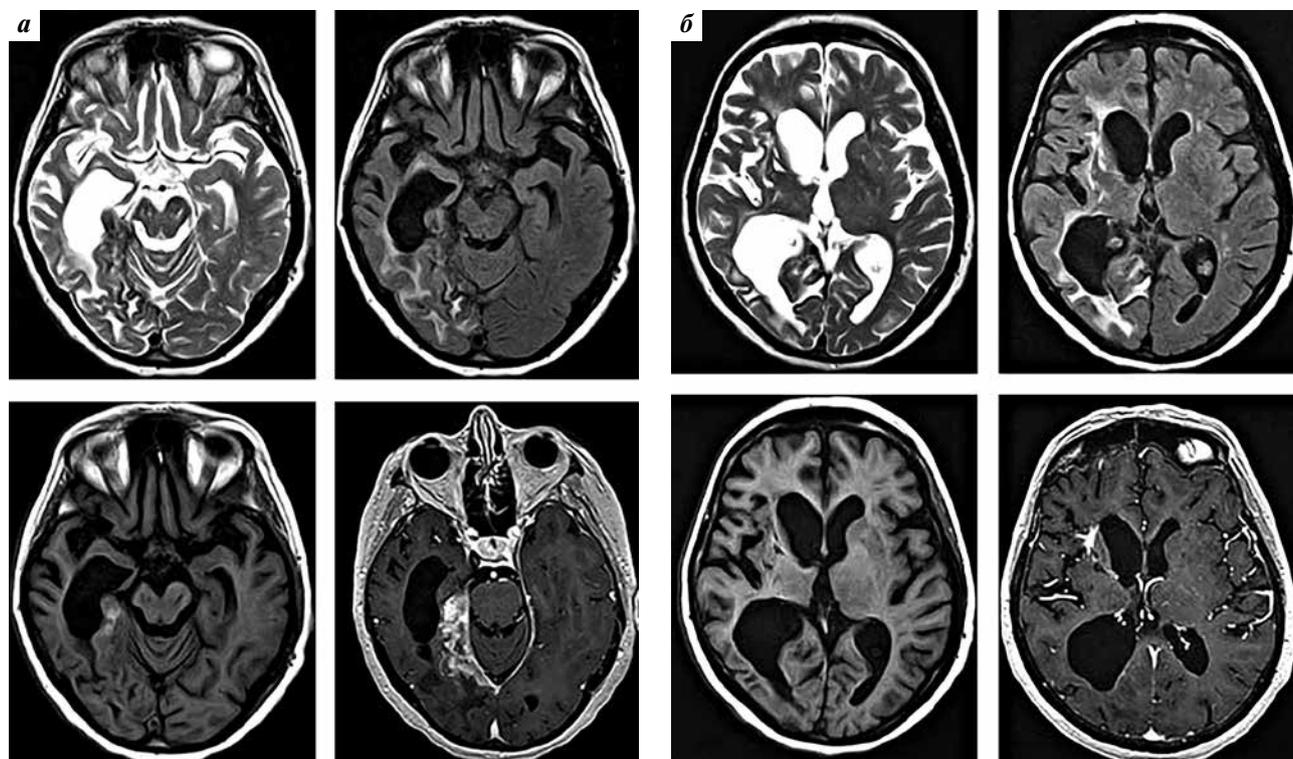


Рис. 3. Магнитно-резонансные томограммы головного мозга пациентки С. с контрастным усилением (июль 2019 г.): объемные образования с нечеткими контурами, неоднородной структуры, с перифокальными изменениями, размерами в височно-затылочной области 50×21 мм (а), в височной доле – 24×12 мм (б). Без существенной динамики в сравнении с данными магнитно-резонансной томографии от апреля 2019 г.

Fig. 3. Magnetic-resonance imaging of the brain of patient S. with contrast enhancement (July 2019): volumetric lesions with fuzzy contours, heterogeneous structure, with perifocal changes, sizes in the temporo-occipital region 50×21 mm (a), in the temporal lobe – 24×12 mm (b). Without significant dynamics in comparison with the magnetic-resonance imaging data from April 2019

work). В результате проведенного лечения спустя 3 мес зарегистрирована частичная регрессия метастазов и данная терапия была продолжена.

В июне 2018 г. (спустя 6 мес после назначения комбинированной таргетной терапии) отмечено прогрессирование: продолженный рост метастазов в головном мозге (56×21 мм и 25×13 мм), мягких тканях правого плеча и правой подмышечной области. От предложенного нейрохирургического вмешательства и лучевой терапии пациентка отказалась. Был проведен онкологический консилиум и, с учетом наличия иммуноонкологических препаратов, пациентке был назначен ингибитор PD-1 ниволумаб, прием которого начат с июня 2018 г. Через 3 мес при первом контрольном обследовании отмечено уменьшение всех метастатических очагов. Продолжена иммунотерапия ниволумабом.

Для исключения нежелательного явления в виде эндокринопатии пациентка была проконсультирована эндокринологом. Установлен диагноз: первичный гипотиреоз после правосторонней гемитиреоидэктомии по поводу фолликулярной аденомы щитовидной железы, медикаментозная компенсация, левосторонний узловый коллоидный зоб.

Далее пациентка регулярно проходила контрольные обследования – 1 раз в 3 мес. При обследовании в апреле

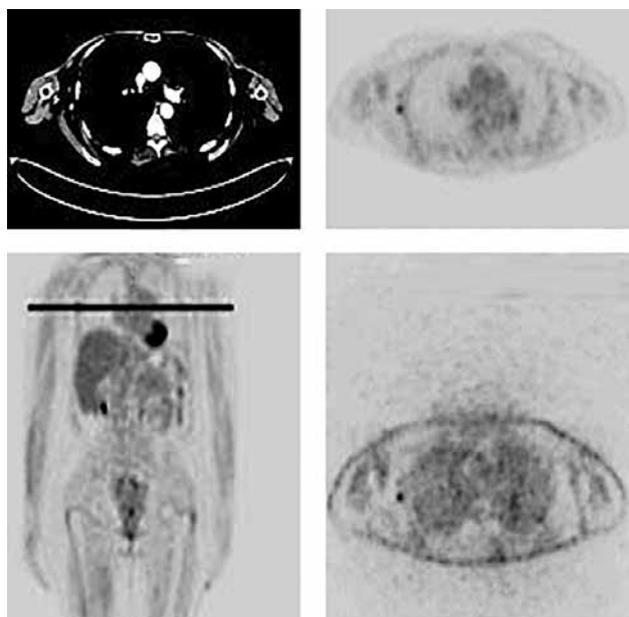


Рис. 4. Данные совмещенной с компьютерной томографией позитронно-эмиссионной томографии всего тела пациентки С. с фтордезоксиглюкозой, меченной ^{18}F (июль 2019 г.)

Fig. 4. Whole body positron emission tomography combined with computed tomography data with fluorodeoxyglucose labeled with ^{18}F of patient S. (July 2019)

2019 г. отмечена положительная динамика в виде частичной регрессии метастазов, а уже в июле 2019 г. — стабилизация (рис. 3, 4). Пациентка по настоящее время (январь 2021 г.) продолжает иммунотерапию ниволумабом, без признаков прогрессирования и нежелательных явлений, социально и физически активна.

Результаты

Как мы видим, применение современных методов противоопухолевой терапии повышает общую и безрецидивную выживаемость пациентов с метастазами меланомы кожи в головной мозг и позволяет снизить необходимость нейрохирургических вмешательств. Подтверждением этого является представленный клинический случай: пациентка жива более 5 лет, и в настоящее время у нее сохраняется стабилизация заболевания — после развития метастазов меланомы кожи в головном мозге и при отсутствии нейрохирургического вмешательства, благодаря использованию современной терапии (при медиане выживаемости данной когорты пациентов около 3–4 мес).

Заключение

Современные методы противоопухолевого лечения позволяют достоверно повысить выживаемость пациентов с метастазами меланомы кожи в головной мозг. В клинических исследованиях медиана общей выживаемости при применении ниволумаба в монорежиме составляет 26,1 мес, а безрецидивной по интракраниальным бессимптомным очагам — 2,7 мес,

однако в клинические исследования отбираются пациенты с несимптомными метастазами в головной мозг, лечение которых ранее не проводилось.

В представленном клиническом случае у пациентки с прогрессированием меланомы кожи в виде экстракраниальных и интракраниальных метастазов были использованы современные противоопухолевые методы лечения, что позволило взять заболевание под контроль более чем на 5 лет (метастазы в головном мозге — на 2 года и 7 мес таргетной терапией, на 31 мес — иммунотерапией). Благодаря использованию современной терапии продолжительность жизни пациентки на фоне всего проводимого противоопухолевого лечения к настоящему времени составила почти 14 лет с момента выявления первичной опухоли, и более 5 лет — после прогрессирования в виде метастазов в головной мозг. При этом нейрохирургическое лечение не проводилось, хотя и было показано. Ранее медиана выживаемости пациентов с метастатическим поражением головного мозга меланомой кожи была в пределах 3–4 мес.

Пациенты с метастазами меланомы в головной мозг являются особой группой, с плохим клиническим прогнозом и небольшой продолжительностью жизни. Внедрение в клиническую практику новых современных методов лечения может улучшить выживаемость у данных больных. Накопление клинического опыта будет способствовать оптимизации подходов к комбинированному лечению метастазов меланомы в головной мозг.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Куржупов М.И. Возможности лечения диссеминированной меланомы с множественным метастатическим поражением головного мозга. Исследования и практика в медицине 2018;5(4):98–105. [Kurzhupov M.I. Treatment options for disseminated melanoma with multiple metastatic brain lesions. Issledovaniya i praktika v meditsine = Research and Practice in Medicine 2018;5(4):98–105. (In Russ.)]. DOI: 10.17709/2409-2231-2018-5-4-10.
2. Larson D., Rubenstein J.M., McDermott M. et al. Treatment of Metastatic Cancer: Cancer Principles and Practice of Oncology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. Pp. 2323–2398.
3. Pollock B.E., Brown P.D., Foote R.L. et al. Properly selected patients with multiple brain metastases may benefit from aggressive treatment of their intracranial disease. J Neurooncol 2003;61(1):73–80. DOI: 10.1023/a:1021262218151.
4. Gaspar L., Scott C., Rotman M. et al. Recursive partitioning analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1997;37(4):745–51. DOI: 10.1016/s0360-3016(96)00619-0.
5. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова В.В. Злокачественные новообразования в России в 2018 г. (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2019. 250 с. [Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova V.V. Malignant neoplasms in Russia in 2018 (morbidity and mortality). Moscow: MNIOI n. a. P.A. Herzen — branch of the FSBI “NMIRC” of the Ministry of Health of Russia, 2019. 250 p. (In Russ.)].
6. Bafaloukos D., Gogas H. The treatment of brain metastases in melanoma patients. Cancer Treat Rev 2004;30(6):515–20. DOI: 10.1016/j.ctrv.2004.05.001.
7. Sloan A.E., Nock C.J., Einstein D.B. et al. Diagnosis and treatment of melanoma brain metastasis: a literature review. Cancer Control 2009;16(3):248–55. DOI: 10.1177/107327480901600307.
8. Акимов М.А., Гершанович М.Л. Клиническая оценка эффективности современных режимов химиотерапии первой, второй и третьей линии у больных диссеминированной меланомой кожи. Вопросы онкологии 2001;47(4):428–35. [Akimov M.A., Gershanovich M.L. Clinical evaluation of the effectiveness of modern regimens of first, second and third line chemotherapy in patients with disseminated skin melanoma. Voprosy onkologii = Problems of Oncology 2001;47(4):428–35. (In Russ.)].
9. Gonzalez-Martinez J., Hernandez L., Zamorano L. et al. Gamma knife radiosurgery for intracranial metastatic

- melanoma: a 6-year experience. *J Neurosurg* 2002;97(5 Suppl):494–8. DOI: 10.3171/jns.2002.97.supplement.
10. Nabors L.B., Ammirati M., Bierman P.J. et al. National Comprehensive Cancer Network. Central nervous system cancers. NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw* 2013;11(9):1114–51. DOI: 10.6004/jnccn.2013.0132.
 11. Davies M.A., Saiag P., Robert C. et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with *BRAF* V600-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;18(7):863–73. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30429-1.
 12. Long G.V., Trefzer U., Davies M.A. et al. Dabrafenib in patients with Val600Glu or Val600Lys *BRAF*-mutant melanoma metastatic to the brain (BREAK-MB): a multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012;13(11):1087–95. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70431-X.
 13. Goldberg S.B., Gettinger S.N., Mahajan A. et al. Pembrolizumab for patients with melanoma or non-small-cell lung cancer and untreated brain metastases: early analysis of a non-randomised, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016;17(7):976–83. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30053-5.
 14. Long G.V., Atkinson V., Lo S. et al. Combination nivolumab and ipilimumab or nivolumab alone in melanoma brain metastases: a multicentre randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018;19(5):672–81. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30139-6.
 15. Long G.V., Atkinson V.G., Lo S. et al. Long-term outcomes from the randomised phase II study of nivolumab (nivo) or nivo + ipilimumab (ipi) in patients (pts) with melanoma brain metastases (mets): Anti-PD1 brain collaboration (ABC). *Ann Oncol* 2019;30(5 Suppl):534. DOI: 10.1093/annonc/mdz255.001.
 16. Демидов Л.В., Булавина И.С., Гладков О.А. и др. Практические рекомендации по лекарственному лечению меланомы кожи. *Злокачественные опухоли* 2015; 4(специальный выпуск):162–70. [Demidov L.V., Bulavina I.S., Gladkov O.A. et al. Practical recommendations for the drug treatment of skin melanoma. *Zlokachestvenniye opuholy = Malignant tumors* 2015;4(Spec. Issue):162–70 (In Russ.)]. DOI: 10.18027/2224-5057-2015-4s-162-170.

Вклад авторов

М.И. Куржупов: сбор материала, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;
 А.В. Шабунин: редактирование статьи;
 К.С. Титов: обзор публикаций по теме статьи, анализ результатов хирургического лечения;
 Е.Л. Слобина: обзор публикаций по теме статьи, анализ результатов лучевой терапии;
 Д.Н. Греков: разработка дизайна статьи.

Authors contributions

M.I. Kurzhupov: collecting material, reviewing publications on the topic of the article, writing the text of the manuscript;
 A.V. Shabunin: editing the article;
 K.S. Titov: a review of publications on the topic of the article, an analysis of the surgical results of treatment;
 E.L. Slobina: review of publications on the topic of the article, analysis of the results of radiation therapy;
 D.N. Grekov: article design development.

ORCID автора / ORCID of author

М.И. Куржупов / M.I. Kurzhupov: <https://orcid.org/0000-0002-6407-5736>
 А.В. Шабунин / A.V. Shabunin: <https://orcid.org/0000-0002-0522-0681>
 К.С. Титов / K.S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>
 Е.Л. Слобина / E.L. Slobina: <https://orcid.org/0000-0001-7657-7496>
 Д.Н. Греков / D.N. Grekov: <https://orcid.org/0000-0001-8391-1210>

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.

Соблюдение прав пациентов. Пациентка подписала информированное согласие на публикацию своих данных.

Compliance with patient rights. The patient gave written informed consent to the publication of her data.

Статья поступила: 11.01.2021. Принята к публикации: 16.04.2021.

Article submitted: 11.01.2021. Accepted for publication: 16.04.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68>

Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины

А.А. Рудакова, М.А. Барышникова, З.А. Соколова, О.С. Бурова, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

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

Контакты: Анна Андреевна Рудакова rudakovaan93@yandex.ru

Введение. Одним из многообещающих подходов к лечению злокачественных новообразований является иммунотерапия, основанная на использовании мутантных неоантигенов опухоли для активации противоопухолевого иммунного ответа.

Цель исследования – оценка индивидуальной иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели вакцины против меланомы B16-F10.

Материалы и методы. Исследовали 32 неоантигенных синтетических пептида длиной 25–27 аминокислот, которые были выбраны ранее в результате биоинформатического анализа данных секвенирования меланомы B16-F10 и здоровых тканей мышей C57Bl/6J как потенциально иммуногенные. Группы мышей C57Bl/6J 4-кратно с интервалом в неделю иммунизировали каждым отдельным пептидом в сочетании с адъювантом Poly(I:C), мышей в 1 группе иммунизировали только Poly(I:C), а в контрольной группе не иммунизировали. Иммуногенность пептидов оценивали по продукции интерферона γ спленоцитами методом ELISpot и по уровню сывороточных цитокинов Th1/Th2 методом ELISA у иммунизированных мышей и у животных в контрольной группе.

Результаты. 25 из 32 исследованных пептидов вызывали увеличение количества интерферон- γ -продуцирующих клеток селезенки ранее иммунизированных мышей, однако 8 из этих пептидов вызывали неспецифическое увеличение продукции интерферона γ спленоцитами у неиммунизированных животных. Обнаружено, что только 11 из 32 пептидов вызывали повышение уровня сывороточных цитокинов интерферона γ и интерлейкина 4, отвечающих за развитие иммунного ответа Th1 и Th2. При этом только 7 пептидов влияли на увеличение количества интерферон- γ -продуцирующих спленоцитов и уровня цитокинов интерферона γ и интерлейкина 4.

Заключение. Проведена оценка иммуногенности 32 синтетических неоантигенных пептидов. Показано, что 7 пептидов активируют клеточный иммунный ответ.

Ключевые слова: синтетические пептиды, неоантигены, меланома, иммунный ответ, противоопухолевая вакцина

Для цитирования: Рудакова А.А., Барышникова М.А., Соколова З.А. и др. Оценка иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):61–8. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68.

Evaluation of immunogenicity of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model

Anna A. Rudakova, Maria A. Baryshnikova, Zinaida A. Sokolova, Olga S. Burova, Ekaterina N. Kosobokova, Vyacheslav S. Kosorukov

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

Contacts: Anna Andreevna Rudakova rudakovaan93@yandex.ru

Introduction. Immunotherapy based on the usage of mutant tumor neoantigens to activate the antitumor immune response is one of the most promising approaches to cancer treatment.

Purpose. Evaluation of individual immunogenicity of synthetic neoantigen peptides for the B16-F10 melanoma vaccine model.

Materials and methods. We studied 32 synthetic neoantigen peptides with a length of 25–27 amino acids, which were previously selected as potentially immunogenic by bioinformatic analysis of B16-F10 melanoma sequencing

data and healthy tissues of C57Bl/6J mice. Groups of C57Bl/6J mice were immunized four times at weekly intervals with each individual peptide in combination with the adjuvant Poly(I:C), one of the groups was immunized only with Poly(I:C), and the control group was not immunized with anything. The immunogenicity of peptides was assessed by the production of interferon γ in splenocytes using the ELISpot method and by the level of serum cytokines Th1/Th2 using the ELISA method in immunized mice and in animals in the control group.

Results. Of the 32 peptides studied, 25 caused an increase in the number of interferon- γ -producing spleen cells in previously immunized mice, but 8 of these peptides caused a non-specific increase in the production of interferon γ by splenocytes in non-immunized animals. It was found that out of 32 peptides, only 11 caused an increase in the level of serum cytokines interferon γ and interleukin 4, which are responsible for the development of the immune response along the Th1 and Th2 pathways. But only 7 peptides affected an increase in the number of interferon- γ -producing splenocytes and an enhance of cytokines interferon γ and interleukin 4 levels.

Conclusion. Thus, the immunogenicity of 32 synthetic neoantigen peptides was evaluated, and 7 peptides were shown to activate the cellular immune response.

Key words: synthetic peptides, neoantigens, melanoma, immune response, antitumor vaccine

For citation: Rudakova A.A., Baryshnikova M.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of immunogenicity of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):61–8. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-61-68.

Введение

Вакциноterapia, нацеленная на усиление распознавания иммунной системой мутантных неоантигенов опухоли, является одним из многообещающих подходов к персонализированной иммунотерапии рака [1]. Неоантигены образуются в результате уникальных соматических мутаций в геноме каждой отдельной опухоли, они могут обладать высокой иммуногенностью, так как отсутствуют в нормальных тканях и поэтому могут распознаваться иммунной системой как чужеродные антигены. Опухолевые мутантные неоантигены рассматриваются в качестве мишеней для иммунотерапии с потенциально высокой специфичностью, эффективностью и безопасностью. Благодаря достижениям в технологии секвенирования генома, а также совершенствованию биоинформатических алгоритмов прогнозирования появилась возможность идентифицировать иммуногенные неоантигены у отдельных пациентов [2–4].

Ранее нами был разработан биоинформатический подход для анализа данных высокопроизводительного секвенирования образцов меланомы и нормальной ткани и предсказания пептидов, способных вызывать иммунный ответ на модели мышью меланомы B16-F10 [5]. В результате этой работы были спрогнозированы иммуногенные пептиды длиной 25–27 аминокислот, которые затем были синтезированы. На следующем этапе работы мы оценили иммуногенность и противоопухолевую активность синтезированных неоантигенных пептидов, сгруппировав их по 5–6 пептидов в модели вакцины, которыми двукратно иммунизировали мышью [6]. Вакцинация мышью группами синтетических неоантигенных пептидов в сочетании с адъювантом Poly(I:C) вызывала стимуляцию клеточного иммунного ответа, выражающуюся в увеличении количества продуцирующих интерферон γ (ИФН- γ) клеток селезенки. Противо-

опухолевый ответ вызывали, однако, не все группы пептидов [6]. Для оценки вклада каждого пептида в развитие эффектов было решено исследовать иммуногенность каждого из них.

Цель данного исследования — оценка индивидуальной иммуногенности синтетических неоантигенных пептидов для модели вакцины против меланомы B16-F10.

Материалы и методы

Исследована иммуногенность 32 пептидов длиной от 25 до 27 аминокислот, синтезированных по результатам биоинформатического анализа данных секвенирования мышью меланомы B16-F10 и нормальной ткани мышью C57Bl/6J (табл. 1). Рейтинг иммуногенности и противоопухолевой активности пептидов, аффинных к H2 (MHC), был спрогнозирован с использованием модели, основанной на искусственных нейронных сетях [5].

Пептиды растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) («ПанЭко», Россия) до концентрации 10 мг/мл и в физиологическом растворе — 1 доза содержала 100 мкг пептида в 300 мкл 10 % раствора ДМСО.

Исследование проводили на мышах-самцах линии C57Bl/6J с массой тела 20–22 г, полученных из экспериментально-биологической лаборатории (вивария) ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Мышей разделили на 34 группы, в каждой из которых было по 5 особей. В каждой группе мышью иммунизировали 1 из 32 пептидов (см. табл. 1) с адъювантом (Poly(I:C) (Sigma) — 50 мкг на мышью в 200 мкл физраствора). В 1 группе мышью иммунизировали только адъювантом Poly(I:C). Мышей контрольной группы не иммунизировали.

Исследуемые пептиды вводили подкожно в складку кожи на левом боку мышью по направлению к передней

Таблица 1. Исследуемые пептиды

Table 1. Investigated peptides

№ No	Название пептида Name of peptide	Ген Gene	Замена Replacement	Последовательность Sequence	Рейтинг Score
1	g.101573665C>G	<i>Krt75</i>	p.G56A	GRISGIGS_A_FGSRSLYNLGGTRRVSIG	2,09
2	g.105559136C>T	<i>Apbb1</i>	p.C654Y	ASLSEAVQAA_Y_MLRYQKCLDARSQTST	2,19
3	g.107599034A>C	<i>Sema3b</i>	p.L663V	LRRLVLHV_V_SAAQAERLARAEEAAAPA	0,00
4	g.108075690C>A	<i>Ampd2</i>	p.Q666H	LSENISHGLLLRKAPVL_H_YLYLAQIG	5,19
5	g.109894747T>G	<i>Dennd5a</i>	p.D1250A	PITAHMYE_A_VALIKDHTLVNSLRVLQ	13,86
6	g.110327865C>T	<i>Pole</i>	p.L1847F	TLHNMMKK_F_FLQLIAEFKRLGSSVYVA	3,58
7	g.126439132G>T	<i>Arsj</i>	p.R509M	FNITADPYERVDLSS_M_YPGIVKKLLRR	2,17
8	g.142664440A>G	<i>Wipi2</i>	p.T304A	PSQVTEMFNQGRAFA_A_VRLPFCGHKNI	1,30
9	g.145123749C>T	<i>Arpc1b</i>	p.S117F	WAPNENKFAVGSF_F_RVISICYFEQEND	6,57
10	g.153509426A>T	<i>St6galnac3</i>	p.D30E	LLLAMRLVN_E_ATFPLLLNCFGQPKTKW	1,34
11	g.190937554G>A	<i>Angel2</i>	p.D166N	RNVSTCEDREDKF_N_FSVMSYNILSQD	1,40
12	g.28894578A>C	<i>Actn4</i>	p.F855V	SGLVTFQAFID_V_MSRETTDTDTADQVI	6,59
13	g.29565843C>G	<i>Tnpo3</i>	p.G504A	VDRNPQFLDPVL_A_YLMKGLCEKPLASA	4,16
14	g.35197173T>G	<i>3110043O21Rik</i>	p.Q297H	VQGLLKDATGSFVLPFR_H_VMYAPYPTT	2,39
15	g.4007844T>G	<i>Mihfd1l</i>	p.F294V	WIPSGTTILNCFHD_V_LSGKLSGGSPGV	0,42
16	g.45553003G>T	<i>Poll</i>	p.H509N	ALLYFTGSA_N_FNRSMRALAKTKGMSLS	2,51
17	g.5098048A>C	<i>Atp6v1h</i>	p.K147T	VHMAARIA_T_LAAWGKELMEGSDLNYY	3,44
18	g.54847269G>T	<i>Enpp2</i>	p.P755Q	PEAKYDAFLVTNMV_Q_MYPAFKRVWTYF	8,09
19	g.56226589G>T	<i>Herc2</i>	p.C4450F	GGLAGPDGTKSVFGQM_F_AKMSSFSPDS	9,98
20	g.58476516A>C	<i>Orc2</i>	p.F278V	RVDQKTLHNLLRK_V_VPSFSAEIERLNQ	2,51
21	g.60246193G>T	<i>Gm4951</i>	p.D267Y	FMFSLPNIT_Y_SVIEKRNFLRWKTWLE	12,98
22	g.6393021C>G	<i>Sdcbp</i>	p.I219M	SSGHVGFIFKSGK_M_TSIVKDSSAARNG	49,72
23	g.64957410G>C	<i>Klhl28</i>	p.P110A	GTVFISQDTVESLL_A_AANLLQIKLVLK	5,23
24	g.65813948T>A	<i>Pbk</i>	p.V145D	GSPFPAAVILR_D_ALHMARGLKYLHQEK	3,09
25	g.66708664A>C	<i>Lins1</i>	p.K154T	MRMLQNSD_T_LLSHMAAKCLASLLYFQL	3,89
26	g.69027878G>A	<i>Smc4</i>	p.D767N	SGGSKVMRGRMGSSVI_N_EISVEEVNK	4,47
27	g.69615465A>T	<i>Nsun2</i>	p.K138M	AWHTNLSRKILR_M_SPLLAKFHQFLVSE	3,32
28	g.7163330C>T	<i>Pemtd1</i>	p.P222L	LAVSFAPLVQ_L_SKNDNGTPDSVGLPCC	4,88
29	g.77174891A>C	<i>2210408I21Rik</i>	p.D13A	DALQEYSHNSF_A_LQCLLSFPGDLEFK	4,44
30	g.81419559T>A	<i>Adgrv1</i>	p.Y5165F	KITTIP_F_TTEVFAPVTETVTVSAIP	1,17
31	g.93352588T>C	<i>Ppp1r7</i>	p.L170P	RNIEGIDKLTQLKK_P_FLVNNKINKIEN	0,00
32	GFSQPLRRL	<i>Sema3b</i>	L663V	GFSQPLRRLVLHVVSAAQAERLARAEE	NA

лапке. За 5–10 мин до введения пептида в то же место вводили подкожно Poly(I:C). Иммунизацию проводили 4-кратно с недельными интервалами, в 0, 7, 14 и 21-й дни. На 25-й день получали сыворотку и спленциты мышей.

Иммуногенность пептидов оценивали у иммунизированных мышей по увеличению количества ИФН- γ -продуцирующих клеток селезенки и по изменению уровня сывороточных цитокинов. Количество ИФН- γ -продуцирующих спленцитов определяли методом ELISpot с помощью набора для определения мышинового ИФН- γ (3321-2AW-Plus, Mabtech). Для этого спленциты инкубировали 48 ч с пептидами (20 мкг/лунку), которыми до этого иммунизировали мышей. В качестве положительного контроля стимуляции ИФН- γ использовали 50 мкг/лунку Poly(I:C). Для подтверждения специфичности клеточного иммунного ответа спленциты стимулировали пептидами, которые не использовали для иммунизации этой мыши.

Изменение уровней сывороточных цитокинов ИФН- γ , интерлейкинов (ИЛ) 2, 4 и 10, определяющих пути развития иммунного ответа Th1/Th2, оценивали методом ELISA с использованием набора для определения сывороточных цитокинов Mouse Th1/Th2 Uncoated ELISA (88-7711-44, Invitrogen, ThermoFisher Scientific). Чувствительность используемой тест-системы: ИФН- γ – 15 пг/мл, ИЛ-2 – 2 пг/мл, ИЛ-4 – 4 пг/мл, ИЛ-10 – 30 мг/мл.

Результаты экспериментов представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Статистическая обработка полученных данных была выполнена с помощью программы Statistica 2.0 с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В работе мы оценили влияние иммунизации пептидами на активацию Т-клеточного иммунитета – по изменению продукции ИФН- γ спленцитами мышей, а также на изменение уровня сывороточных цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2, -4, -10.

При анализе результатов ELISpot иммуногенность пептидов оценивали по количеству клеток, продуцирующих ИФН- γ (количеству точек в лунках): менее 30 точек считали отсутствием реактивности, от 30 до 50 точек – слабой иммуногенностью, от 50 до 200 – средней, от 200 и выше – сильной иммуногенностью [7].

В табл. 2 показано, что из 32 исследованных пептидов 19 обладали сильной иммуногенностью, 6 – средней иммуногенностью, у 7 пептидов иммуногенность отсутствовала. У 7 пептидов из 19 с сильной иммуногенностью и у 1 пептида из 6 со средней иммуногенностью наблюдали неспецифическую сти-

муляцию продукции ИФН- γ в спленцитах неиммунизированных животных.

В табл. 3 представлены результаты изменения уровня сывороточных цитокинов у иммунизированных мышей.

В контрольной группе и в группе, иммунизированной Poly(I:C), уровень всех сывороточных цитокинов был ниже уровня чувствительности тест-системы.

Выявлено, что 11 из исследуемых пептидов вызвали у иммунизированных ими групп мышей повышение уровня как ИФН- γ , так и ИЛ-4, что определяет развитие иммунного ответа в направлении клеточной и гуморальной защиты соответственно. Отдельно ИФН- γ был повышен только после иммунизации пептидом g.7163330C>T, а ИЛ-4 также только после иммунизации 1 пептидом – g.108075690C>A. Иммунизация пептидом g.45553003G>T вызывала повышение уровня всех 4 исследованных цитокинов. Изменений уровня секреции цитокинов ИЛ-2, ИЛ-10 после иммунизации всеми остальными пептидами не отмечено.

Следует отметить, что продукция ИФН- γ спленцитами была обнаружена при иммунизации 25 пептидами, а повышение цитокина ИФН- γ в сыворотке крови – при иммунизации 11 пептидами. Причем только 7 пептидов индуцировали продукцию ИФН- γ в спленцитах и повышение уровня этого цитокина в сыворотке крови одновременно.

Заключение

Успех противоопухолевой иммунотерапии часто зависит от критического баланса Т-хелперных иммунных ответов Th1 и Th2, управляемых антиген-презентирующими клетками. Путь развития иммунного ответа Th1 приводит к активации цитотоксических Т-лимфоцитов, уничтожающих опухолевые клетки. Также Th1-лимфоциты могут убивать опухолевые клетки, активируя цитокинами рецепторы смерти на поверхности опухолевых клеток. Th2-лимфоциты отвечают за развитие гуморального иммунного ответа [8].

Мы оценили иммуногенность 32 синтетических неантигенных пептидов, синтезированных для модели вакцины против мышинной меланомы B16-F10. Обнаружено, что 25 пептидов стимулировали продукцию ИФН- γ в спленцитах ранее иммунизированных животных, однако 8 из этих пептидов продемонстрировали неспецифическую стимуляцию продукции ИФН- γ у неиммунизированных мышей, возможно связанную с макрофагами селезенки. Для 11 пептидов показана стимуляция одновременно Th1 и Th2 путей развития иммунного ответа. Только 7 пептидов из 32 вызывали одновременно и увеличение продукции ИФН- γ в спленцитах, и увеличение уровня

Таблица 2. Влияние пептидов на продукцию интерферона γ (ИФН- γ) спленоцитами иммунизированных мышейTable 2. Effect of peptides on the production of interferon γ (IFN- γ) by splenocytes of immunized mice

№ No	Название пептида Name of peptide	Количество ИФН- γ -продуцирующих клеток из 1×10^{-5} спленоцитов Quantity of IFN- γ -producing cells from 1×10^{-5} splenocytes	
		Стимуляция клеток ранее иммунизированных мышей Cells stimulation of early immunized mice	Стимуляция клеток неиммунизированных мышей Cells stimulation of not immunized mice
1	g.101573665C>G	549 \pm 9*	89 \pm 13*
2	g.105559136C>T	352 \pm 17*	11 \pm 2
3	g.107599034A>C	220 \pm 15*	10 \pm 4
4	g.108075690C>A	4 \pm 1	2 \pm 1
5	g.109894747T>G	2 \pm 2	1 \pm 1*
6	g.110327865C>T	20 \pm 4	8 \pm 3
7	g.126439132G>T	373 \pm 17*	46 \pm 11*
8	g.142664440A>G	396 \pm 10*	90 \pm 15*
9	g.145123749C>T	29 \pm 3*	3 \pm 2
10	g.153509426A>T	204 \pm 17*	5 \pm 2
11	g.190937554G>A	158 \pm 20*	4 \pm 1
12	g.28894578A>C	51 \pm 1*	9 \pm 3
13	g.29565843C>G	434 \pm 3*	76 \pm 8*
14	g.35197173T>G	422 \pm 7*	65 \pm 12*
15	g.4007844T>G	197 \pm 12*	84 \pm 2*
16	g.45553003G>T	102 \pm 2*	8 \pm 3
17	g.5098048A>C	209 \pm 15*	6 \pm 2
18	g.54847269G>T	132 \pm 14*	6 \pm 2
19	g.56226589G>T	445 \pm 13*	1 \pm 1*
20	g.58476516A>C	19 \pm 8	8 \pm 4
21	g.60246193G>T	440 \pm 15*	14 \pm 6
22	g.6393021C>G	426 \pm 9*	4 \pm 2
23	g.64957410G>C	138 \pm 11*	5 \pm 1
24	g.65813948T>A	414 \pm 16*	13 \pm 2
25	g.66708664A>C	208 \pm 1*	53 \pm 11*
26	g.69027878G>A	5 \pm 1	3 \pm 1
27	g.69615465A>T	13 \pm 5	2 \pm 1
28	g.7163330C>T	338 \pm 7*	6 \pm 3
29	g.77174891A>C	247 \pm 15*	11 \pm 2
30	g.81419559T>A	372 \pm 16*	18 \pm 4
31	g.93352588T>C	366 \pm 12*	27 \pm 6*
32	GFSQPLRRL	442 \pm 17*	95 \pm 12*

*Достоверные отличия от контрольной группы ($p < 0,05$).*Significant difference from the control sample ($p < 0.05$).

Таблица 3. Влияние пептидов на уровень цитокинов в сыворотке крови иммунизированных мышей

Table 3. Effect of peptides on the level of cytokines in the blood serum of immunized mice

№ No	Название пептида Name of peptide	Уровень цитокинов, пг/мл Level of cytokines, pg/ml			
		Th1		Th2	
		ИФН- γ IFN- γ	ИЛ-2 IL-2	ИЛ-4 IL-4	ИЛ-10 IL-10
1	g.101573665C>G	<15	<2	<4	<30
2	g.105559136C>T	93,1 \pm 5,6	<2	61,9 \pm 3,7	<30
3	g.107599034A>C	<15	<2	<4	<30
4	g.108075690C>A	<15	<2	27,5 \pm 2,9	<30
5	g.109894747T>G	<15	<2	<4	<30
6	g.110327865C>T	131,9 \pm 3,9	<2	110,0 \pm 2,8	<30
7	g.126439132G>T	321,8 \pm 2,9	<2	212,3 \pm 4,5	<30
8	g.142664440A>G	<15	<2	<4	<30
9	g.145123749C>T	19,3 \pm 5,3	<2	10,9 \pm 1,8	<30
10	g.153509426A>T	<15	<2	<4	<30
11	g.190937554G>A	29,5 \pm 3,1	<2	23,1 \pm 3,6	<30
12	g.28894578A>C	<15	<2	<4	<30
13	g.29565843C>G	<15	<2	<4	<30
14	g.35197173T>G	<15	<2	<4	<30
15	g.4007844T>G	<15	<2	<4	<30
16	g.45553003G>T	32,4 \pm 3,8	2,9 \pm 0,1	8,5 \pm 1,9	114,8 \pm 4,2
17	g.5098048A>C	<15	<2	<4	<30
18	g.54847269G>T	<15	<2	<4	<30
19	g.56226589G>T	<15	<2	<4	<30
20	g.58476516A>C	16,4 \pm 1,8	<2	12,5 \pm 2,6	<30
21	g.60246193G>T	<15	<2	<4	<30
22	g.6393021C>G	<15	<2	<4	<30
23	g.64957410G>C	<15	<2	<4	<30
24	g.65813948T>A	<15	<2	<4	<30
25	g.66708664A>C	<15	<2	<4	<30
26	g.69027878G>A	1760,7 \pm 56,5	<2	660,4 \pm 13,7	<30
27	g.69615465A>T	664,0 \pm 28,2	<2	410,5 \pm 1,9	<30
28	g.7163330C>T	27,4 \pm 5,0	<2	<4	<30
29	g.77174891A>C	<15	<2	<4	<30
30	g.81419559T>A	662,4 \pm 17,8	<2	383,2 \pm 4,9	<30
31	g.93352588T>C	18,9 \pm 4,9	<2	17,7 \pm 1,9	<30
32	GFSQPLRRL	76,8 \pm 6,3	<2	70,5 \pm 7,1	<30

Примечание. ИФН- γ – интерферон γ ; ИЛ – интерлейкин.

Note. IFN- γ – interferon γ ; IL – interleukin.

этого цитокина в сыворотке крови иммунизированных мышей. Иммуногенность пептидов не коррелировала с рейтингом, полученным в результате биоинформатического анализа (см. табл. 1).

На следующем этапе работы необходимо оценить индивидуальный противоопухолевый эффект имму-

ногенных пептидов у мышей с меланомой B16-F10, поскольку ранее нами было показано, что при иммунизации мышей моделью вакцины, содержащей комбинацию пептидов, увеличение количества ИФН- γ -продуцирующих клеток всегда являлось показателем противоопухолевой эффективности [6].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышникова М.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. Неоантигены в иммунотерапии опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(2):6–14. [Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Neoantigens in tumor immunotherapy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(2): 6–14 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-6-14.
2. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. Nature 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991.
3. Keskin D.B., Anandappa A.J., Sun J. et al. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. Nature 2019;565(7738):234–9. DOI: 10.1038/s41586-018-0792-9.
4. Cafri G., Gartner J.J., Zaks T. et al. mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. J Clin Invest 2020;130(11):5976–88. DOI: 10.1172/JCI134915.
5. Косоруков В.С., Барышникова М.А., Кособокова Е.Н. и др. Выявление иммуногенных мутантных неоантигенов в геноме меланомы мышей. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(3):23–30. [Kosorukov V.S., Baryshnikova M.A., Kosobokova E.N. et al. Identification of immunogenic mutant neoantigens in the genome of murine melanoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(3):23–30 (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-3-23-30.
6. Барышникова М.А., Рудакова А.А., Соколова З.А. и др. Оценка противоопухолевой эффективности синтетических неоантигенных пептидов для модели противомеланомной вакцины. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(4):76–81. [Baryshnikova M.A., Rudakova A.A., Sokolova Z.A. et al. Evaluation of the antitumor efficacy of synthetic neoantigen peptides for the melanoma vaccine model. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(4):76–81. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-76-81.
7. Castle J.C., Kreiter S., Diekmann J. et al. Exploiting the Mutanome for Tumor Vaccination. Cancer Res 2012;75(5):1081–90. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3722.
8. Knutson K.L., Disis M.L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy Cancer Immunol Immunother 2005;54(8):721–8. DOI: 10.1007/s00262-004-0653-2.

Вклад авторов

А.А. Рудакова: концепция и дизайн, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи, редактирование статьи;

М.А. Барышникова: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;

З.А. Соколова, О.С. Бурова: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

Е.Н. Кособокова: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

В.С. Косоруков: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Author's contributions

A.A. Rudakova: concept and design, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation, editing of the article;

M.A. Baryshnikova: concept and design, data collection and processing, provision of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;

Z.A. Sokolova, O.S. Burova: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

E.N. Kosobokova: data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

V.S. Kosorukov: concept and design, data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article, approval of the final version.

ORCID авторов /ORCID of authors

А.А. Рудакова / A.A. Rudakova: <https://orcid.org/0000-0001-7266-7689>

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

З.А. Соколова / Z.A. Sokolova: <https://orcid.org/0000-0003-4755-5313>

О.С. Бурова / O.S. Burova: <https://orcid.org/0000-0001-8897-0172>

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

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

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа была выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № АААА-А20-120022090056-5.
Financing. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No AAA-A-20-120022090056-5.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Statement of the welfare of animals. The study was carried out 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: 02.04.2021. Принята к публикации: 16.04.2021.
Article submitted: 02.04.2021. Accepted for publication: 16.04.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-69-75>

Возможность применения магнитно-резонансной томографии в прижизненной верификации метастатического поражения легких мышей

А.В. Смирнова^{1,2}, П.О. Варакса¹, Ю.А. Финогенова¹, Ю.С. Лагодзинская¹, А.А. Липенгольц^{1,3,4}, М.А. Абакумов^{5,6}, Е.Ю. Григорьева¹

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

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

³ФГБУ «Государственный научный центр РФ – Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России; Россия, 123098 Москва, ул. Живописная, 46;

⁴ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

⁵ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

⁶ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4

Контакты: Анна Вячеславна Смирнова smirn-ova@mail.ru

Введение. Для доклинического изучения радиофармацевтических лекарственных препаратов существует необходимость разработки новых прижизненных методов диагностики метастатических поражений у мышей после перевивки опухолевых клеток. Было проведено исследование возможности оценки метастатических поражений легких мышей линии C57Bl/6 при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ).

Цель исследования – определить возможность использования МРТ для верификации отдаленных метастазов основного опухолевого узла меланомы B16-F10 с валидацией их наличия методом анатомического препарирования.

Материалы и методы. Метастатические поражения вызывали путем перевивки клеток мышинной меланомы B16-F10 в костномозговой канал большой берцовой кости. МРТ-исследования выполнены с использованием 7Т магнитно-резонансного томографа на 21-е сутки после трансплантации культуры клеток, получены изображения в аксиальной и коронарной плоскостях. Подтверждение обнаруженных при помощи МРТ метастазов осуществлялось методом анатомического препарирования и гистологической оценки тканей.

Результаты. Установлено, что метод МРТ позволяет определять очаговые поражения легких размером от 0,8 мм, более мелкие метастазы невозможно дифференцировать от артефактов сердцебиения. Гистологическая оценка тканей показала, что при макроскопическом патологоанатомическом исследовании отчетливо визуализируются очаги, расположенные субплеврально.

Выводы. Показана принципиальная возможность прижизненной верификации опухолевых метастазов в легких мыши методом МРТ: метастазы, сопоставимые по диаметру с размером крупных бронхов, могут быть определены как при инструментальном исследовании животного, так и после выведения его из эксперимента. Для метастазов, расположенных в толще органа, метод МРТ предпочтителен, так как при макроскопическом патологоанатомическом исследовании отчетливо визуализируются лишь субплеврально расположенные опухолевые очаги.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография, меланома, метастазы, радиофармацевтические лекарственные препараты

Для цитирования: Смирнова А.В., Варакса П.О., Финогенова Ю.А. и др. Возможность применения магнитно-резонансной томографии в прижизненной верификации метастатического поражения легких мышей. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):69–75. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-69-75.

Feasibility study of magnetic resonance imaging application in experimental radiology for intravital verification of lungs metastases in mice

Anna V. Smirnova^{1,2}, Pavel O. Varaksa¹, Yulia A. Finogenova¹, Yulia S. Lagodzinskaya¹, Alexey A. Lipengolts^{1,3,4}, Maxim A. Abakumov^{5,6}, Elena Yu. Grigorieva¹

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

²A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia;

³A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, FMBA of Russia; 46 Zhivopisnaya St., Moscow 123098, Russia;

⁴National Research Nuclear University MPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe Shosse, Moscow 115409, Russia;

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

⁶National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninskiy Ave., Moscow 119049, Russia

Contacts: Anna Vyacheslavna Smirnova smirn-ova@mail.ru

Background. For preclinical studies of radiopharmaceuticals there is a high need for development new methods of *in vivo* metastasis diagnosis in mice after tumor cells transplantation. The study was carried out to assess feasibility of lung metastasis diagnosis with magnetic resonance imaging (MRI) visualization in mice C57Bl6.

The aim of this study was to assess feasibility of MRI for verification of distant metastases of the solid B16-F10 melanoma with validation by anatomic dissection.

Methods. Metastatic lesions were caused by injection of B16-F10 murine melanoma cells into cavum medullare of the tibia. Imaging studies were performed on the 21st day after transplantation using 7T magnetic resonance tomograph, coronal and axial images were acquired. Validation of metastasis was made by anatomic dissection and histological examination.

Results. MRI method enables visualization of lung nodules with diameter at least 0.8 mm, because smaller nodules cannot be distinguished from heartbeat artifacts. Histological examination revealed that macroscopic anatomic dissection can precisely detect subpleural lung nodules.

Conclusion. This study demonstrated feasibility of *in vivo* lung metastasis verification with MRI method in mice: metastases comparable in diameter to the size of large bronchi can be detected by MRI as well as by *ex vivo* dissection. For centrally located lung metastasis MRI method is preferable because macroscopic dissection enables to visualize only nodules which are located subpleurally.

Key words: magnetic resonance imaging, melanoma, metastases, radiopharmaceutical drugs

For citation: Smirnova A.V., Varaksa P.O., Finogenova Yu.A. et al. Feasibility study of magnetic resonance imaging application in experimental radiology for intravital verification of lungs metastasis in mice. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2021;20(2):69–75. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-69-75.

Введение

Современные методы лечения пациентов со злокачественными новообразованиями включают как классическую химиотерапию, так и методы с использованием радиоактивных изотопов. Востребованность радиофармацевтических лекарственных препаратов (РФЛП) обуславливает необходимость разработки нормативно-правовой базы и научно-практического подхода к их доклиническим исследованиям. Обнаружение очагов вторичного роста (метастазов) является важной задачей для оценки специфической активности РФЛП *in vivo*. Наиболее часто для оценки антиметастатического действия РФЛП определяют количество и вес метастазов в легких. Используемый метод имеет низкую чувствительность и требует выведения большого количества животных из эксперимента. Таким образом, необходима прижизненная визуализация опухолевых очагов для определения

наличия, местоположения и оценки интенсивности роста метастазов у лабораторных животных при доклинических исследованиях антиметастатических РФЛП.

Для обнаружения метастазов в легких и иных органах лабораторных мышей *in vivo* могут быть использованы методы лучевой диагностики [1–4]. В данной работе для прижизненной визуализации была выбрана магнитно-резонансная томография (МРТ), так как этот метод обладает высокой тканевой контрастностью и позволяет оценить состояние всех внутренних органов, включая легкие [5–7], а также исследовать структуру первичного опухолевого узла [8]. Нами проведено исследование возможности оценки метастатических поражений легких мышей линии C57Bl/6 при помощи МРТ. Метастатические поражения вызывали путем перевивки клеток мышинной меланомы B16-F10 в костномозговой канал большой

берцовой кости [9]. Подтверждение обнаружения при помощи МРТ метастазов осуществляли методом анатомического препарирования с последующей гистологической оценкой тканей.

Цель данного исследования — определение возможности использования МРТ для верификации отдаленных метастазов от основного опухолевого узла меланомы B16-F10 с одновременной их валидацией методом анатомического препарирования.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Животных содержали в виварии лаборатории радионуклидных и лучевых технологий в экспериментальной онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в течение всего времени эксперимента. Для проведения исследований использовали мышей-самцов линии C57Bl/6 массой $24,5 \pm 0,5$ г, полученных из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все работы с животными проведены в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123), и одобрены комиссией по биоэтике ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Клеточная линия. Для формирования опухоли использовали культуру клеток меланомы мышей B16-F10 (ATCC® CRL6475™) 2-го культурального пассажа, полученную из криохранилища ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Перед введением животным культуру выводили из криоконсервации стандартными методами. Подготовку клеточной линии к перевивке проводили за 30 мин до введения опухолевого материала в костно-мозговой канал большеберцовой кости левой тазовой конечности мыши. Для этого монослой разрушали раствором Версена по стандартной методике, отмывали в фосфатно-солевом буфере без содержания кальция и магния, после чего осадок ресуспендировали в 1 мл указанного раствора и проводили подсчет клеток в камере Горяева. В эксперимент брали взвесь клеток с индексом витальности не менее 90 %, что гарантировало качество дальнейшей перевивки в костно-мозговой канал при малом объеме вводимой суспензии клеток (25 мкл). Клетки ресуспендировали в 30 % растворе Матригеля. Пробирку помещали на холодную подложку (+5 °C) для дальнейшего отбора суспензии в индивидуальные шприцы для перевивки.

Формирование опухолевого узла при внутрикостном введении клеток меланомы B16-F10 мышам. До начала манипуляций животным проводили депиляцию. За 15 мин до начала операции животных помещали в камеру с парами эфира, наступление наркоза определяли по утрате рефлексов задних конечностей. Затем тазовую конечность фиксировали, в прокси-

мальный эпифиз большой берцовой кости вводили суспензию клеток меланомы в количестве 2500 клеток в 25 мкл. После операции животных помещали на грелку +37 °C до пробуждения. Наблюдение, включавшее общий ветеринарный осмотр и оценку двигательной активности, регистрацию массы тела животных и размера опухолевого узла, проводили в течение всего срока начиная со 2-х суток после операции и до момента выведения животных из эксперимента.

Магнитно-резонансная томография. МРТ-исследования выполнены на базе кафедры медицинских нанобиотехнологий ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. МРТ мышей ($n = 5$) проводили с использованием 7Т магнитно-резонансного томографа (ClinScan, Bruker). Сканирование мышей проводили под общей анестезией 2,5 % воздушно-изофлюорановой смесью. По отдельности исследовали 3 анатомические области [10]: голову, краниальную часть туловища (грудную клетку, печень и грудные конечности) и каудальную часть туловища (тазовую конечность с перевитой опухолью, органы тазовой полости, кишечник, почки). Для каждой области получены T2-взвешенные изображения (T2-ВИ) в 2 плоскостях: аксиальной и коронарной. Контрастное усиление не применяли. Исследование проведено при синхронизации с дыханием. Полученные данные МРТ верифицировали путем патологоанатомического исследования животных ($n = 5$), выведенных из эксперимента.

Морфологическая оценка изменений ткани легкого. Вскрытие животного проводили классическим методом по Абрикосову. После эвисцерации определяли плавучесть легких (проба Галена), проводили их взвешивание и визуальный осмотр, при котором определяли наличие явных пигментированных очагов роста меланомы (отметка «метастазы»). Для изучения гистологических изменений после некропсии проводили отбор образцов тканей легкого с дальнейшим гистологическим исследованием. Для этого ткань фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, дальнейшую обработку проводили классическими методами [11], а срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Результаты

На томограммах мышей в области левой тазовой конечности визуализировалась опухоль, представлявшая собой образование негетерогенной структуры, с крупнобугристым внешним контуром, состоявшее из 2–3 частично сливающихся узлов. Размеры опухоли варьировали у разных животных в пределах от $11 \times 12 \times 14$ мм до $27 \times 15 \times 14$ мм. Точное расположение опухоли также различалось: у 1 мыши опухоль развивалась преимущественно вдоль костей голени,

у 2 занимала практически всю конечность, от тазобедренного до заплюсневого сустава. У остальных мышцей опухоль распространялась вдоль бедренной кости, проксимальная граница опухолевого узла находилась на уровне тазобедренного сустава. Во всех случаях проксимально расположенной опухоли МРТ позволила исключить инвазию опухоли в органы тазовой полости (рис. 1). В 1 случае в структуре опухолевого узла выявили обширный участок некроза, в то время как у других особей область некроза была минимальной (см. рис. 1).

У всех животных отмечали увеличение регионарных лимфатических центров, которые были представлены лимфатическим узлом коленной складки (паховым), причем как на пораженной конечности, так и контралатерально ей (см. рис. 1). Кроме того, у всех животных отмечалось увеличение подмышечных лимфатических узлов (рис. 2).

При МРТ-исследовании области головы мышцей (вся номенклатура дана по [10]) ни у одной из особей метастазов в головной мозг обнаружено не было. При вскрытии черепной коробки метастатических поражений также не отмечали.

Метастатическое поражение легких при МРТ-исследовании было обнаружено не у всех мышцей: возникла проблема артефактов, связанных с сердцебиением (рис. 3), «симулирующих» диффузное уплотнение легочной ткани, а также линейные и очаговые уплотнения. Метастазы представляли собой очаги округлой или неправильной формы с четкими контурами,

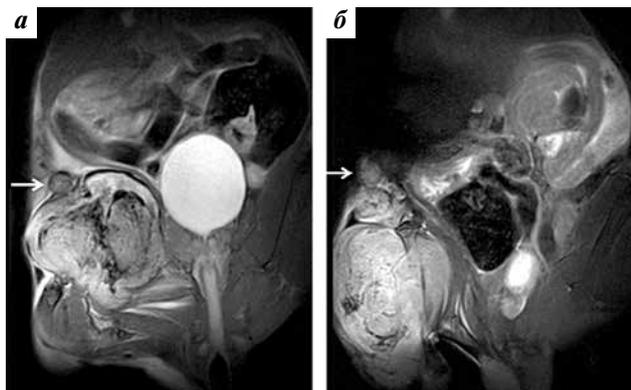


Рис. 1. Магнитно-резонансная томограмма каудальной части туловища мышцей, коронарная проекция, T2-ВИ. Стрелками указаны увеличенные лимфатические узлы коленной складки (паховые): а – опухолевый узел расположен преимущественно в области бедра, проксимальная граница на уровне тазобедренного сустава; гипointенсивный участок в опухоли соответствует зоне некроза; мочевого пузыря имеет ровные четкие контуры; б – опухолевый узел расположен преимущественно вдоль костей голени, зона некроза минимальна

Fig. 1. Magnetic resonance imaging of the caudal part of mouse body, coronal view, T2-weighted images. The arrows represent enlarged inguinal lymph nodes: a – the tumor is located in the femoral region, proximal margin is at the level of femoral joint; hypointense portion corresponds to necrotic zone; the urinary bladder is not involved; б – the tumor is located along the lower leg, necrotic zone is minimal

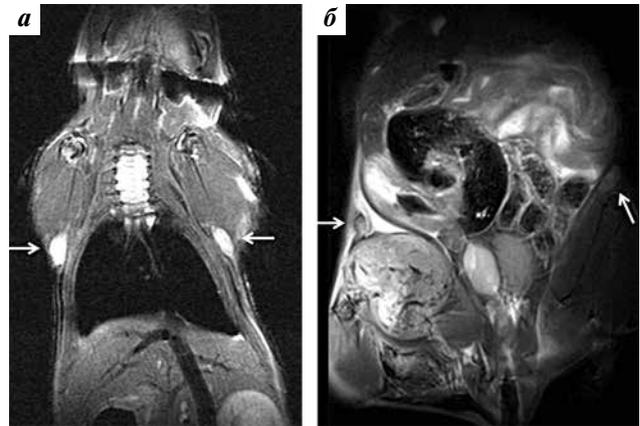


Рис. 2. Магнитно-резонансная томограмма краниальной (а) и каудальной (б) части туловища мышцей, коронарная проекция, T2-ВИ. Стрелками указаны увеличенные лимфатические узлы

Fig. 2. Magnetic resonance imaging of the cranial (a) and caudal (б) part of mouse body, coronal view, T2-weighted images. The arrows represent enlarged lymph nodes

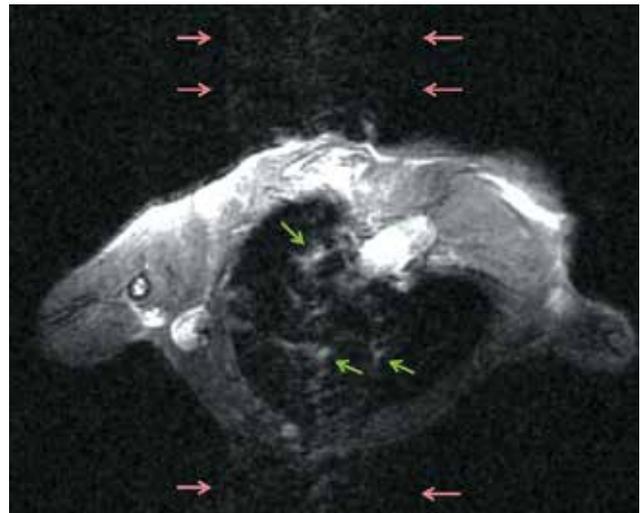


Рис. 3. Магнитно-резонансная томограмма краниальной части туловища мышцей, аксиальная проекция, T2-ВИ. Зелеными стрелками указаны очаги, которые необходимо дифференцировать между метастатическим поражением легкого и артефактом сердцебиения. Красными стрелками указана граница артефакта сердцебиения

Fig. 3. Magnetic resonance imaging of the cranial part of mouse body, axial view, T2-weighted images. The green arrows represent foci that must be differentiated between metastasis and cardiac motion artifacts. The red arrows represent edges of cardiac artifact

размером от 0,8 до 1,3 мм (рис. 4, 5). Однако очаги размером менее 0,7 мм было невозможно достоверно дифференцировать между метастазами и артефактами сердцебиения. Данные, полученные в процессе МРТ, сравнили с результатами патологоанатомических исследований. Установлено, что у животных в подкрыльцовой области и области коленной складки лимфатические узлы находились в состоянии реактивного воспаления с видимым процессом метастазирования, визуально лимфатические узлы были

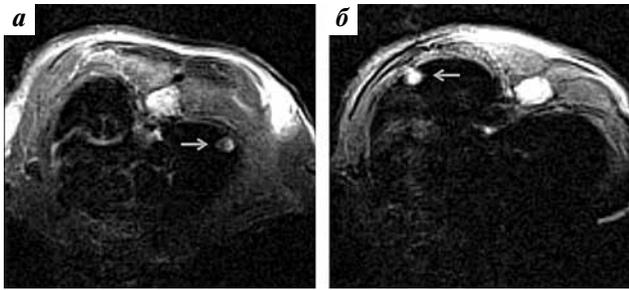


Рис. 4. Магнитно-резонансные томограммы краниальной части туловища 2 разных мышей (а, б), аксиальная проекция, T2-ВИ. Стрелками указаны метастатические очаги

Fig. 4. Magnetic resonance imaging of the cranial part of mouse body (different mice (a, б)), axial view, T2-weighted images. The arrows represent metastatic lesions

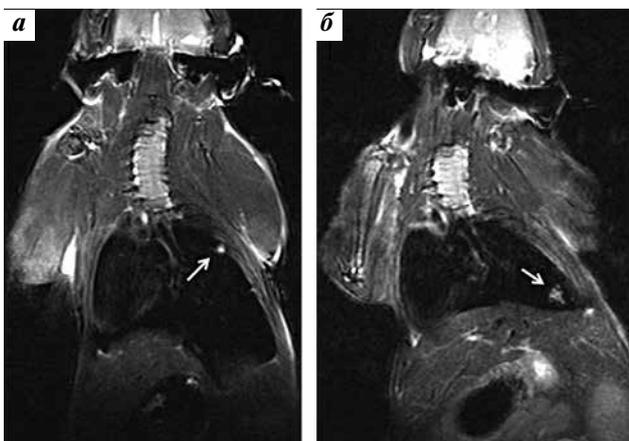


Рис. 5. Магнитно-резонансные томограммы краниальной части туловища 2 разных мышей (а, б), коронарная проекция, T2-ВИ. Стрелками указаны метастатические очаги

Fig. 5. Magnetic resonance imaging of the cranial part of mouse body (different mice (a, б)), coronal view, T2-weighted images. The arrows represent metastatic lesions

увеличены вдвое и имели окраску от темно-серого до черного цвета (рис. 6).

При выполнении макроскопического исследования органов грудной полости обнаружены множественные метастазы в легочной ткани, располагающиеся под висцеральным листом плевры, а также в толще паренхимы органа, что согласуется с микроскопическими данными (рис. 7, 8) и данными, полученными при проведении МРТ (см. рис. 5).

Обсуждение

Проведенное исследование показало возможное использование метода МРТ для определения метастазов, развивающихся в ткани легкого мыши после перевивки опухолевых клеток меланомы в костномозговой канал большой берцовой кости. Сравнение результатов МРТ и картины вскрытия показало, что метастатические поражения, расположенные преимущественно под плеврой, могут быть определены

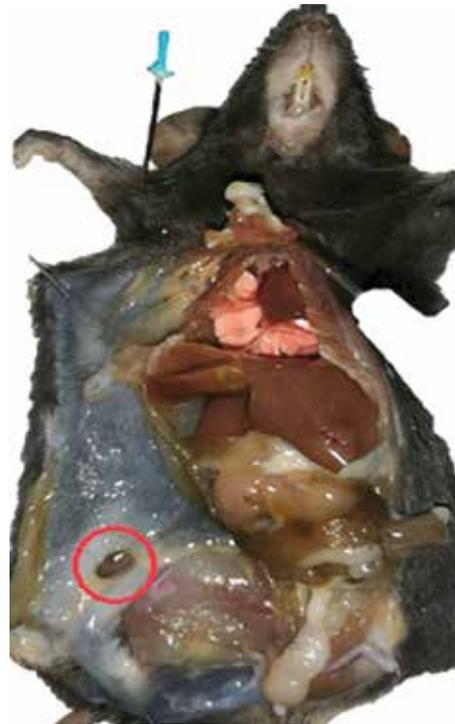


Рис. 6. Макропрепарат. Характерные изменения в организме мыши линии C57Bl/6 после перевивки клеток меланомы. Красной линией обведен лимфатический узел коленной складки, находящийся в состоянии тотального замещения клетками опухоли

Fig. 6. Autopsied specimen. Characteristic changes in the organism of the C57Bl/6 mouse after melanoma cells inoculation. The lymph node of the knee fold, which completely replaced by tumor cells is marked with the red circle



Рис. 7. Макропрепарат. Очаги поражения легкого. Визуализируются метастатические узлы меланомы B16-F10

Fig. 7. Autopsied specimen. Foci of lung damage. B16-F10 melanoma metastatic nodes can be clearly seen

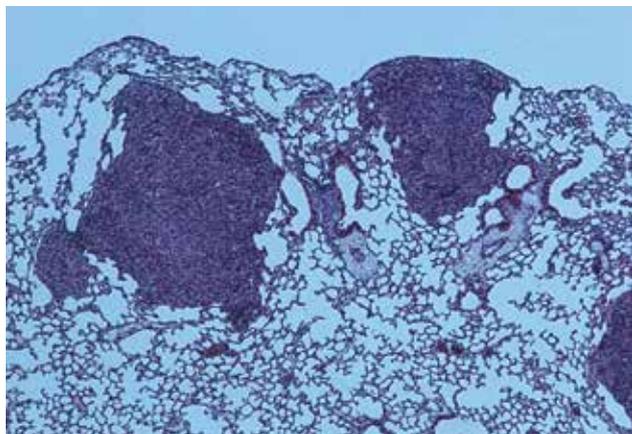


Рис. 8. Гистологическое исследование метастатического узла меланомы, лежащего под висцеральным листком плевры. Межалвеолярные перегородки полнокровны. Респираторный эпителий отечный. Окраска гематоксилином и эозином. $\times 10$

Fig. 8. Histological examination of the melanoma metastatic node situated under the visceral pleura. The interalveolar septum is full-blooded. Edematous respiratory epithelium. Hematoxylin and eosin staining. $\times 10$

при инструментальном (МРТ) исследовании животного. Однако результаты морфологической оценки, сопоставленные с данными МРТ-исследования, дали возможность уточнить ограничения данного метода. МРТ позволяет определить крупные образования, находящиеся на поверхности органа и в его толще, но более мелкие очаги при этом исследовании не распознаются. Несмотря на то что МРТ не может полностью заменить метод патологоанатомической

оценки с последующей микроскопией образцов тканей легкого, она позволяет следить за состоянием животного в течение эксперимента, определять степень и динамику опухолевой прогрессии или регрессии, а также проводить своевременную коррекцию экспериментального исследования. Таким образом, использованный в данной работе методологический подход имеет практическую значимость благодаря сохранению оптимального количества экспериментальных животных.

Заключение

Проведено сравнение результатов визуализации метастатического поражения легких методами МРТ и классической патологоанатомической оценки после перевивки мышам C57Bl/6 клеток меланомы V16-F10 путем введения их в костномозговой канал большой берцовой кости. Установлено, что метод МРТ с дыхательной синхронизацией позволяет определять очаговые поражения легких размером от 0,8 мм. Детектировать более мелкие метастазы (менее 0,7 мм) оказалось технически сложно ввиду необходимости дифференцировать очаговые поражения от артефактов сердцебиения. Тем не менее метод МРТ предпочтителен для определения метастазов, расположенных в толще органа, так как при макроскопическом патологоанатомическом исследовании отчетливо визуализируются лишь опухолевые очаги, расположенные субплеврально, что подтверждается дальнейшей морфологической оценкой тканей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rizzo L., Rijcken C., Pola R. et al. Multimodal imaging of breast cancer metastasis targeting and antimetastatic nanotherapy. *Mol Imaging Biol* 2016;18(Suppl 1):675–6.
- Marien E., Hillen A., Swinnen J.V., Vande Velde G. The value of micro-CT to monitor lung metastasis in an immune-competent mouse cancer model. *Bruker microCT user meeting Proceedings* 2016;12:37–40.
- Tatum J.L., Kalen J.D., Jacobs P.M. et al. A spontaneously metastatic model of bladder cancer: imaging characterization. *Transl Med* 2019;17(1):425. DOI: 10.1186/s12967-019-02177-y.
- Kertész I., Vida A., Nagy G. et al. *In vivo* imaging of experimental melanoma tumors using the novel radiotracer ^{68}Ga -NODAGA-Procaïnamide (PCA). *J Cancer* 2017;8(5):774–85. DOI: 10.7150/jca.17550.
- Al Faraj A., Shaik A.S., Halwani R., Alfuraih A. Magnetic targeting and delivery of drug-loaded SWCNTs theranostic nanoprobe to lung metastasis in breast cancer animal model: noninvasive monitoring using magnetic resonance imaging. *Mol Imaging Biol* 2016;18(3): 315–24. DOI: 10.1007/s11307-015-0902-0.
- Numata T., Kiryu S., Maeda T. et al. A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging. *Exp Dermatol* 2017;26(7): 619–21. DOI: 10.1111/exd.13327.
- Wang F., Akashi K., Murakami Y. et al. Detection of lung tumors in mice using a 1-Tesla compact magnetic resonance imaging system. *PLoS One* 2014;9(4):e94945. DOI: 10.1371/journal.pone.0094945.
- Blocher S.J., Mowery Y.M., Holbrook M.D. et al. Bridging the translational gap: implementation of multimodal small animal imaging strategies for tumor burden assessment in a co-clinical trial. *PLoS One* 2019;14(4):e0207555. DOI: 10.1371/journal.pone.0207555.
- Park S.I., Kim S.J., McCauley L.K., Gallick G.E. Pre-clinical mouse models of human prostate cancer and their utility in drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol* 2010;51:14.15.1–14.15.27. DOI: 10.1002/0471141755.ph1415s51.
- Зеленевский Н.В. Международная ветеринарная анатомическая номенклатура на латинском и русском языках. *Nomina Anatomica Veterinaria*. 5-я редакция. СПб: Лань, 2013. 399 с. [Zelenevskiy N.V. International Veterinary Anatomical Nomenclature in Latin and Russian. *Nomina Anatomica Veterinaria*. 5th edn. Saint-Petersburg: Lan, 2013. 399 p. (In Russ.)].
- Варакса П.О., Дьяченко И.А., Калабина Е.А., Стаффорд В.В. Методы подготовки биологического материала для гистологического исследования. Учеб. пособие. Под ред. П.О. Варакса. М.: Изд-во ФГОБУ ДПО РАКО АПК, 2020. 140 с. [Varaksa P.O., Dyachenko I.A., Kalabina E.A., Stafford V.V. Methods of preparation of biological material for histological research. Textbook. Ed by P.O. Varaksa. Moscow: Publisher FSBEI of APE RAPS AIC, 2020. 140 p. (In Russ.)].

Вклад авторов

А.В. Смирнова: концепция и дизайн, предоставление материалов исследования и интерпретация данных, подготовка рукописи, редактирование статьи;

П.О. Варакса: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, подготовка рукописи;

Ю.А. Финогонова, Ю.С. Лагодзинская: предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

А.А. Липенгольц: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи;

М.А. Абакумов: сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных;

Е.Ю. Григорьева: концепция и дизайн, сбор и обработка данных, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Author's contributions

A.V. Smirnova: concept and design, provision of study materials, data interpretation, article preparation, editing of the article;

P.O. Varaksa: concept and design, data collection and processing of study materials, data analysis and interpretation, article preparation;

Yu.A. Finogenova, Yu.S. Lagodzinskaya: provision of study materials, data analysis and interpretation, editing of the article;

A.A. Lipengolts: data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article;

M.A. Abakumov: data collection and processing, data analysis and interpretation;

E.Yu. Grigorieva: concept and design, data collection and processing, data analysis and interpretation, editing of the article, approval of the final version.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Смирнова / A.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0003-0386-9732>

П.О. Варакса / P.O. Varaksa: <https://orcid.org/0000-0003-0106-8384>

Ю.А. Финогонова / Yu.A. Finogenova: <https://orcid.org/0000-0002-5144-1039>

Ю.С. Лагодзинская / Yu.S. Lagodzinskaya: <https://orcid.org/0000-0001-6260-0763>

А.А. Липенгольц / A.A. Lipengolts: <https://orcid.org/0000-0002-5631-9016>

М.А. Абакумов / M.A. Abakumov: <https://orcid.org/0000-0003-2622-9201>

Е.Ю. Григорьева / E.Yu. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0001-7726-7991>

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-А19-119020190034-2 «Разработка нового класса полимерных наноконструкций на основе полиаминных дендримеров, дизайн и оптимизация химико-технологических аспектов для их применения в лучевой диагностике и терапии онкологических заболеваний».

Financing. The work was carried out within the framework of the state assignment No АААА-А19-119020190034-2 “Development of new class of polymeric nanoconstructions on the base of polyamine dendrimers, design and optimization of chemical-technological aspect of their use in radiation diagnostics and therapy of cancer diseases”.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей, и одобрено комиссией по биоэтике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, and approved by the bioethics commission of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 08.06.2020. Принята к публикации: 16.04.2021.

Article submitted: 08.06.2020. Accepted for publication: 16.04.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-2-76-84>

Влияние мультиосевой деформации на динамику биодеградации сплава WE43 и колонизацию клетками

Н.С. Мартыненко¹, Н.Ю. Анисимова², К.М. Новрузов², С.В. Добаткин¹,
М.В. Киселевский², Ю.З. Эстрин^{3,4}

¹Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН; Россия, 119334 Москва, Ленинский пр-т, 49;

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

³Университет им. Монаша, Департамент материаловедения и инжиниринга; Австралия, 3800 Викториа, Клейтон, Веллингтон-Роуд;

⁴Университет Западной Австралии, Департамент машиностроения; Австралия, 6009 Западная Австралия, Перт, Стерлинг шоссе, 35

Контакты: Наталья Сергеевна Мартыненко nataliasmartynenko@gmail.com

Введение. Разработка материалов для создания биорезорбируемых имплантатов – актуальный вопрос медицины и материаловедения. Перспективными материалами для данной цели являются магниевые сплавы, в частности сплав WE43 (Mg-Y-Nd-Zr), хорошо зарекомендовавший себя в этой области. Однако применение магниевых сплавов ограничено высокой скоростью деградации, которая часто сопровождается неравномерностью коррозии, что негативно сказывается на несущей способности изделия. Кроме того, повышенная скорость деградации может серьезно ухудшать биосовместимость магниевых сплавов. Поэтому изучение коррозионной стойкости магниевых сплавов, а также их биосовместимости является актуальной задачей.

Цель исследования – изучить влияние мультиосевой деформации (МОД), направленной на повышение механических характеристик сплава WE43, на кинетику его биодеградации, а также на колонизацию клетками.

Материалы и методы. В работе был исследован сплав WE43 в 2 состояниях: гомогенизированном (WE43 hom) и упрочненном методом МОД (WE43 MAD). Кинетику биодеградации исследовали на анализаторе xCELLigence RTCA Systems. Для исследования газообразования был применен метод оценки объема водорода, который определяли с помощью автоматизированного цифрового микроскопа Lionheart™ FX. Коррозионной средой выступал раствор на основе Dulbecco's Modified Eagle's Medium. Для изучения колонизации поверхности сплава клетками использовали культуру мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток.

Результаты. МОД сплава WE43 приводит к снижению скорости биодеградации и интенсивности газообразования. Период стабилизации биодеградации для сплава после МОД составляет 16 ч против 3 ч для сплава после гомогенизации. При этом объем выделившегося водорода составил $65,0 \pm 4,4$ мм³ H₂/мм³ сплава и $211,0 \pm 21,1$ мм³ H₂/мм³ сплава для материала после МОД и гомогенизации соответственно. МОД улучшает биосовместимость сплава WE43, стимулируя колонизацию мезенхимальными мультипотентными стромальными клетками.

Заключение. МОД уменьшает биодеградацию и улучшает биосовместимость сплава WE43, что делает его перспективным медицинским материалом, в том числе для целей онкоортопедии.

Ключевые слова: магниевые сплавы, мультиосевая деформация, биорезорбируемые имплантаты, биодеградация, колонизация

Для цитирования: Мартыненко Н.С., Анисимова Н.Ю., Новрузов К.М. и др. Влияние мультиосевой деформации на динамику биодеградации сплава WE43 и колонизацию клетками. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(2):76–84. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-76-84.

The effect of multiaxial deformation on the dynamics of biodegradation and cell colonization of alloy WE43

Natalia S. Martynenko¹, Natalia Yu. Anisimova², Keryam M. Novruzov², Sergey V. Dobatkin¹,
Mikhail V. Kiselevskiy², Yuri Z. Estrin^{4,5}

¹A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences; 49 Leninsky Ave., Moscow 119334, Russia;

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

³Monash University, Department of Materials Science and Engineering; Wellington Road, Clayton, Victoria 3800, Australia;

⁴University of Western Australia, Department of Mechanical Engineering; 35 Stirling Highway, Perth, Western Australia 6009, Australia

Contacts: Natalia Sergeevna Martynenko nataliasmartynenko@gmail.com

Introduction. The development of materials for bioresorbable implants is an urgent issue in medicine and materials science. Magnesium alloys are promising materials for this purpose. In particular, alloy WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) has proven itself well in this field. However, the use of magnesium alloys is limited by a high degradation rate, which is often accompanied with nonuniform corrosion, which negatively affects the load bearing capacity of the product. In addition, the increased degradation rate usually seriously worsens the biocompatibility of magnesium alloys. Therefore, the study of the corrosion resistance of magnesium alloys, as well as their biocompatibility, is an urgent task.

Purpose of the study was to investigate the effect of multiaxial deformation (MAD), aimed at increasing the mechanical characteristics of the alloy WE43, on its biodegradation kinetics, as well as on cell colonization.

Materials and methods. The alloy WE43 in two states – homogenized (WE43 hom) and strengthened by MAD (WE43 MAD) was investigated in this work. The kinetics of biodegradation was investigated on an xCELLigence RTCA Systems analyzer. A method for estimating the volume of hydrogen was used to study the process of gas formation, which was recorded using an automated digital microscope Lionheart™ FX. The corrosive medium was a solution based on Dulbecco's Modified Eagle's Medium. A culture of mesenchymal multipotent stromal cells was used to study the colonization of the alloy surface by cells.

Results. MAD of the alloy WE43 leads to a decrease in the biodegradation rate and the intensity of gas formation. The period of stabilization of biodegradation for the alloy after the MAD is 16 hours versus 3 hours for the alloy after homogenization. In this case, the volume of released hydrogen was $65.0 \pm 4.4 \text{ mm}^3 \text{ H}_2/\text{mm}^3 \text{ alloy}$ and $211.0 \pm \pm 21.1 \text{ mm}^3 \text{ H}_2/\text{mm}^3 \text{ alloy}$ for the alloy after MAD and homogenization, respectively. MAD improves the biocompatibility of the alloy WE43, stimulating the colonization of mesenchymal multipotent stromal cells.

Conclusion. MAD reduces biodegradation and improves the biocompatibility of the alloy WE43, which makes it a promising medical material, including for the purposes of oncoorthopedics.

Key words: magnesium alloys, multiaxial deformation, bioresorbable implants, biodegradation, colonization

For citation: Martynenko N.S., Anisimova N.Yu., Novruzov K.M. et al. The effect of multiaxial deformation on the dynamics of biodegradation and cell colonization of alloy WE43. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(2):76–84. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-76-84.

Введение

Расширение спектра медицинских изделий для ортопедии остается одной из наиболее актуальных задач современной медицины. Особый интерес представляют разработки биодеградируемых металлоконструкций для остеосинтеза и возмещения расширенных сегментарных дефектов. Применение биодеградируемых материалов позволит снизить необходимость проведения повторных операций с целью удаления имплантата или крепежных элементов после окончания восстановительного периода. В качестве основы подобных разработок было предложено использование магниевых сплавов, таких как AZ31 [1, 2], AZ91 [3, 4] и WE43 [4–6]. WE43 уже нашел применение в клинической практике для изготовления стентов и крепежных элементов для остеосинтеза [7–11]. Подобный выбор объясняется сходством механических свойств сплавов магния и костной ткани человека [12], а также его способностью к биодеградации при контакте с биоактивными средами как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* [12]. Результаты опубликованных ранее исследований свидетельствуют о том, что магниевые сплавы стимулируют адгезию

и поверхностную пролиферацию клеток различного генеза [13, 14], что должно способствовать ускоренной интеграции медицинского изделия в окружающие ткани, а в перспективе – замещению его объема собственными тканями. Однако следует учитывать риск негативного воздействия скопления водорода в периимплантационной области вследствие быстрой биодеградации магниевых сплавов при контакте с тканями реконструированного органа в условиях внутренней среды организма пациента. Осложненное таким образом течение постоперационного периода может оказать отрицательное влияние на функционирование возмещаемого органа и спровоцировать каскад вторичных осложнений хирургической операции из-за нарастания внутритканевого давления и изменения pH – гемолиз, остеолитический процесс, несостоятельность остеосинтеза, расхождение кожных краев раны и появление болевого синдрома [12]. Учитывая риск развития описанных последствий, поиск методов обработки медицинских магниевых сплавов для модулирования кинетики их биодеградации является актуальной междисциплинарной задачей современной науки. Ранее нами было показано, что дополнительная

механическая обработка сплавов способна корректировать их механические свойства, а также скорость биодegradации, что в ряде случаев обуславливает изменение параметров биологической активности материала. В частности, известно, что обработка гомогенизированных магниевых сплавов методом мультиосевой деформации (МОД) [15] способна изменить их структуру за счет измельчения зерна вплоть до ультрамелкозернистого (УМЗ) состояния [16].

С учетом вышеизложенного **цель** настоящего **исследования** заключалась в оценке влияния обработки сплава методом МОД на механические свойства, кинетику биодegradации сплава, а также на колонизацию клетками его поверхности. Предполагалось, что это позволит оценить перспективы применения данного способа механической обработки сплава WE43 для разработки медицинских ортопедических изделий на его основе.

Материалы и методы

Образцы сплавов. В качестве объектов исследования использовали образцы сплава WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) без деформационной обработки, т. е. в исходном гомогенизированном состоянии (WE43 hom), и в УМЗ-состоянии после обработки методом МОД (WE43 MAD), или изотермическойковки, который предполагает многократное повторение процессов осадки, кантовки и протяжки. Детали обработки, применяемой для улучшения прочностных характеристик сплава за счет достижения УМЗ-структуры, более подробно описаны в работе N. Martynenko и соавт. [17].

Материалы были изготовлены и охарактеризованы в Национальном исследовательском технологическом университете «МИСиС». Для проведения исследований были изготовлены Т-образные образцы высотой 1 см (рис. 1) на основе WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) в исходном гомогенизированном состоянии и после обработки МОД. Для каждого исследования использовали по 3 образца изучаемого сплава. Перед началом исследований образцы были простерилизованы погружением в 60 % этанол на 1 ч. Затем образцы высушивали в стерильных условиях.

Исследование биодegradации. Для исследования биодegradации применили 2 методических подхода, позволяющих оценить деструкцию образцов сплавов и газообразование, сопровождавшее этот процесс.

Для изучения кинетики деструкции использовали анализатор xCELLigence RTCA Systems (ACEA Biosciences Inc., США) и специальные 16-луночные планшеты E-plate 16 (ACEA Biosciences Inc., США). Данный подход позволяет в режиме реального времени с помощью биосенсора дна каждой лунки регистрировать изменение электрического сопротивления (ΔI , от англ. impedance) из-за накопления продуктов

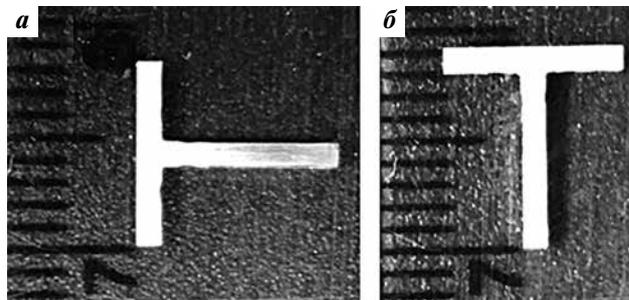


Рис. 1. Размеры образцов на основе WE43 (Mg-Y-Nd-Zr), подготовленных для проведения исследования: а – ширина; б – высота

Fig. 1. The sizes of samples based on WE43 (Mg-Y-Nd-Zr) used in this study: a – width; б – height

деструкции образца в сравнении с базовой линией сопротивления питательной среды. В соответствии с инструкцией производителя во все лунки планшета вносили по 50 мкл питательной среды на основе Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich, США), дополненной 10 % сыворотки крови эмбриона теленка (HyClone, Thermo Fisher, Великобритания), 146 мг L-глутамин («ПанЭко», Россия) и 1 % пенициллина/стрептомицина («ПанЭко», Россия), и прописывали единую базовую линию сигнала. Затем в лунки добавляли по 100 мкл питательной среды, вставляли вкладыши для планшетов Cell Crown 96 (Scaffdex, Финляндия), в которых вертикально размещали исследуемые образцы сплавов таким образом, чтобы они, будучи погружены в питательную среду, не касались дна. Таким образом, примененный подход позволяет оценить степень накопления в среде инкубации продуктов деструкции сплава посредством регистрации разницы сигнала ΔI , зафиксированного в лунке с образцом, в сравнении с лункой, заполненной только средой (контроль). Расчет производили по формуле, приведенной в инструкции производителя:

$$\Delta I = (Z_1 - Z_0) / 15\zeta,$$

где Z_1 – комплексное электрическое сопротивление в лунке в конкретный момент эксперимента; Z_0 – комплексное электрическое сопротивление в лунке в начале эксперимента (единая базовая линия сигнала); ζ – удельная проводимость в лунке E-plate.

Инкубацию образцов сплавов проводили в дуплетах в атмосфере 5 % углекислого газа при 37 °C в течение 36 ч. Добавление свежей порции питательной среды во все лунки производили однократно через 21 ч после начала инкубации. Для исследования газообразования, сопровождающего биодеструкцию магниевых сплавов в процессе инкубации образцов в питательной среде на основе DMEM, описанной выше, был применен метод оценки объема водорода, определенного с помощью автоматизированного

цифрового микроскопа Lionheart™ FX (BioTek Instruments, США). С этой целью образцы сплавов по 1 помещали в лунки 24-луночного планшета (Nunc, США), добавляли по 500 мкл питательной среды и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % углекислого газа в течение 72 ч. Полученное в режиме реального времени изображение было обработано с помощью программного обеспечения прибора. В частности, на основании полученных данных был произведен расчет площади, а затем и объема зафиксированных пузырей (сферических полостей) газа. Аналогичным образом был произведен расчет объема образца сплава. Результат оценки динамики газообразования был представлен в виде соотношения объема газа к 1 мм³ объема сплава в конкретный момент наблюдения.

Исследование колонизации клетками. Для проведения исследований использовали культуру мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК). С этой целью из бедренных костей мышей линии C57Bl/6 выделяли клетки костного мозга и культивировали их в питательной среде на основе DMEM в соответствии с ранее отработанной методикой [18]. Для подготовки к эксперименту ММСК 2-го пассажа обрабатывали раствором Версена («ПанЭко», Россия), затем отмывали клетки раствором Хенкса («ПанЭко», Россия) и ресуспендировали в питательной среде. Итоговая концентрация клеток в суспензии составляла $1,92 \times 10^6$ клеток/мл. Образцы сплавов по 1 размещали в лунках 24-луночного планшета (Nunc, США). На поверхность каждого образца наносили по 10 мкл клеточной суспензии. Образцы с клетками инкубировали в атмосфере 5 % углекислого газа при 37 °С в течение 30 мин для адгезии клеток к сплавам, а затем добавляли по 2 мл питательной среды в каждую лунку планшета. Результаты учитывали через 72 ч инкубации в описанных выше условиях с помощью автоматизированного микроскопа Lionheart™ FX (BioTek Instruments, США). С этой целью образцы извлекали из среды инкубации, отмывали в 500 мкл раствора Хенкса, а затем окрашивали с помощью LIVE/DEAD™ Cell Imaging Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США) для визуализации живых (зеленая флуоресценция) и мертвых (красная флуоресценция) клеток на поверхности сплавов.

Проведение экспериментов с использованием клеточных культур было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Статистический анализ данных. Результаты исследований представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения измеренных величин. Сравнительный анализ межгрупповых данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия учитывали как достоверные при $p < 0,05$.

Результаты

Биодеградация

Результаты опытов по динамике биодеградации (описанных в разделе «Исследование биодеградации») представлены на рис. 2. Эта динамика отражена в величине электросопротивления образцов, представленного на графиках в произвольных единицах (arbitrary units).

Как показывают приведенные результаты, на начальном этапе инкубации оба типа сплавов демонстрируют высокую скорость нарастания деструкции. Однако примерно через 4 ч интенсивность этого процесса замедляется и наблюдается период стабилизации. Продолжительность этого периода стабилизации изучаемых сплавов различна. Было установлено, что период стабилизации образцов сплава WE43 MAD отличается значительно большей продолжительностью в сравнении со сплавом в исходном состоянии – 16 и 3 ч соответственно. Анализируя приведенный график, можно заметить, что период стабилизации деструкции образца WE43 MAD, возможно, был более длительным, однако регистрации этого факта помешало внесение в лунку порции свежей питательной среды, что отразилось в виде кратковременного усиления регистрируемого сигнала во всех лунках с образцами. После добавления свежей питательной среды мы наблюдали еще одно плато стабилизации динамики деструкции сплава WE43 MAD до 26 ч инкубации включительно, тогда как деструкция образца WE43 hom после этого не изменилась, продолжая оставаться интенсивной. После 26 ч инкубации динамика деградации сплавов обоих типов носила сходный характер. Приведенные выше результаты позволили охарактеризовать деструкцию образцов при биодеградации. Они позволяют сделать однозначный вывод о меньшей степени разрушения образца УМЗ-сплава, обработанного МОД. Изображения внешнего вида образцов в конце эксперимента, представленные на рис. 2, позволяют продемонстрировать торможение деструкции образца, обработанного МОД, в сравнении со сплавом в гомогенном состоянии. Наглядно показано, что максимальное разрушение образца из исходного сплава наблюдали в области границы сред «водная биоактивная среда–воздух».

Следующий этап наших исследований был посвящен оценке газообразования, сопровождающего процесс биодеструкции магниевых сплавов выделением водорода [19–21]. С этой целью Т-образные образцы сплавов инкубировали в лунках 24-луночного планшета с питательной средой при соблюдении условий, аналогичных изложенным выше. С помощью автоматизированного микроскопа Lionheart™ FX производили фотофиксацию и анализ объема газа, выделяющегося в процессе биокоррозии образца, с использованием специализированного программного

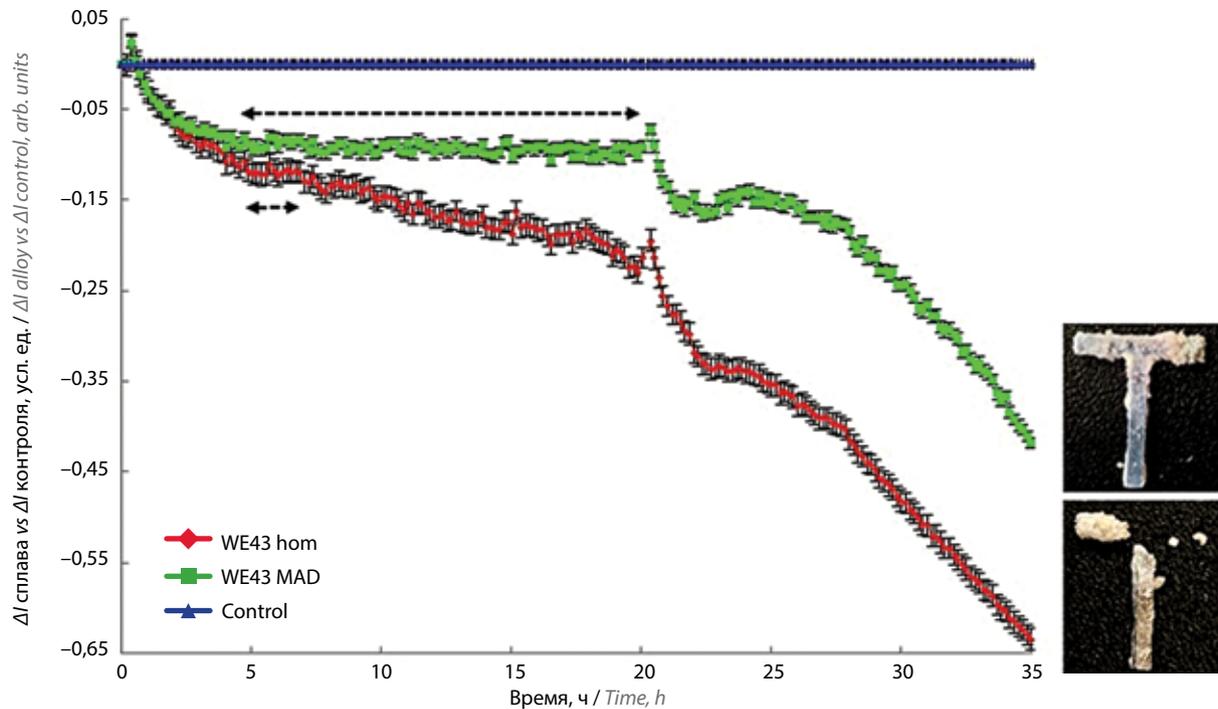


Рис. 2. Кинетика биодеструкции образцов WE43 в исходном состоянии (WE43 hom) и после обработки мультиосевой деформацией (WE43 MAD) в процессе инкубации в питательной среде на основе DMEM в течение 36 ч при 37°C в атмосфере 5 % углекислого газа. Прерывистой линией обозначен период стабилизации процесса деструкции образцов сплавов. Справа показан внешний вид образцов WE43 в конце эксперимента: сверху – WE43 MAD, внизу – WE43 hom

Fig. 2. The kinetics of biodegradation of WE43 samples in the initial state (WE43 hom) and after multiaxial deformation (WE43 MAD) during incubation in a culture medium based on DMEM for 36 hours at 37°C in an atmosphere with 5 % carbon dioxide. The dashed line indicates the period of stabilization of the destruction process of the alloy samples. On the right the appearance of the WE43 samples at the end of the experiment is shown: at the top – WE43 MAD, at the bottom – WE43 hom

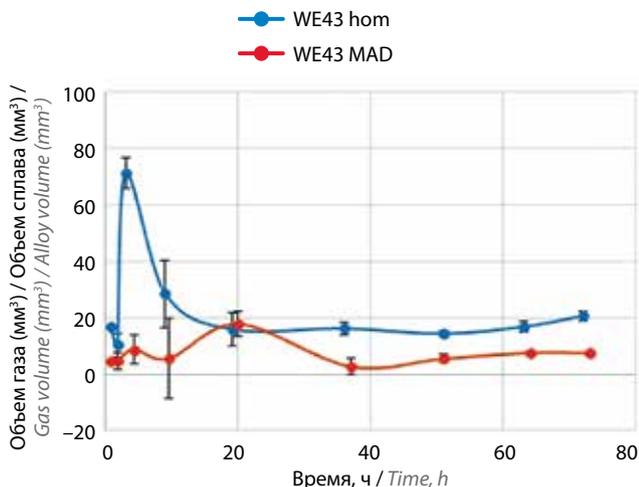


Рис. 3. Динамика газообразования образцов WE43 в исходном состоянии (WE43 hom) и после обработки мультиосевой деформацией (WE43 MAD) в процессе инкубации в питательной среде на основе DMEM в течение 36 ч при 37°C в атмосфере 5 % углекислого газа, оцененная с помощью автоматизированного микроскопа Lionheart™ FX (BioTek Instruments, США)

Fig. 3. The gas formation dynamics of WE43 samples in the initial state (WE43 hom) and after multiaxial deformation (WE43 MAD) during incubation in a culture medium based on DMEM for 36 hours at 37°C in an atmosphere with 5 % carbon dioxide, assessed using an automated microscope Lionheart™ FX (BioTek Instruments, USA)

обеспечения. Затем производили расчет отношения объема зарегистрированного газа к единице исходного объема образца сплава. Результаты расчетов представлены на рис. 3.

Согласно проведенным расчетам, уже через 45 мин после начала инкубации газообразование, индуцированное деструкцией гомогенного сплава, имело достоверно более интенсивный характер в сравнении с УМЗ-образцом. Максимальную интенсивность газообразования наблюдали в течение первых 9 ч инкубации образца WE43 hom, тогда как обработка сплава посредством МОД способствовала снижению газовыделения в течение этого периода в 2–8 раз. На представленном графике видно, что стабильное протекание газообразования гомогенизированного сплава наблюдалось в течение 19 ч инкубации, тогда как интенсивность выделения газа образцом, обработанным МОД, менялась незначительно, оставаясь равномерной в ходе всего периода наблюдения. Проведенный анализ показал, что общий зарегистрированный объем газа, выделенного WE43 MAD в процессе всего периода наблюдения, был на 70 % меньше в сравнении с гомогенизированным образцом ($65,0 \pm 4,4 \text{ мм}^3 \text{ H}_2/\text{мм}^3$ сплава и $211,0 \pm 21,1 \text{ мм}^3 \text{ H}_2/\text{мм}^3$ сплава соответственно, $p = 0,02$).

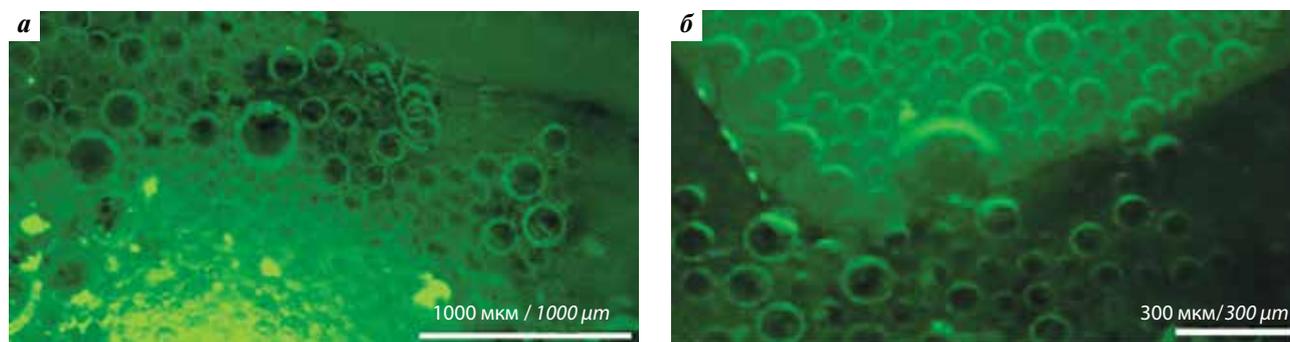


Рис. 4. Газообразование в процессе биодеструкции образцов WE43 в исходном состоянии (WE43 hom) (а) и после обработки мультиосевой деформацией (WE43 MAD) (б) через 3 сут инкубации в питательной среде на основе DMEM

Fig. 4. Gas formation during biodegradation of WE43 samples in the initial state (WE43 hom) (a) and after multi-axial deformation (WE43 MAD) (b) after 3 days of incubation in a culture medium based on DMEM

Изображения, представленные на рис. 4, свидетельствуют, что в сравнении с образцом сплава после обработки МОД газообразование, сопровождавшее биодеструкцию образца в исходном состоянии, оставалось более интенсивным даже к концу эксперимента, несмотря на отмеченное снижение его активности по сравнению с начальным периодом инкубации.

Таким образом, результаты проведенных исследований продемонстрировали, что обработка гомогенизированного сплава WE43 посредством МОД способствует снижению интенсивности его деструкции и объема выделенного газа при инкубации в биоактивной среде. При этом следует особо отметить, что указанная механическая обработка обеспечивает стабилизацию интенсивности газообразования в процессе инкубации сплава спустя 4 ч после начала эксперимента.

Колонизация клетками

В результате изучения биодеструкции сплавов WE43 было установлено, что в 1-е часы контакта образцов с биоактивной средой газообразование и деструкция образцов протекали чрезвычайно интенсивно. При этом газообразование, сопровождавшее биодеструкцию гомогенизированного сплава, имело взрывообразный характер (деградация протекала бурно и начиналась практически сразу после погружения в среду). Учитывая это, образцы сплавов были проинкубированы в питательной среде в течение 4 ч перед нанесением клеток для перехода к стадии стабильной биодеструкции. Для данного исследования были использованы ММСК мыши. После удаления среды на поверхность образцов наносили клетки, выдерживали их для адгезии к сплавам, а затем в лунки с образцами добавляли новую порцию среды. Результаты оценивали через 7 сут инкубации.

Как видно на рис. 5, после окончания периода инкубации поверхность УМЗ-образца WE43 была колонизирована клетками. При этом абсолютное

большинство клеток на поверхности WE43 MAD демонстрировали способность конвертировать нефлуоресцирующий Calcein AM путем гидролиза ацетоксиметил эфира внутриклеточными эстеразами в активную форму кальцеина, флуоресцирующую зеленым цветом, что позволило идентифицировать их как функционально активные живые клетки. Было показано, что клетки, адгезированные на поверхности обработанного МОД сплава, имеют хорошо заметное центрально расположенное округлое ядро и полигональную структуру, а характер их взаимодействия указывает на активную пролиферацию. Напротив, на поверхности гомогенизированного образца было детектировано лишь незначительное количество мертвых клеток, флуоресцирующих красным из-за проникновения флуорохрома внутрь клеток.

На основании полученных данных можно констатировать, что свойства поверхности сплава WE43 после обработки МОД обеспечивают условия для активной клеточной адгезии и пролиферации. Это указывает на улучшение биосовместимости WE43 после МОД в сравнении с гомогенизированным сплавом.

Обсуждение

Полученные результаты показали, что контакт образцов сплава WE43 с биоактивной средой (питательная среда для роста клеток на основе DMEM) изначально приводил к бурному газообразованию и быстрому нарастанию деструктивных процессов. Однако уже через несколько часов после начала инкубации (данный период времени составлял в среднем 4 ч) наблюдали стабилизацию интенсивности биодеструкции исследуемого сплава. Детальное исследование кинетики данного процесса показало, что длительность вышеупомянутого этапа стабилизации сплава WE43 была значительно выше после обработки МОД в сравнении с гомогенным образцом – более чем в 5 раз. Логично предположить, что

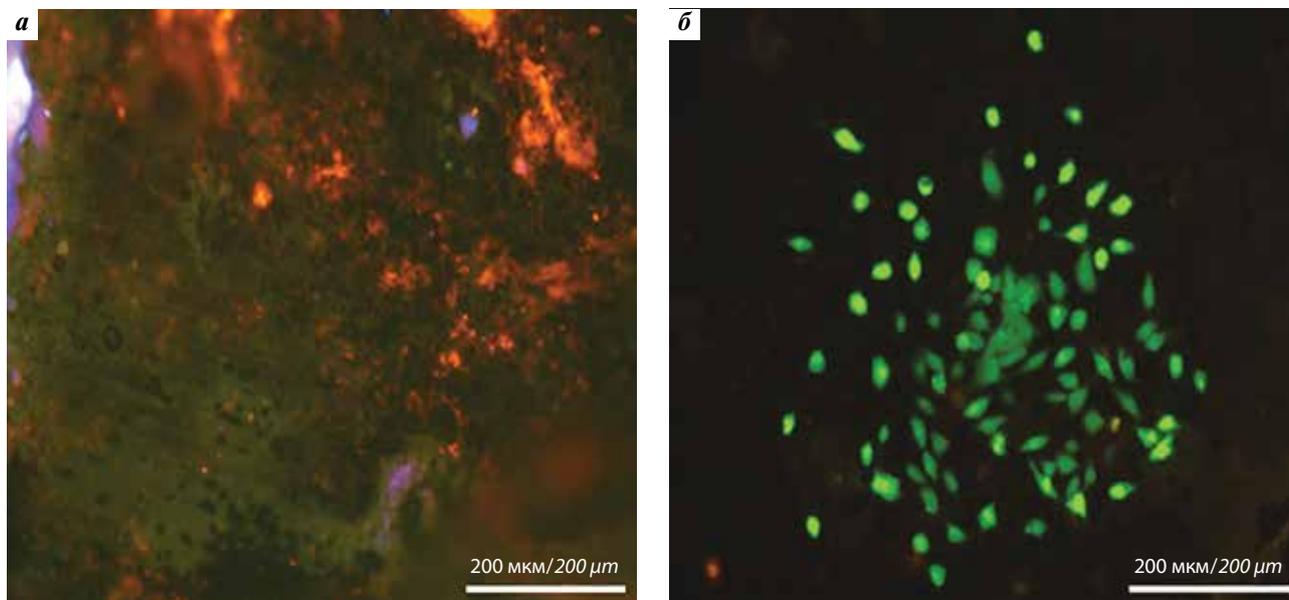


Рис. 5. Колонизация клетками образцов гомогенизированного WE43 (а) и деформированного WE43 МОД (б) в процессе инкубации в питательной среде DMEM при 37°C в атмосфере 5 % CO₂ в течение 7 сут

Fig. 5. Cell colonization of samples of homogenized WE43 (a) and deformed WE43 MAD (б) after 7 days of incubation in DMEM culture medium at 37°C in an atmosphere with 5 % CO₂

указанный период стабилизации газообразования, сопровождающийся замедлением биодеструкции сплава, является оптимальным временем для адгезии клеток к поверхности образцов и индукции их пролиферации, обуславливающих клеточную колонизацию, что соответствует выводам других исследователей [13]. Основываясь на этом заключении, мы проводили преинкубацию биodeградируемых сплавов в биоактивной среде в течение 4 ч, удаляли питательную среду, потерявшую кондиционные свойства, а затем с началом периода стабилизации наносили на поверхность образцов ММСК, обеспечивая тем самым оптимальные условия для их адгезии и процесса колонизации. Исследование морфологии образцов показало, что соблюдение описанных условий способствовало колонизации поверхности образцов сплава. При этом наибольшее количество функционально активных клеток было обнаружено именно на поверхности образца, обработанного МОД, с удлиненным периодом стабильности биодеструктивных процессов на раннем этапе инкубации. Из результатов исследований, опубликованных ранее, известно, что обработка сплава МОД способствует измельчению зерна сплава. В частности, для сплава WE43 в процессе МОД наблюдали измельчение зерна до 0,93 мкм [17, 21]. При этом было установлено, что формирование УМЗ-структуры приводит к увеличению предела прочности сплава с 234 МПа в гомогенизированном состоянии до 300 МПа, а усталостной прочности — с 90 до 165 МПа [22]. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было констатировано улучшение биосовместимости

сплава WE43 после обработки МОД по сравнению с исходным состоянием: отмечали значительное снижение гемолиза эритроцитов, повышение жизнеспособности лейкоцитов и пролиферации ММСК [17]. Данное явление можно рассматривать как результат замедления химической коррозии сплава. Было показано, что потеря массы образца, обработанного методом МОД, уменьшается до $0,80 \pm 0,06$ мг/(см²·день) по сравнению с $1,09 \pm 0,24$ мг/(см²·день) в исходном состоянии. Авторами также была отмечена тенденция к снижению количества выделившегося водорода. Таким образом, можно предположить, что изменение структуры сплава на УМЗ действительно оказывает положительный эффект на динамику биодеструкции.

Опираясь на вышеизложенное, можно заключить, что перспективность использования сплава WE43 для изготовления ортопедических изделий, в частности для металлотезы или имплантатов с целью возмещения дефектов костной ткани, значительно возрастет после обработки методом МОД благодаря снижению объема газообразования в области хирургического вмешательства, а также улучшению прочностных и цитокондуктивных качеств. Последние, как ожидается, ускорят фиксацию медицинского изделия в области остеосинтеза, а также его интеграцию в окружающие ткани, обеспечив стабилизацию контактных поверхностей и максимальную функциональную компенсацию для восполнения опороспособности кости. Замедление биodeградации УМЗ-сплава, отмечаемое в том числе в условиях *in vivo* [22], будет

способствовать пролонгации эксплуатационного периода разрабатываемого медицинского изделия, поскольку обеспечит приближение скорости протекания процессов биорезорбции к кинетике репаративных процессов в области восполняемого дефекта. Разработка медицинских изделий, обладающих подобными свойствами, является особенно актуальной задачей для детской ортопедии с целью сокращения количества повторных операций, а также для травматологии и онкологии, сопряженных с необходимостью проведения расширенных резекций костей, обеспечивающих удаление разрушенных или поврежденных опухолью тканей, ведущих к усилению риска инвалидизации пациента. Представляется необходимым, чтобы терапия данной группы онкологических пациентов включала не только мероприятия по лечению основного заболевания (химиорадитерапия, экстирпация поврежденных тканей), но и проведение реконструктивных операций по восполнению костных дефектов и восстановлению функциональности опорно-двигательной системы. Кроме того, стоит отметить, что ранее проведенное исследование показало, что коинкубация сплава WE43 с опухолевыми клетками линий LNCaP и MDA-MB-231 снижает их жизнеспособность и способность к пролиферации [23]. Это делает сплав WE43 перспективным

материалом с противоопухолевой активностью для создания имплантатов и крепежных элементов для ортопедической онкологии. Поэтому дальнейшее изучение биodeградируемых материалов на основе сплавов магния, подвергнутых различным методам механической обработки для программирования скорости их биодеструкции и повышения биосовместимости, будет способствовать созданию новых биоматериалов, перспективных для применения в медицинской практике, в том числе и в онкоортопедии.

Заключение

Анализ приведенных данных показывает, что обработка сплава WE43 методом МОД способствует снижению скорости биodeградации, в частности стабилизирует интенсивность газообразования и деструкции образца, что улучшает его биосовместимость, стимулируя колонизацию клетками его поверхности. В целом полученные результаты дают основание рекомендовать обработку сплава посредством МОД для создания на его основе медицинских изделий для целей онкоортопедии. Ожидается, что использование данного подхода повысит стабильность остеосинтеза, обеспеченного металлоконструкциями на основе WE43, обработанного МОД, а также снизит объем и интенсивность газообразования в области имплантации.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Rajan A.V., Sundaram C.M., Rajesh A.V. Mechanical and morphological investigation of bio-degradable magnesium AZ31 alloy for an orthopedic application. *Mater Today Proc* 2020;21(1):272–7. DOI: 10.1016/j.matpr.2019.05.429.
- Bin B.S.J., Tan Y.T., Fong K.S., Tan M.J. Effect of severe plastic deformation and post-annealing on the mechanical properties and bio-corrosion rate of AZ31 magnesium alloy. *Proced Eng* 2017;207:1475–80. DOI: 10.1016/j.proeng.2017.10.916.
- Razavi M., Fathi M., Savabi O. et al. *In vivo* assessments of bioabsorbable AZ91 magnesium implants coated with nanostructured fluoridated hydroxyapatite by MAO/EPD technique for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;48:21–7. DOI: 10.1016/j.msec.2014.11.020.
- Öcal E.B., Esen Z., Aydinol K., Dericioğlu A.F. Comparison of the short and long-term degradation behaviors of as-cast pure Mg, AZ91 and WE43 alloys. *Mater Chem Phys* 2020;241:122350. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2019.122350.
- Li M., Benn F., Derra T. et al. Microstructure, mechanical properties, corrosion resistance and cytocompatibility of WE43 Mg alloy scaffolds fabricated by laser powder bed fusion for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;119:11623. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111623.
- Rahman M., Li Y., Wen C. Realization and characterization of double-layer Ca-P coating on WE43 Mg alloy for biomedical applications. *Surf Coat Technol* 2020;398:126091. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2020.126091.
- Ijiri M., Shimonishi D., Tani S. et al. Improvement of corrosion resistance of magnesium alloy by high-temperature high-pressure cavitation treatment. *Int J Lightweight Mater Manuf* 2019;2(3):255–60. DOI: 10.1016/j.ijlmm.2019.02.001.
- Chen J., Tan L., Yu X. et al. Mechanical properties of magnesium alloys for medical application: A review. *J Mech Behav Biomed Mater* 2018;87:68–79. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2018.07.022.
- Sekar P., S.N., Desai V. Recent progress in *in vivo* studies and clinical applications of magnesium based biodegradable implants – A review. *J Magnes Alloy* 2021. DOI: 10.1016/j.jma.2020.11.001.
- Liu D., Yang D., Li X., Hu S. Mechanical properties, corrosion resistance and biocompatibilities of degradable Mg-RE alloys: A review. *J Mater Res Technol* 2019;8(1):1538–49. DOI: 10.1016/j.jmrt.2018.08.003.
- Toong D.W.Y., Ng J.C.K., Huang Y. et al. Bioresorbable metals in cardiovascular stents: Material insights and progress. *Materialia* 2020;12:100727. DOI: 10.1016/j.mtla.2020.100727.
- Liu C., Ren Z., Xu Y. et al. Biodegradable Magnesium Alloys Developed as Bone Repair Materials: A Review. *Scanning* 2018;2018:9216314. DOI: 10.1155/2018/9216314.
- Willumeit R., Möhring A., Feyerabend F. Optimization of cell adhesion on mg based implant materials by pre-incubation under cell culture conditions. *Int J Mol Sci* 2014;15(5):7639–50. DOI: 10.3390/ijms15057639.
- Cecchinato F., Agha N.A., Martinez-Sanchez A.H. et al. Influence of Magnesium Alloy Degradation on Undifferentiated Human Cells. *PLoS*

- One 2015;10(11):e0142117.
DOI: 10.1371/journal.pone.0142117.
15. Zherebtsov S., Kudryavtsev E., Kostjuchenko S. et al. Strength and ductility-related properties of ultra-fine grained two-phase titanium alloy produced by warm multiaxial forging. *Mater Sci Eng A* 2012;536:190–6. DOI: 10.1016/j.msea.2011.12.102.
 16. Dobatkin S.V., Lukyanova E.A., Martynenko N.S. et al. Strength, corrosion resistance, and biocompatibility of ultrafine-grained Mg alloys after different modes of severe plastic deformation. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 2017;194:012004. DOI: 10.1088/1757-899X/194/1/012004.
 17. Martynenko N., Lukyanova E., Anisimova N. et al. Improving the property profile of a bioresorbable Mg-Y-Nd-Zr alloy by deformation treatments. *Materialia* 2020;13:100841. DOI: 10.1016/j.mtla.2020.100841.
 18. Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. Biomineralization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456.
 19. Imwinkelried T., Beck S., Schaller B. Pre-clinical testing of human size magnesium implants in miniature pigs: Implant degradation and bone fracture healing at multiple implantation sites. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2020;108:110389. DOI: 10.1016/j.msec.2019.110389.
 20. Gartzke A.-K., Julmi S., Klose C. et al. A simulation model for the degradation of magnesium-based bone implants. *J Mech Behav Biomed Mater* 2020;101:103411. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2019.103411.
 21. Hou R., Victoria-Hernandez J., Jiang P. et al. *In vitro* evaluation of the ZX11 magnesium alloy as potential bone plate: Degradability and mechanical integrity. *Acta Biomater* 2019;97:608–22. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.07.053.
 22. Dobatkin S., Martynenko N., Anisimova N. et al. Mechanical properties, biodegradation, and biocompatibility of ultrafine grained magnesium alloy WE43. *Materials (Basel)* 2019;12(21):3627. DOI: 10.3390/ma12213627.
 23. Anisimova N., Kiselevskiy M., Martynenko N. et al. Cytotoxicity of biodegradable magnesium alloy WE43 to tumor cells *in vitro*: Bioresorbable implants with antitumor activity? *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 2020;108B:167–73. DOI: 10.1002/jbm.b.34375.

Благодарность. Авторы выражают благодарность к.т.н. Н.Ю. Юрченко и д.т.н., профессору А.Г. Салищеву за проведение мультиосевой деформации.

Acknowledgement. The authors are grateful to Dr. N.Yu. Yurchenko and Prof. A.G. Salishchev for carrying out multi-axial deformation.

Вклад авторов

Н.С. Мартыненко: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Н.Ю. Анисимова: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

К.М. Новрузов: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

С.В. Добаткин, Ю.З. Эстрин: формальный анализ, редактирование;

М.В. Киселевский: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, формальный анализ, редактирование.

Author's contribution

N.S. Martynenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

N.Yu. Anisimova: research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

K.M. Novruzov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

S.V. Dobatkin, Yu.Z. Estrin: formal analysis and editing;

M.V. Kiselevskiy: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, formal analysis and editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Н.С. Мартыненко / N.S. Martynenko: <https://orcid.org/0000-0003-1662-1904>

Н.Ю. Анисимова / N.Yu. Anisimova: <https://orcid.org/0000-0002-4370-6578>

К.М. Новрузов / K.M. Novruzov: <https://orcid.org/0000-0002-0773-255X>

С.В. Добаткин / S.V. Dobatkin: <https://orcid.org/0000-0003-4232-927X>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Ю.З. Эстрин / Yu.Z. Estrin: <https://orcid.org/0000-0001-7784-5704>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено в рамках федеральной исследовательской программы, контракт № AAAA-A19-119021990077-8.

Financing. The study was funded through the federal research program, contract No AAAA-A19-119021990077-8.

Соблюдение правил биоэтики. Проведение экспериментов с использованием клеточных культур было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with principles of bioethics. The experiments using cell cultures were approved by the local ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia.

Статья поступила: 19.03.2021. **Принята к публикации:** 16.04.2021.

Article submitted: 19.03.2021. **Accepted for publication:** 16.04.2021.