

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2021 • том 20 • № 3

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

3

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

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

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

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

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

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

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

ISSN 1726-9784 (Print)
ISSN 1726-9792 (Online)
Российский биотерапевтический журнал.
2021. Том 20. № 3. 1–72.
Сдано в печать: 24.09.2021.

© 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)

Простое решение в молекулярной онкологии

Idylla



Система предназначена для быстрого выявления мутаций при меланоме, колоректальном раке и немелкоклеточном раке легких, а также для определения статуса микросателлитной нестабильности.



От образца до результата менее 2,5 часов



Достаточно одного среза препарата или 1 мл плазмы



Время работы оператора менее 2 минут



Высокая чувствительность и стандартизация



Полная автоматизация исследования



Подходит для любой лаборатории



ПУ № РЗН 2021/13382
от 08.02.2021

Часть продукции для клинической диагностики проходит процедуру регистрации медицинского изделия и не доступна к заказу.

По вопросам возможности применения Автоматической системы Idylla в Вашей лаборатории обращайтесь по контактам:



Авторизованный дистрибьютор Biocartis (Бельгия) — компания «БиоЛайн»

ООО «БиоЛайн»
197022, Россия, Санкт-Петербург
ул. Проф. Попова, д. 23, лит. Е
тел.: +7 (812) 320 49 49
факс: +7 (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru,
www.bioline.ru

Москва, тел.: +7 (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: +7 (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: +7 (343) 287 32 49
Н. Новгород, тел.: +7 (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: +7 (863) 268 99 32
Казань, тел.: +7 (843) 570 66 88
Хабаровск, тел.: +7 (4212) 474 767



idylla.bioline.ru



НЕ ПРОСТО ИЗДАТЕЛЬСТВО — СООБЩЕСТВО МЕДИЦИНСКИХ СПЕЦИАЛИСТОВ

www.abvpress.ru

ГАЗЕТЫ

Урология сегодня

Онкология Сегодня
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ОНКОЛОГОВ

СОВРЕМЕННАЯ
КАРДИОЛОГИЯ

ПЕДИАТРИЯ
СЕГОДНЯ

НЕВРОЛОГИЯ
СЕГОДНЯ

Акушерство
и гинекология

Московская
ЭНДОКРИНОЛОГИЯ
СЕГОДНЯ

Гастроэнтерология
СЕГОДНЯ

ЖУРНАЛЫ

ОНКОУРОЛОГИЯ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Нервно-мышечные БОЛЕЗНИ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

УСПЕХИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОНКОЛОГИИ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Тазовая хирургия и онкология
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

НЕЙРОХИРУРГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

ОНКО ГЕМАТОЛОГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

АНДРОЛОГИЯ И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Опухоли ГОЛОВЫ и ШЕЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ОНКО ПАТОЛОГИЯ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

КЛИНИЦИСТ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

ОПУХОЛИ ЖЕНСКОЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

РУССКИЙ ЖУРНАЛ ДЕТСКОЙ НЕВРОЛОГИИ
СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Российский Биотерапевтический Журнал
Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal

САРКОМЫ
костей, мягких тканей и опухоли кожи

СА A Cancer Journal for Clinicians. Русское издание

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

3^{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
rbjournal@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: ПИ № 77-11695 dated 21.01.2002;
ПИ № ФС 77-53039 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 3. 1–72. Submitted: 24.09.2021.
© 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 Nizhegorodsky 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

*И.Ж. Шубина, Н.А. Бурлака, А.П. Казанцев, Ю.И. Должикова,
А.А. Петкевич, К.И. Киргизов, М.В. Киселевский*

**Определение минимального количества опухолевых клеток для диагностики
и мониторинга лечения нейробластомы у детей 10**

О.А. Бочарова, В.Б. Матвеев, Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, В.Г. Кучеряну

**Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные
механизмы (часть I) 17**

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

*Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа,
Е.В. Артамонова, Е.И. Коваленко, М.В. Хорошилов, З.Г. Кадагидзе*

**Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы
с результатами лечения. 25**

С.В. Тишков, Е.В. Блынская, К.В. Алексеев, В.В. Бучева

**Использование метода SeDeM-ODT для разработки таблеток ГК-2,
диспергируемых в полости рта 34**

А.М. Мирошкина, С.П. Кречетов, Н.Л. Соловьева, И.И. Краснюк

**Разработка полимерных микрочастиц с радахлорином и оценка перспектив
их использования в фотодинамической терапии. 47**

С.П. Кречетов, М.С. Масленникова, Н.Л. Соловьева, И.И. Краснюк

**Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола
с солюбилизаторами 57**

Р.В. Журиков, Л.П. Коваленко, С.В. Никитин, А.Д. Дурнев

**Влияние производного 5-оксипиримидина на рост и метастазирование
меланомы В16 у мышей линии С57BL/6 66**

REVIEWS

*Irina Zh. Shubina, Natalia A. Burlaka, Anatoly P. Kazantsev, Yulia I. Dolzhikova,
Alisa A. Petkevich, Kiril I. Kirgizov, Mikhail V. Kiselevskiy*

**Detection of minimal tumor cells for the diagnosis and treatment monitoring
of children with neuroblastoma 10**

*Olga A. Bocharova, Vsevolod B. Matveev, Evgeniy V. Bocharov,
Regina V. Karpova, Valerian G. Kucheryanu*

Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 1) 17

ORIGINAL REPORTS

*Tatiana N. Zabolina, Antonina I. Chertkova, Anna A. Borunova, Elena N. Zakharova,
Esma K. Shoua, Elena V. Artamonova, Elena I. Kovalenko, Maksim V.
Horoshilov, Zaira G. Kadagidze*

**Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients
with treatment results 25**

Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev, Victoria V. Buyeva

**Using the SeDeM-ODT method for the development of GK-2 tablets dispersed
in the oral cavity 34**

Anastasia M. Miroshkina, Sergey P. Krechetov, Natalia L. Solovieva, Ivan I. Krasnyuk

**Development of polymeric microparticles with radachlorine and estimation
of the prospects of their use in photodynamic therapy 47**

Sergey P. Krechetov, Maria S. Maslennikova, Natalia L. Solovieva, Ivan I. Krasnyuk

Development of optimal composition formulation of resveratrol and solubilisers 57

Ruslan V. Zhurikov, Larisa P. Kovalenko, Sergey V. Nikitin, Andrey D. Durnev

**Effects of 5-hydroxypyrimidine derivative on growth and metastasis
of melanoma B16 in C57BL/6 mice 66**

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-10-16>

Определение минимального количества опухолевых клеток для диагностики и мониторинга лечения нейробластомы у детей

И.Ж. Шубина, Н.А. Бурлака, А.П. Казанцев, Ю.И. Должикова, А.А. Петкевич,
К.И. Киргизов, М.В. Киселевский

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

Контакты: Ирина Жановна Шубина irinashubina@mail.ru

Диагностика, лечение и выработка тактики проводимой терапии нейробластомы (НБ) у детей являются нерешенными проблемами современной детской онкогематологии. Один из ключевых аспектов мониторинга терапии НБ – обнаружение и контроль минимальной остаточной болезни.

В обзоре рассмотрены современные методы, используемые для обнаружения минимальной остаточной болезни при НБ, такие как иммуноцитохимия, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), проточная цитометрия, методы качественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (обратно-транскриптазная ПЦР, RT-PCR) и количественной ПЦР (QRT-PCR) для оценки мРНК. Специфический маркер НБ, дизиагоглиозид GD2, определяют методом проточной цитометрии или иммуноцитохимии, повышая ее специфичность с помощью флуорохромов. В настоящее время метод FISH является «золотым стандартом» для оценки статуса гена *MYCN* при НБ. Широко используемый метод многопараметровой проточной цитометрии позволяет достичь высокой специфичности анализа при диагностике НБ. Для выявления клеток НБ с помощью RT-PCR предлагаются разные мишени, но в настоящее время единственной признанной мишенью является мРНК тирозингидроксилазы. При этом показано, что QRT-PCR имеет преимущество перед более традиционной качественной RT-PCR, поскольку этот метод позволяет более точно и количественно определить 1 или несколько мРНК в клинических образцах.

Обсуждаются результаты исследований по сравнению чувствительности методов диагностики, таких как RT-PCR, проточная цитометрия, FISH и др. Сравнительные исследования включали многопараметровую проточную цитометрию с различными комбинациями моноклональных антител CD9/CD81/CD56/CD45/GD2, традиционную RT-PCR и количественную – QRT-PCR для обнаружения циркулирующих клеток НБ в образцах от пациентов с онкологией и здоровых добровольцев.

Несмотря на то что каждый из оцениваемых методов имеет свои преимущества, авторы акцентируют внимание на том, что именно многопараметровая проточная цитометрия позволяет быстро и надежно определять минимальную остаточную болезнь или микрометастазы НБ.

Ключевые слова: нейробластома, минимальная остаточная болезнь, микрометастазы, полимеразная цепная реакция, проточная цитометрия

Для цитирования: Шубина И.Ж., Бурлака Н.А., Казанцев А.П. и др. Определение минимального количества опухолевых клеток для диагностики и мониторинга лечения нейробластомы у детей. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):10–6. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-10-16.

Detection of minimal tumor cells for the diagnosis and treatment monitoring of children with neuroblastoma

Irina Zh. Shubina, Natalia A. Burlaka, Anatoly P. Kazantsev, Yulia I. Dolzhikova, Alisa A. Petkevich,
Kiril I. Kirgizov, Mikhail V. Kiselevskiy

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

Contacts: Irina Zhanovna Shubina irinashubina@mail.ru

Diagnosis, treatment and designing an adequate strategy of neuroblastoma (NB) therapy in children is still a complicated tasks for pediatric oncology and hematology. One of the key aspects of NB control is detection and monitoring of minimal residual disease.

The authors make a concise review of the up-to-date methods, such as immunocytochemistry, fluorescent *in situ* hybridization (FISH), flow cytometry, the methods of qualitative and quantitative polymerase chain reaction (PCR) to estimate mRNA (RT-PCR and QRT-PCR), which are currently used for minimal residual disease detection in patients with NB. Disialoganglioside GD2, a specific NB marker, is traditionally determined by immunocytochemistry with fluorochromes that enhance its specificity, and by flow cytometry, as well. At present, FISH test is a gold standard for evaluation of the *MYCN* gen status in NB. A widely used multicolor flow cytometry method allows achieving high specificity of the analysis for NB diagnosis. RT-PCR may search for various targets to reveal NB cells, however, at the moment the only accepted immune target is tyrosine hydroxylase mRNA. Moreover, the studies established that quantitative QRT-PCR has more advantages than traditional qualitative RT-PCR, since this method allows a more accurate and quantitative detection of one or several mRNAs in clinical samples.

The review discusses advantages and disadvantages of the main methods currently used for minimal residual disease evaluation of NB cells, such as RT-PCR, flow cytometry, FISH, etc. Comparative studies included multicolor flow cytometry with various combinations of CD9/CD81/CD56/CD45/GD2 monoclonal antibodies, conventional RT-PCR and quantitative QRT-PCR to reveal circulating/disseminated NB cells in the clinical samples of cancer patients and healthy volunteers.

The authors analyze the results of various studies that compared accuracy and sensitivity of diagnostic methods such as RT-PCR, flow cytometry, FISH and some others. Despite the advantages of each method, the authors emphasize that multicolor flow cytometry is the optimal approach for the rapid and reliable detection of minimal residual disease and micrometastases of NB.

Key words: neuroblastoma, minimal residual disease, micrometastases, polymerase chain reaction, flow cytometry

For citation: Shubina I.Zh., Burlaka N.A., Kazantsev A.P. et al. Detection of minimal tumor cells for the diagnosis and treatment monitoring of children with neuroblastoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):10–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-10-16.

Введение

Лечение детей с нейробластомой (НБ) является актуальной проблемой современной детской онкогематологии. Своевременная диагностика часто бывает затруднена, так как симптомы НБ зачастую не имеют специфичности. При этом более чем у 50 % пациентов определяется IV стадия заболевания. Общая выживаемость больных с НБ значительно различается в зависимости от стадии процесса и группы риска. Так, у пациентов с IV стадией общая выживаемость составляет лишь около 20 %. Современное лечение пациентов с НБ основано на дифференцированных подходах к терапии в зависимости от группы риска [1, 2].

Стратификация пациентов на группы риска включает оценку клинических и молекулярно-биологических данных. Степень злокачественности НБ устанавливается при генетических исследованиях на выявление мутаций *MYCN*, делеций хромосом 1p или 11q. Наличие данных мутаций – неблагоприятный фактор прогноза заболевания. Перед началом специфической терапии всегда проводится верификация диагноза; диагноз НБ ставится при гистологическом исследовании биоптата первичной опухоли или метастазов. Кроме того, в последнее десятилетие актуальной проблемой становится определение микрометастазов или же минимальной остаточной болезни (МОБ), которые представляют собой единичные опухолевые клетки или кластеры, включающие не более 9–10 клеток. Согласно Международной системе стадирования нейробластомы (International

Neuroblastoma Staging System, INSS), цитологическое заключение по клеточному составу костного мозга (КМ) остается стандартным методом выявления диссеминированных клеток НБ [3]. Однако чувствительность этого подхода ограничена, поскольку количество опухолевых клеток менее чем 1 на 100 нормальных практически не выявляется при обычной цитологии с использованием световой микроскопии.

С внедрением в практику новых, более чувствительных методов неоднократно предпринимались попытки создания наиболее точных протоколов выявления опухолевых клеток НБ. В 2005 г. разработанный ранее чувствительный и воспроизводимый иммуноцитохимический тест на наличие GD2-антигена с морфологическими и иммуноцитологическими критериями был усовершенствован путем применения оценки генетического профиля с помощью анализа методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) и стандартизации методов окраски и критериев оценки [4].

В 2009 г. Международная группа по оценке риска, ассоциированного с нейробластомой (International Neuroblastoma Risk Group, INRG), опубликовала отчет о разработке рекомендаций по диагностике минимального количества опухолевых клеток НБ в образцах КМ и периферической крови [5]. В работе были детально рассмотрены такие современные методы, как иммуноцитохимия, флуоресцентная окраска FISH, проточная цитометрия (ПЦ), методы качественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (обратно-транскриптазная ПЦР, reverse transcription

polymerase chain reaction, RT-PCR) и количественной ПЦР (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, QRT-PCR) для оценки мРНК, которые могут быть использованы в качестве инструментов диагностики минимальной болезни (МБ). При постановке диагноза, на этапах терапии, в особенности перед трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток, перед лечением МОБ и в конце лечения рекомендуется проводить анализ образцов КМ и периферической крови для обнаружения минимального количества опухолевых клеток. В рутинной практике выявление опухолевых клеток в КМ на начальной стадии основывается на результатах цитологического исследования морфологии клеток [3, 5]. Тем не менее авторы настоятельно рекомендуют, чтобы образцы КМ и периферической крови, взятые для постановки диагноза, были также проанализированы с помощью иммуноцитохимии и QRT-PCR для получения исходной информации об экспрессии специфического антигена или мРНК, а также для изучения потенциальной клинической значимости МБ у тех детей, у которых традиционными методами не определяется метастатический процесс. Комбинация методов может дать не только прогноз клинической значимости МБ, но и дополнительную биологически значимую информацию. Например, для определения того, является ли гетерогенность опухоли значимой при мониторинге МОБ, следует использовать несколько независимых методов, например иммуноцитохимию и QRT-PCR, или анализ образцов с использованием нескольких антител, или амплификацию для нескольких целевых мРНК.

В 2017 г. группой специалистов был выработан консенсус по пересмотру критериев оценки ответа на лечение детей с НБ с учетом современных методов визуализации и количественной оценки поражения КМ [6]. Известно, что КМ — наиболее распространенная локализация метастатического поражения, как при постановке диагноза, так и при возникновении рецидива у пациентов с НБ. Кроме того, после проведенной терапии МОБ часто обнаруживается в КМ.

Таким образом, для определения минимального количества диссеминированных опухолевых клеток требуется высокая чувствительность и точная количественная оценка, которая может быть достигнута с помощью современных аналитических методов.

Иммуноцитохимия с флуорохромами

Дизиагоглиозид GD2, преимущественно экспрессирующийся равномерно на поверхности злокачественных клеток НБ и большинства типов меланомы [7], но не на нормальных гемопоэтических клетках [8], считается специфическим маркером для обнаружения МБ и МОБ с помощью иммуноцитохимии и ПЦ [9–11]. Метод иммуноцитохимии

является относительно недорогостоящим, однако он не позволяет проводить многопараметрический анализ. Это ограничение преодолевается путем применения метода иммуноцитохимии с использованием флуорохромов, представляющих собой небольшие химически инертные молекулы, в качестве маркеров для многопараметрического анализа, что повышает специфичность иммуноцитологического анализа. Так, меченные разными флуорохромами антитела против нейробластов и гемопоэтических клеток позволяют дифференцировать опухолевые клетки с помощью флуоресцентного микроскопа. Однако при использовании флуорохромов невозможно определить цитоморфологические особенности.

В отличие от стандартизации, которая была достигнута с помощью иммуноцитохимии [4], цитоморфологические критерии для отличия меченных иммунофлуоресценцией нейробластов от ложноположительных гемопоэтических клеток никогда не определялись и не стандартизировались. Кроме того, флуоресцентным сигналам свойственно быстрое затухание, что не позволяет точно измерить интенсивность и спектр флуоресценции. Такие ограничения затрудняют оценку образцов с флуоресцентной меткой.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)

Важное значение для определения прогноза заболевания НБ и выбора тактики лечения имеет установление генетических характеристик опухоли, а именно: хромосомных aberrаций, статуса онкогена *MYCN*, делеций локусов 1p36 и 11q, увеличения длинного плеча хромосомы 17. Амплификация гена *MYCN* наблюдается в 20–30 % первичных НБ и коррелирует с клиническим течением НБ и неблагоприятным прогнозом, являясь наиболее критичным прогностическим маркером. Метод FISH в настоящее время считается «золотым стандартом» для оценки статуса гена *MYCN* при НБ.

Анализ методом FISH позволяет относительно быстро определять гетерогенность амплификации гена *MYCN* в отдельных нейробластах. В клинических образцах НБ метод интерфазной реакции FISH позволяет выявить амплификацию гена *MYCN* даже при небольшом содержании опухолевых клеток [12].

Несмотря на видимые преимущества, анализ FISH является субъективной оценкой полученных изображений, требует дорогостоящего технического оснащения и сложных манипуляций. Многим диагностическим лабораториям не хватает ни опыта, ни средств для проведения данного теста. Даже в идеальных условиях результаты часто трудно интерпретировать, так как это требует тщательного изучения большого количества отдельных клеток высококвалифицированным специалистом. Кроме того, исследования

показали, что, несмотря на свою высокую специфичность, FISH-анализ имеет низкую чувствительность — 58 % [13–15]. Ограничения этого метода требуют изучения возможностей менее технически сложных, недорогих альтернативных подходов с реализацией мультиплексного анализа.

Проточная цитометрия

Широко применяемый в диагностических целях метод ПЦ обладает теми же преимуществами, что и иммуноцитохимия с использованием флуорохромов. Одновременное применение меченных разными флуоресцентными красителями антител против различных субпопуляций опухолевых и нормальных клеток позволяет достичь высокой специфичности анализа. К другим его преимуществам относится быстрая обработка исследуемых образцов — результаты можно получить в течение нескольких часов. Искомая субпопуляция определяется кластером от 10–20 событий (клеток) на точечном графике (Dot plot), при этом результат не зависит от опыта специалиста в цитоморфологии, иммунологии или цитогенетике. Многочисленные исследования по оценке МОБ или микрометастазов при различных онкологических заболеваниях показали эффективность ПЦ, которая позволяет выявлять 1 опухолевую клетку из 10^4 нормальных клеток ($1/10^4$) [16].

В течение многих лет проводились исследования по оценке чувствительности и специфичности ПЦ для мониторинга МОБ при гемобластозах, раке молочной железы, а также при множественной миеломе, в которых была показана практическая значимость оценки МОБ с помощью многопараметрового цитометрического анализа для дальнейшей тактики лечения и прогноза заболевания [17–19].

Для некоторых заболеваний (например, острого лимфобластного лейкоза) метод ПЦ стандартизован как в отношении параметров (4 и более параметра), так и по временным точкам мониторинга МОБ [17, 20, 21].

Полимеразная цепная реакция

Применение метода RT-PCR для амплификации опухоль-специфичной/-ассоциированной мРНК показало его высокую чувствительность и специфичность, позволяя выявить 1 опухолевую клетку из 1×10^6 нормальных. Следует отметить, что, как и при других методах определения опухолевых клеток, выявление опухоль-специфичной/-ассоциированной мРНК свидетельствует о наличии диссеминированных опухолевых клеток, обладающих метастатическим потенциалом [22–24]. Проблема применения данного метода в реальной клинической практике связана с необходимостью выбора специфического генетического нарушения, связанного с опухолью; чаще

можно определять лишь опухоль-ассоциированные нарушения. Одна из основных задач при использовании RT-PCR — идентификация соответствующих целевых мРНК для определения МБ.

Для выявления клеток НБ с помощью RT-PCR предлагаются разные мишени, но в настоящее время единственная признанная мишень — мРНК тирозингидроксилазы, позволяющая идентифицировать 1 клетку НБ в 10^4 – 10^6 нормальных клеток [25, 26]. Однако до сих пор остается неясной клиническая эффективность этого подхода ввиду небольшой выборки, отсутствия контроля качества в исследованиях и единообразия при сборе материала, обработке результатов и их представлении. Преимущество QRT-PCR перед более традиционной качественной RT-PCR состоит в том, что она позволяет точно и количественно определить 1 или несколько мРНК в клинических образцах. Тем не менее определение тирозингидроксилазы в клинике для выявления клеток НБ не позволяет утвердить этот метод для рутинной практики, поскольку наличие экспрессии тирозингидроксилазы в нормальных тканях ограничивает чувствительность этого метода и требует уточняющих процедур для верификации диагноза.

Проточная цитометрия vs иммуноцитохимия vs количественная полимеразная цепная реакция

Поскольку стандартная цитологическая оценка аспиратов КМ является довольно субъективным методом, зависящим от опыта и профессиональной подготовки специалиста, а также обладает относительной чувствительностью (возможно обнаружение 1 опухолевой клетки из 100 нормальных), для выявления МОБ НБ уже более 2 десятилетий ведутся сравнительные исследования чувствительности других диагностических методов, изучается специфичность разных мишеней для оценки МОБ, разрабатываются новые диагностические подходы.

При многопараметровой ПЦ оценивают одновременно несколько маркеров, конъюгированных с различными флуорохромами. Например, J. Nagai и соавт. предложили комбинацию моноклональных антител CD9/CD81/CD56/CD45 для обнаружения циркулирующих клеток НБ [27]. CD9 является маркером, связывающимся с трансмембранным белком с молекулярной массой 24 кДа, который экспрессируется на тромбоцитах, предшественниках В-клеток, активированных и дифференцирующихся В-клетках, активированных Т-клетках, эозинофилах, базофилах, моноцитах, эндотелиальных и эпителиальных клетках и некоторых других типах клеток, при этом антиген CD9 определяется на клетках НБ.

Ранее было показано, что на опухолевых клетках НБ экспрессируется CD81 — маркер трансмембранного

белка с молекулярной массой 26 кДа (ТАРА-1), который участвует в процессах клеточного роста и сигнальной трансдукции. Кроме того, этот маркер экспрессируется на гемопоэтических клетках, а также на эндотелиальных и эпителиальных клетках. Хорошо изучена экспрессия маркера CD56, который также был обнаружен на поверхности клеток НБ. Моноклональные антитела CD56 связываются с гликозилированными изоформами антигена с молекулярной массой 175/220 кДа, который присутствует на поверхности больших гранулярных лимфоцитов, проявляющих киллерную активность, — натуральных киллерных клеток, отдельных субпопуляций CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток. При этом CD45 является маркером общего антигена лейкоцитов, который экспрессирован на всех лейкоцитарных клетках человека, включая лимфоциты, моноциты, гранулоциты, эозинофилы и тимоциты. Однако для специфической диагностики важно, что CD45 не обнаружен на клетках НБ [27].

M.J. Warzynski и соавт. оценивали несколько различных комбинаций маркеров [10]: CD45, CD56, CD81, моноклональные антитела против нейронспецифической энолазы (NSE) и против дизиалоганглиозида GD2. Было обнаружено, что дизиалоганглиозид GD2 экспрессируется на поверхности практически всех клеток НБ, при этом GD2 имеет очень высокую плотность экспрессии ($5-10 \times 10^6$ молекул/клетку). Помимо НБ, GD2 обнаруживается также на клетках других опухолей нейроэктодермального происхождения, таких как меланома, мелкоклеточный рак легкого, глиома. При этом GD2 не определялся на нормальных клетках КМ и периферической крови.

В сравнительном исследовании K. Swerts и соавт. [11] по обнаружению минимального остаточного количества клеток НБ определяли экспрессию различных комбинаций маркеров CD9, CD81, CD56, CD45 методом ПЦ и выявляли специфический маркер НБ GD2 с помощью иммуноцитохимии. Чувствительность ПЦ оценивали в модельных экспериментах с использованием различных соотношений нормальных и опухолевых клеток. Авторы обнаружили высокую степень корреляции результатов выявления клеток НБ обоими методами ($\chi^2 = 6,4$; $p = 0,011$). Несмотря на то что при анализе одинакового количества клеток ПЦ оказалась в 10 раз менее чувствительной, чем иммуноцитохимия, авторы считают ПЦ достаточно чувствительным методом для скрининга клинического материала с возможностью обнаружения 1 опухолевой клетки из 10^4-10^5 нормальных мононуклеарных клеток. Кроме того, ПЦ, являясь простым, быстрым и относительно недорогим методом, позволяет выявить остаточные опухолевые клетки в GD2-негативных образцах первичной опухоли.

В своей работе R. Esser и соавт. [28] изучали возможность применения ПЦ, чтобы восполнить ограничения диагностики НБ методом ПЦР, поскольку определение тирозингидроксилазы может давать ложноположительные результаты, так как этот маркер определяется также в нормальных тканях. Было проанализировано 857 образцов опухолевой ткани, аспирата КМ, стволовых клеток периферической крови, полученных от 65 пациентов с НБ методом традиционной RT-PCR, и 666 образцов — методом QRT-PCR. Помимо материала, полученного от пациентов с НБ, было проанализировано 84 образца от пациентов с другими заболеваниями и 354 образца от здоровых доноров в качестве контроля. Для сравнения точности получаемых результатов было проанализировано 132 образца методом многопараметровой ПЦ для выявления клеток НБ. Статистический анализ с помощью коэффициента каппа Коэна показал достаточно высокую степень корреляции результатов, полученных традиционной RT-PCR и QRT-PCR, RT-PCR и ПЦ, и среднюю степень корреляции между QRT-PCR и ПЦ. При этом ПЦР выявила экспрессию тирозингидроксилазы в исследуемых образцах от некоторых пациентов с саркомой Юинга, нефробластомой и рабдомиосаркомой, но в образцах материала здоровых доноров экспрессия тирозингидроксилазы не обнаружена. Фенотип клеток НБ оценивали как CD45⁻/CD9⁺/CD81⁺/CD56⁺/ch14:18⁺/GD2⁺, при этом точность детекции ПЦ достигала 0,002 % клеток НБ. В результате тщательного обсуждения полученных данных авторы пришли к заключению, что для выявления клеток НБ одного метода RT-PCR недостаточно, так как ложноположительные результаты, полученные в образцах материала от пациентов с другими заболеваниями, накладывают определенные ограничения на применение одного только этого метода. В данном случае дополнительным методом, позволяющим выявить остаточное количество клеток НБ, была ПЦ.

K.S. Tsang и соавт. [29], проводя сравнительное исследование по диагностике НБ в аспиратах КМ, костномозговых аутотрансплантатах и стволовых клетках периферической крови 27 детей, применяли многопараметровую цитометрию для выявления клеток с фенотипом CD45⁻/CD56⁺/CD81⁺ и RT-PCR для детекции тирозингидроксилазы. Авторы считают, что наличие опухолевого поражения КМ можно успешно определять с помощью полуколичественной RT-PCR, однако этот метод требует строгой стандартизации, калибровки и валидации. Применение ПЦ с моноклональными антителами CD45-FITC/CD81-PE/CD56-PECy5 позволило авторам автоматизировать количественную оценку клеток НБ в большом пуле гетерогенных клеток, рекомендуя данный метод в качестве простого, быстрого и воспроизводимого исследования

для выявления микрометастазов и скрытой диссеминации опухолевых клеток. Комбинация качественной RT-PCR по выявлению тирозингидроксилазы и QRT-PCR рассматривается в качестве эффективного подхода для оценки регрессии опухоли и мониторинга МОБ пациентов с НБ во время лечения.

Заключение

Таким образом, учитывая значимость задачи обнаружения минимального количества злокачественных кле-

ток НБ, которые не всегда можно выявить с помощью стандартных морфологических исследований крови и КМ, наряду с применением RT-PCR, ПЦ, FISH ведется поиск более чувствительных современных методов диагностики, а также оптимизация существующих методик. Несмотря на то что каждый из оцениваемых методов имеет свои преимущества, авторы акцентируют внимание на том, что именно многопараметровая ПЦ позволяет быстро и надежно определять единичные опухолевые клетки или микрометастазы НБ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Maris J.M., Hogarty M.D., Bagatell R., Cohn S.L. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369(9579):2106–20. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60983-0.
2. Matthay K.K., Maris J.M., Schleiermacher G. et al. Neuroblastoma. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16078. DOI: 10.1038/nrdp.2016.78.
3. Monclair T., Brodeur G.M., Ambros P.F. et al. INRG Task Force. The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 2009;27(2):298–303. DOI: 10.1200/JCO.2008.16.6876.
4. Swerts K., Ambros P.F., Brouzes C. et al. Standardization of the Immunocytochemical Detection of Neuroblastoma Cells in Bone Marrow. *J Histochem Cytochem* 2005;53(12):1433–40. DOI: 10.1369/jhc.5C6661.2005.
5. Beiske K., Burchill S.A., Cheung I.Y. et al. Consensus criteria for sensitive detection of minimal neuroblastoma cells in bone marrow, blood and stem cell preparations by immunocytology and QRT-PCR: recommendations by the International Neuroblastoma Risk Group Task Force. *Br J Cancer* 2009;100(10):1627–37. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605029.
6. Park J.R., Bagatell R., Cohn S.L. et al. Revisions to the International Neuroblastoma Response Criteria: A Consensus Statement From the National Cancer Institute Clinical Trials Planning Meeting. *J Clin Oncol* 2017;35(22):2580–7. DOI: 10.1200/JCO.2016.72.0177.
7. Wu Z., Schwartz E., Seeger R.C., Ladisch S. Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas. *Cancer Res* 1986;46(1):440–3.
8. Cheung N.K., Van Hoff D.D., Strandjord S.E., Coccia P.F. Detection of neuroblastoma cells in bone marrow using GD2 specific monoclonal antibodies. *J Clin Oncol* 1986;4:363–9.
9. Popov A., Druy A., Shorikov E. et al. Prognostic value of initial bone marrow disease detection by multiparameter flow cytometry in children with neuroblastoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145(2):535–42. DOI: 10.1007/s00432-018-02831-w.
10. Warzynski M.J., Graham D.M., Axtell R.A. et al. Flow cytometric immunophenotyping test for staging/monitoring neuroblastoma patients. *Cytometry* 2002;50(6):298–304. DOI: 10.1002/cyto.10159.
11. Swerts K., De Moerloose B.D., Dhooze C. et al. Detection of residual neuroblastoma cells in bone marrow: comparison of flow cytometry with immunocytochemistry. *Cytometry B Clin Cytom* 2004;61(1):9–19. DOI: 10.1002/cyto.b.20019.
12. Строганова А.М., Карселадзе А.И. Нейробластома: морфологическая структура, молекулярно-генетические особенности и прогностические факторы. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(1):32–43. [Stroganova A.M., Karseladze A.I. Neuroblastoma: morphological pattern, molecular genetic features, and prognostic factors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(1):32–43. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X.2016.3.132-43.
13. Somasundaram D.B., Aravindan S., Yu Z. et al. Droplet digital PCR as an alternative to FISH for MYCN amplification detection in human neuroblastoma FFPE samples. *BMC Cancer* 2019;19(1):106. DOI: 10.1186/s12885-019-5306-0.
14. Mandelia A., Agarwala S., Sharma A. et al. Assessment of fine needle aspiration cytology samples for molecular genetic analysis in neuroblastoma. *Pediatr Surg Int* 2013;29(11):1131–8. DOI: 10.1007/s00383-013-3370-0.
15. Villamyn E., Piqueras M., Mackintosh C. et al. Comparison of different techniques for the detection of genetic risk-identifying chromosomal gains and losses in neuroblastoma. *Virchows Arch* 2008;453(1):47–55. DOI: 10.1007/s00428-008-0633-6.
16. Coustan-Smith E., Sancho J., Behm F.G. et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;100(1):52–8. DOI: 10.1182/blood-2002-01-0006.
17. Гривцова Л.Ю., Лунина В.В., Семенова А.А. и др. Минимальная остаточная болезнь при плазмноклеточной (множественной) миеломе: проточно-цитометрические подходы. *Онкогематология* 2020;15(1):40–50. [Grivtsova L.Yu., Lunin V.V., Semenova A.A. et al. Minimal residual disease in plasma cell(multiple) myeloma: flow cytometric approaches. *Onkogematologia = Oncohematology* 2020;15(1):40–50. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2020-15-1-40-50.
18. Кузнецов С.А., Шубина И.Ж., Мамедова Л.Т. и др. Методы идентификации микрометастазов при злокачественных новообразованиях. *Онкогематология* 2016;11(1):75–9. [Kuznetsov S.A., Shubina I.Zh., Mamedova L.T. et al. Micrometastases identification in malignant tumors. *Onkogematologia = Oncohematology* 2016;11(1):75–9. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1818-8346-2016-11-1-75-79.
19. Rawstron A.C., Child J.A., de Tute R.M. et al. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013;31(20):2540–7. DOI: 10.1200/JCO.2012.46.2119.
20. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Иммунологическая оценка гемодилюции костного мозга при лабораторных исследованиях (на основании теста М. Локен). *Медицинский алфавит* 2015;4(18):67–70. [Grivtsova L.Yu., Tupitsyn N.N. Immunological evaluation of bone marrow hemodilution in laboratory studies (based on the test M. Loken). *Meditsinskiy alfavit = Medical Alphabet* 2015;4(18):67–70. (In Russ.)].

21. Rawstron A.C., Böttcher S., Letestu R. et al. Improving efficiency and sensitivity: European Research Initiative in CLL (ERIC) update on the international harmonised approach for flow cytometric residual disease monitoring in CLL. *Leukemia* 2013;27(1):142–9. DOI: 10.1038/leu.2012.216.
22. Taback B., Hoon D.S.B. Circulating nucleic acids and proteomics of plasma/serum: clinical utility. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1022:1–8. DOI: 10.1196/annals.1318.002.
23. Zeerleder S. The struggle to detect circulating DNA. *Crit Care* 2006;10(3):142. DOI: 10.1186/cc4932.
24. O'Driscoll L. Extracellular nucleic acids and their potential as diagnostic, prognostic and predictive biomarkers. *Anticancer Res* 2007;27(3A):1257–65. PMID: 17593617.
25. Ootsuka S., Asami S., Sasaki T. et al. Useful markers for detecting minimal residual disease in cases of neuroblastoma. *Biol Pharm Bull* 2008;31(6):1071–4. DOI: 10.1248/bpb.31.1071.
26. Träger C., Vernby A., Kullman A. et al. mRNAs of tyrosine hydroxylase and dopa decarboxylase but not of GD2 synthase are specific for neuroblastoma minimal disease and predicts outcome for children with high-risk disease when measured at diagnosis. *Int J Cancer* 2008;123(12):2849–55. DOI: 10.1002/ijc.23846.
27. Nagai J., Ishida Y., Koga N. et al. A new sensitive and specific combination of CD81/CD56/CD45 monoclonal antibodies for detecting circulating neuroblastoma cells in peripheral blood using flow cytometry. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22(1):20–6. DOI: 10.1097/00043426-200001000-00004.
28. Esser R., Glienke W., Bochennek K. et al. Detection of neuroblastoma cells during clinical follow up: advanced flow cytometry and rt-PCR for tyrosine hydroxylase using both conventional and real-time PCR. *Klin Padiatr* 2011;223(6):326–31. DOI: 10.1055/s-0031-1287842.
29. Tsang K.S., Li C.K., Tsoi W.C. et al. Detection of micrometastasis of neuroblastoma to bone marrow and tumor dissemination to hematopoietic autografts using flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer* 2003;97(11):2887–97. DOI: 10.1002/cncr.11389.

Вклад авторов

И.Ж. Шубина: концепция статьи, сбор и интерпретация данных, написание текста рукописи, подготовка статьи;

Н.А. Бурлака: сбор, анализ данных и подготовка текста статьи;

А.П. Казанцев: анализ и интерпретация данных;

Ю.И. Должикова, А.А. Петкевич: сбор данных и подготовка текста статьи;

К.И. Киргизов: анализ и интерпретация данных, внесение принципиальных дополнений;

М.В. Киселевский: дизайн статьи, анализ и интерпретация данных, внесение принципиальных дополнений.

Author contribution

I.Zh. Shubina: concept of the article, data collection and interpretation, writing the text of the manuscript, preparation of the article;

N.A. Burlaka: collection, analysis of the data and text preparation;

A.P. Kazantsev: data analysis and interpretation;

Yu.I. Dolzhikova, A.A. Petkevich: data collection and text preparation;

K.I. Kirgizov: analysis and interpretation of the data, text preparation;

M.V. Kiselevskiy: article design, data analysis and interpretation, final revision.

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Н.А. Бурлака / N.A. Burlaka: <https://orcid.org/0000-0002-3289-223X>

А.П. Казанцев / A.P. Kazantsev: <https://orcid.org/0000-0001-7309-1650>

Ю.И. Должикова / Yu.I. Dolzhikova: <http://orcid.org/0000-0003-2138-7323>

А.А. Петкевич / A.A. Petkevich: <http://orcid.org/0000-0001-7722-9821>

К.И. Киргизов / K.I. Kirgizov: <https://orcid.org/0000-0002-2945-284X>

М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <http://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: 08.08.2021. Принята к публикации: 27.08.2021.

Article submitted: 08.08.2021. Accepted for publication: 27.08.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-17-24>

Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 1)

О.А. Бочарова¹, В.Б. Матвеев¹, Е.В. Бочаров¹, Р.В. Карпова¹, В.Г. Кучеряну²

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

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

Контакты: Ольга Алексеевна Бочарова imufarm@rambler.ru

Цель обзора – представление концепции о том, что ключевым механизмом опухолевого процесса является нарушение адгезионных взаимодействий с участием местных и центральных механизмов. В первой его части рассматриваются местные особенности адгезионной дисрегуляции. Недостаточность экспрессии гистоспецифических молекул адгезии, возникающая в результате стрессорного воздействия или генетической мутации, вызывает повреждение важного механизма противоопухолевой защиты ткани, нарушая процессы пролиферации и дифференцировки. Дефицит гистонеспецифических молекул гомотипической адгезии, возникающий намного позже, усугубляет нарушения. Это приводит, во-первых, к снижению экспрессии лигандов семейства β_2 -лейкоцитарных интегринов (LFA-1, Mac-1) на поверхности эффекторов иммунитета, а во-вторых – к усилению на опухолевых клетках экспрессии молекул адгезии к субстрату – антигенов поздней активации VLA (very late activation) семейства β_1 -интегринов. Первое ограничивает взаимодействие молекул семейства ICAM с их контррецепторами из семейства β_2 -интегринов, снижая элиминацию клеток-мишеней эффекторами иммунитета, что вносит вклад в экранирование опухоли от противоопухолевого надзора. Второе способствует инвазии опухоли в окружающие ткани, формированию сосудов, а также ее гетеротипической адгезии с другими тканями, что еще больше стимулирует процессы пролиферации и подавление апоптоза клеток опухоли. Так, молекулы адгезии можно сравнить с птицей Феникс: исчезая в начале процесса (между «родными» клетками), они в новом качестве возникают вновь (усиливая адгезию к чужим клеткам), наращивая тоталитаризм опухоли. Следует учесть, что клетки опухоли из-за адгезионной дисрегуляции «изолируются от общества», теряют свою дифференцировку, утрачивая свою зрелость и «впадая в детство», будучи не в состоянии осуществлять специфические, «взрослые» функции. Поэтому онкозаболевание можно рассматривать как проявление старения отдельных клеток.

Активизация антистрессорных, эндогенных геропротекторных механизмов, в основе которой лежит коррекция адгезионных механизмов, может быть эффективна для предупреждения и сдерживания онкологического процесса.

Ключевые слова: клеточная адгезия, опухоль, канцерогенез, интегрины, метастазирование, иммунитет, хронический стресс, старение, дофамин

Для цитирования: Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Бочаров Е.В. и др. Адгезионная концепция в биологии рака: местные и центральные механизмы (часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):17–24. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-17-24.

Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 1)

Olga A. Bocharova¹, Vsevolod B. Matveev¹, Evgeniy V. Bocharov¹, Regina V. Karpova¹, Valerian G. Kucheryanu²

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

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

Contacts: Olga Alekseevna Bocharova imufarm@rambler.ru

The review presents the concept the key mechanism of the tumor process is a violation of adhesion interactions involving local and central mechanisms. Local features of adhesive dysregulation are demonstrated in the first

part. The lack of histospecific adhesion molecules expression resulting from stress or genetic mutation damages an important mechanism of antitumor protection of the tissue disrupting the processes of proliferation and differentiation. The deficiency of histone-specific homotypic adhesion molecules which occurs later exacerbates the disorders. This leads to a decrease in the expression of leukocyte integrins (LFA-1, Mac-1) ligands of the β_2 family on the surface of immune effectors and to an increase also in the expression of adhesion molecules to the substrate-antigens VLA (very late activation) family of β_1 -integrins on tumor cells. The first restricts the interaction of ICAM family molecules with their contra-receptors from the β_2 -integrin family reducing the elimination of target cells by immune effectors which contributes to the screening of the tumor from antitumor surveillance. The second promotes the invasion of the tumor into the surrounding tissues, the formation of blood vessels as well as its heterotypic adhesion with other tissues which further stimulates the proliferation and suppression processes of tumor cells apoptosis. So, the adhesion molecules can be compared to the Phoenix bird: disappearing at the beginning of the process (between the similar cells), they reappear in a new quality (increasing adhesion to cells of other tissues), increasing the totalism of the tumor. It should be taken into account that tumor cells due to adhesion dysregulation "isolate themselves from society", lose their differentiation, their maturity and "fall into childhood", being unable to perform specific, "adult" functions. So, cancer can be considered as a manifestation of the cells aging. Therefore, the anti-stress, endogenous geroprotective mechanisms activation based on the adhesion correction can be effective for preventing and treatment the oncological process.

Key words: cell adhesion, tumor, carcinogenesis, integrins, metastasis, immunity, chronic stress, aging, dopamine

For citation: Bocharova O.A., Matveev V.B., Bocharov E.V. et al. Adhesion concept in cancer biology: local and central mechanisms (part 1). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):17–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-17-24.

Введение

Онкология располагает обширной информацией о путях возникновения, клеточно-органных и молекулярно-генетических механизмах развития рака, а также о возможностях комплексного лечения онкологических заболеваний с использованием хирургии, химиолучевой, таргетной, иммуно- и вакцинотерапии. Однако заболеваемость и смертность от рака по всему миру растет угрожающими темпами [1, 2]. Немало научной литературы посвящено серьезным опасениям по поводу достоинств циторедуктивных подходов лекарственного лечения, которое токсично и дорогостояще [3–5]. Вместе с тем на сегодняшнем этапе развития науки имеются существенные знания о различных нарушениях при опухолевом процессе (экспрессия онкогенов и цитокинов, факторы апоптоза, лекарственной резистентности, ангиогенеза, дефицит иммунореактивности и др.). В связи с этим множество выявленных особенностей опухолевой клетки пытаются использовать в качестве мишеней противоопухолевой терапии. В большинстве заявленных методов «таргетной» терапии при раке — препараты, имеющие направленность ингибиторов тех или иных, отдельных или комбинированных нарушений экспрессии белков, таких как ростовые факторы, цитокины/хемокины, молекулы рецепторов/адаптеров или ферментов (Kras, BCR, P13K, CD11, Muc, BRCA2, ALK, IL-10, IL-12, p27, p53, p70, VEGF, MAPKs, TKIs и т.д.), идентифицированных в молекулярном «цунами» опухолевых мутаций. Иными словами, за молекулярные мишени принимают мутированные компоненты гетерогенного и хаотичного «ландшафта» генома раковой клетки [6]. Однако

эти многочисленные «подробности» особенностей опухолевой клетки проблематично рассматривать в качестве мишеней противоопухолевой терапии. Это связано с тем, что они не имеют ключевого, или самостоятельного, значения при возникновении опухолевой клетки, хотя и могут срабатывать на моделях экспериментальных животных в определенных условиях и при продолжительной терапии, которая к человеку имеет иногда слабое отношение [7, 8].

Кроме того, многие ученые высказываются в пользу того, что будущее онкологической науки и противоопухолевой терапии должно лежать в области активизации защитных механизмов организма вообще и восстановления иммунологического надзора в частности. Это послужит более эффективной элиминации опухолевых клеток. Вместе с тем в 2014 г. Международное агентство по изучению рака сообщило, что глобальная война против рака не может быть выиграна одной только терапией, и рекомендовало внедрение эффективных стратегий профилактики для предотвращения онкологического кризиса [9]. Однако в данном случае смущает глобальность и неконкретность этих общих планов.

Иными словами, ни один из многочисленных вышеперечисленных факторов нельзя считать специфическим, самостоятельным, ключевым, таким, при подавлении которого можно предотвратить или остановить опухолевый процесс. В то же время слишком общие рассуждения про активизацию защитных механизмов организма не имеют четкого направления. Следовательно, с одной стороны, нет конкретного понимания того, каким образом опухолевая клетка координирует и связывает огромное

число событий, «умело» используя «предательскую» помощь своего окружения в организме хозяина для его же уничтожения. С другой стороны, в связи с этим сложно наметить превентивные и терапевтические лекарственные пути эффективного выхода из этой ситуации [10, 11].

Наш обзор посвящен адгезионной концепции опухолевого процесса, а также перспективам профилактики и противоопухолевой терапии на этом основании.

Адгезия – птица Феникс злокачественного роста

Нарушение дифференцировки клеток при потере контроля над пролиферативными процессами уже давно считают неотъемлемой чертой опухолевых клеток. Пристального внимания заслуживает тот факт, что при этом клетки опухоли утрачивают взаимодействие друг с другом, с эффекторами иммунитета и, как следствие, со всем организмом. На основании накопленных к настоящему времени результатов исследований нарушение адгезионных взаимодействий мы можем рассматривать в качестве ключевого механизма неоплазии [12, 13].

Адгезионные взаимодействия клеток в ткани-мишени могут нарушаться при мутациях. Мутагеном может быть любой стрессорный фактор: токсический, лучевой и т. п. На первом этапе происходит нарушение гомотипической адгезии между клетками ткани. Это может быть результатом потери или подавления, например, единственного аллеля (нулевой гомозиготности, или гемизиготности) гена гликопротеина – «контактина» (вероятно, из семейства кадхеринов) – в клетках ткани, генетически предрасположенной к развитию опухолей. Данный ген специфически регулирует межклеточные взаимодействия в данной ткани, ее дифференцировку, способствует сохранению постоянства клеток здоровой ткани [14]. В нормальной, устойчивой к опухолеобразованию ткани в клетках присутствуют оба аллеля «контактина». Соответственно, повредить клетку по этому признаку сложнее [15]. Содержание «контактина» при этом максимально в период завершения дифференцировки и перехода к активному функционированию данной ткани, однако с возрастом, в процессе старения оно снижается [16].

Ослабление адгезионных контактов между клетками связано с дефицитом, в первую очередь, гистоспецифических, а затем и гистонеспецифических (например, из семейства ICAM сверхсемейства иммуноглобулинов) молекул гомотипической адгезии [17–19]. Недостаточность гистоспецифических молекул адгезии повреждает, вероятно, важный механизм противоопухолевой защиты в ткани, нарушая регуляцию процессов пролиферации и дифференци-

ровки [14, 15, 20]. Дефицит гистонеспецифических молекул гомотипической адгезии, возникающий намного позже, усугубляет ослабление контактных взаимодействий клеток опухоли [21–23]. Это приводит, во-первых, к снижению экспрессии соответствующих лигандов из семейства β_2 -лейкоцитарных интегринов (например, LFA-1, Mac-1) на поверхности эффекторов иммунитета [24–26], а во-вторых – к усилению на мембранах опухолевых клеток экспрессии молекул адгезии к субстрату, например антигенов поздней активации VLA (very late activation) и цитоадгезинов из семейства β_1 -интегринов [27–29]. Первое ограничивает взаимодействие молекул из семейства ICAM с их контррецепторами из семейства β_2 -интегринов, снижая элиминацию клеток-мишеней, например натуральными киллерами и цитотоксическими лимфоцитами, что вносит существенный вклад в экранирование опухоли от противоопухолевого надзора [30, 31]. Второе способствует инвазии опухоли в окружающие ткани, формированию ее сосудистой сети (путем усиления экспрессии, например, молекул VCAM), а также ее гетеротипической адгезии с другими тканями, что еще в большей степени индуцирует процессы пролиферации и еще большее подавление апоптоза. Вместе с тем по линии обратной связи поддерживается дополнительное разобщение клеток опухоли, что может привести к образованию разрозненных метастатических клеток, например в асцитической жидкости [32–34]. Таким образом, возникают метастазы, которые при усилении адгезионной дисрегуляции усугубляют ускользание опухоли от иммунологического надзора и контроля пролиферации, беспрепятственно захватывая новые питающие их субстраты – подлежащие и другие ткани, что в конечном итоге приводит к гибели организма.

Следовательно, нарушение адгезивных взаимодействий в ткани-мишени создает сначала местные, а потом и общие условия для развития новообразования. Иными словами, дефицит гистоспецифического адгезионного фактора на начальных этапах развития неоплазии, запуская каскад патологических реакций, приводит к более сложным нарушениям адгезии, которые, в свою очередь, являются критическими для «тоталитарного» поведения опухоли. В самом деле, молекулы адгезии при опухолевом росте можно сравнить с птицей Феникс: исчезая в начале процесса (между «родными клетками»), они в новом качестве возникают вновь (усиливая адгезию к чужим клеткам), изошренно наращивая «оккупацию» органов и тканей организма раковыми клетками [27]. Поэтому, согласно выдвигаемой гипотезе, нарушение адгезивных взаимодействий между клетками играет роль ключевого звена опухолевого процесса, так как обеспечивает основные свойства опухоли: подавление контроля пролиферации в ткани,

анаплазию, инвазию, метастазирование и ускользание от иммунологического надзора [12].

Справедливость выдвигаемой концепции

В защиту предлагаемой гипотезы можно привести следующие доводы. Во-первых, сложно найти какой-либо другой фактор (экспрессия онкогенов, процессы апоптоза, рецепция факторов роста, активность ферментов и др.), нарушение которого объясняло бы все этапы канцерогенеза. Во-вторых, опираясь на эту гипотезу, можно объяснить развитие опухоли, как правило, в одном органе и различное поведение метастазирования для опухолей разных локализаций (в связи с существованием индивидуального β_1 -интегринового профиля в виде комбинаторно различных комбинаций молекул VLA) [35, 36]. Поэтому некоторые авторы расценивают экспрессию молекул VLA-интегринов в качестве наиболее важного (по сравнению с комплексом других используемых параметров — клинических, гистологических, биохимических и др.) маркера для прогноза опухолевого процесса [37]. В-третьих, снижение уровня адгезионных взаимодействий между клетками в ткани является специфическим свойством именно опухолевого процесса (патологии с увеличением клеточной массы ткани). При патологических процессах с потерей клеточной массы органа, таких как воспаление, деструктивные процессы, отмечается усиление межклеточной адгезии и, соответственно, повышение в ответ на медиаторы воспаления (провоспалительные цитокины, гормоны, клеточный стресс, инфекции) экспрессии молекул ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, Mac-1. С этим связаны увеличение хелперно-супрессорного ($CD4^+/CD8^+$) соотношения, активация натуральных киллеров, моноцитов, нейтрофилов [38–40]. Подавление высокого уровня экспрессии этих молекул с использованием моноклональных антител, а также глюкокортикоидов и кортикостероидов приводит к лечебному эффекту, который выражается в снижении воспалительной реакции [41, 42]. В случаях регрессии злокачественной опухоли на мембранах ее клеток определена повышенная экспрессия, например, ICAM-1 при множественной инфильтрации опухоли лейкоцитами, в том числе цитотоксическими Т-лимфоцитами [43–45].

Эволюционная база концепции

Справедливость данной концепции может быть также подтверждена эволюционной взаимосвязью молекул кадхеринов («контактинов», гистоспецифически опосредующих контактные взаимодействия клеток путем объединения их цитоскелетов в единые гистосистемы, что является фундаментом гисто- и органогенеза); CJM (cell junction molecules), участвующих в формировании сложных межклеточных контактов;

ICAM (гистонеспецифически участвующих в поддержании тканевой интеграции и служащих лигандами молекул лейкоцитарных β_2 -интегринов); β_1 -интегринов, обеспечивающих гетеротипическую адгезию к другим тканям; IgG; рецепторов факторов роста; белков главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, которые необходимы для обеспечения реакций именно клеточного иммунитета. Иммуноглобулины и другие перечисленные выше молекулы кодируются генами вариабельных и константных участков, возникшими в ходе эволюции в результате дубликации исходного предшественника, который весьма похож на ген одной из молекул кадхеринов [36, 46].

Основные функции адаптивной иммунной системы, вероятно, возникли из более древней системы клеточной адгезии, которая отвечала за регуляцию движения клеток и пространственную тканевую организацию. На регулируемых контактных взаимодействиях между клетками основываются и функции лимфоцитов. Эта регуляция, в свою очередь, зависит от специфических механизмов связывания, ведущих свое начало от древней системы клеточной адгезии [17]. Определяющую роль в поддержании высокой дифференцированности органов и тканей, а следовательно, целостности и гомеостаза организма, играют молекулы адгезии, способствующие эволюционному переходу одноклеточных организмов к многоклеточным и возникновению адаптивной иммунной системы позвоночных.

Значение концепции

Концепция о ключевой роли нарушения адгезии при развитии злокачественных новообразований имеет теоретическое и практическое значение. Во-первых, она не противоречит идее многофакторности и многоступенчатости процесса опухолеобразования. Практически все известные и существенные для канцерогенеза звенья, механизмы и факторы можно выстроить в единую систему молекулярных сигналов, изначально зависимых от адгезивных нарушений и поэтапно приводящих к поломкам адгезии нового уровня, запускающим новый виток контактных дисрегуляций.

Во-вторых, она снимает главные критические замечания в адрес теории иммунобиологического надзора Ф. Бернета, которая не объясняет несостоятельность иммунореактивности против опухолей. Так, у бестимусных мышей (nude) частота возникновения опухолей такая же, как и у обычных животных; в «забарьерных» органах (ЦНС, передняя камера глаза, семенники и др.) опухоли возникают не чаще, чем в других областях организма; во всех случаях иммунодефицита системы Т-лимфоцитов должны были бы возникать множественные поликлональные опухоли,

однако опухоли развиваются, как правило, в одной ткани, и они моноклональны; иногда малое число опухолевых клеток прививается у новых хозяев лучше, чем большее их число; при некоторых состояниях с продолжительной иммуносупрессией (лепра, саркоидоз, уремия) не наблюдается увеличения частоты развития опухолей и т. п. [37].

Наконец, с позиций выдвигаемой гипотезы можно объяснить недостаточную эффективность клинической онкологии, которая использует, с одной стороны, методы «уничтожения» самой опухоли, или циторедуктивные методы (хирургия, химиолучевая терапия), а с другой — иммуномодуляторы (интерфероны, интерлейкины) и вакцины (дендритные, «персонифицированные», точечные и др.) для усиления иммунитета против опухоли. Даже при радикальном удалении опухолевого узла оставшаяся здоровая ткань продолжает быть дефектной по адгезионному фактору и является источником возникновения опухоли в будущем. В случае нерадикальной операции при микроинвазиях и микрометастазах опухолевые клетки, лишённые «посадочных площадок» для эффекторов иммунитета, активно «цепляясь» за полноценные субстраты других органов и тканей, усиленно размножаются с прогрессирующим подавлением апоптоза, иммунореактивности и усугублением лекарственной устойчивости. Вполне понятно, почему химиопрепараты, цитокины и вакцины не могут в полной мере преодолеть эту цепь событий.

Несмотря на достижения в разработке способов лечения опухолевых заболеваний, его успешность, вероятно, лимитируется отсутствием эффективных средств, обладающих адгезиогенным действием. В ряде исследований получены обнадеживающие результаты: экспериментальная реверсия клеток рака предстательной железы с помощью молекулы адгезии C-CAM [47]. Кроме того, при использовании аденовирусного вектора, обеспечивающего трансдукцию ICAM-2 в клетки метастатического рака желудка, усиливалась адгезия и активность натуральных киллеров в отношении опухолевых клеток, результатом чего явилось подавление метастазирования [48].

Вместе с тем усиление экспрессии молекул гетеротипической адгезии лейкоцитарных интегринов LFA-1 (CD11a/CD18) и Mac-1 (CD11b/CD18) на иммунных эффекторах периферической крови мышей со спонтанными гепатокарциномами (под влиянием комплексного фитоадаптогена, который обладает адгезиогенным действием) способствовало миграции эффекторов иммунитета в опухолевые узлы. В результате выявлена инфильтрация и деструкция гепатокарцином цитотоксическими Т-лимфоцитами, экспрессирующими корцепторы CD8, CD11a, CD11b [49]. При этом достигнуто снижение частоты возникновения, размеров опухолей, а также повышение

выживаемости (на 30 %) и качества жизни животных [50].

Повышение экспрессии молекул адгезии CD54 на поверхности эпителиоцитов слизистой оболочки полости рта у больных лейкоплакией (как предопуховым заболеванием) при воздействии комплексного фитоадаптогена приводило к лизису патологического очага в результате активизации иммунных эффекторов. При этом на лимфоцитах крови наблюдалась усиленная экспрессия контррецептора CD54 (ICAM-1) лейкоцитарного интегрин CD11b/CD18 (Mac-1). Действительно, у пациентов с оральной лейкоплакией нормализовались показатели иммунного статуса: увеличилось общее число Т-лимфоцитов (CD3), хелперов-индукторов (CD4), возросло хелперно-супрессорное соотношение (CD4/CD8), повысилось число натуральных киллеров (CD16). Полученные данные сочетались с положительной динамикой показателей интерферонового статуса. Так, повышение уровня интерферона γ сопровождалось ростом числа натуральных киллеров, Т-хелперов-индукторов, снижением Т-супрессоров, нормализацией моноцитарного пула [51]. При этом клиническая картина выражалась в полном выздоровлении в 17 % случаев. У большинства больных (56 %) под влиянием лечения зафиксирована положительная динамика: уменьшение размеров и плотности очага гиперкератоза, активация регенераторных процессов, полная эпителизация эрозивной поверхности; отсутствие динамики — у 27 %. В группе сравнения при лечении препаратами витамина А клиническое выздоровление отмечено у 8 % больных, положительная динамика — у 27 % больных, отсутствие динамики — у 65 % [52, 53].

Усиление экспрессии лейкоцитарного интегрин CD11b при распространенном раке желудка при воздействии комплексного фитоадаптогена сочеталось со снижением уровня опухолевых маркеров, повышенного уровня гормона стресса кортизола, нормализацией иммунного, антиоксидантного статуса. Этим, вероятно, обусловлено и увеличение продолжительности жизни больных с данной патологией, которая возросла практически в 2,5 раза по сравнению с контрольной группой [54, 55].

В данном случае следует подчеркнуть, что противоопухолевые эффекты получены с помощью препаратов, в состав которых входят фитоадаптогены, обладающие адгезиогенным действием [56, 57].

Кроме того, оценка уровня экспрессии адгезионных молекул может иметь диагностическое значение. Представляется перспективным определение β_1 -интегринового профиля для опухоли каждой локализации. Варианты комбинаций экспрессии разных β_1 -интегринов (VLA), очевидно, позволят улучшить возможности прогноза и диагностики, в том числе для выявления источника метастазов при неопределённом

первичном очаге опухоли. Существенное значение для профилактики и лечения метастазов может иметь поиск препаратов и воздействий, подавляющих адгезию к субстрату (например, с помощью антител или соответствующих лигандов к определенным молекулам, путем нарушения экспрессии их рецепторов с использованием генных «нокаутов» или «антисмысловой» стратегии, а также с помощью неспецифических факторов) [41, 58].

Иными словами, различные адгезионные молекулы на поверхности опухолевых клеток, обеспечивающие взаимодействие с экстрацеллюлярным матриксом и способствующие метастазированию, являются факторами прогноза прогрессии опухолей и также могут быть важными мишенями для воздействия лекарственной терапии [59, 60]. Таким образом, выдвигаемая концепция создает перспективу для поиска новых способов диагностики, профилактики и лечения опухолей.

Рак – стремительное старение клеток

Вместе с тем нельзя забывать, что в онкологической науке с ее несомненными успехами и пониманием тонких молекулярных механизмов канцерогенеза были и разочарования, связанные с несостоятельностью различных теорий, концепций и идей. В дан-

ном случае, вероятно, также не следует обольщаться, поскольку, согласно теоретическим основам обсуждаемой концепции, онкологическое заболевание можно расценивать как стремительное старение клеток ткани или органа. Клетки опухоли – это клетки, которые из-за адгезионной дисрегуляции «изолировались от общества», потеряли свою дифференцировку, утратив свою зрелость, «впали в детство», будучи не в состоянии осуществлять специфические «взрослые» функции. Поэтому онкологическое заболевание можно рассматривать как проявление старения отдельных клеток.

Заключение

Следовательно, проблему рака можно отнести к загадкам биологии развития и старения организма. Получается, что ее решение требует «бесконечных усилий». Однако в данном случае все же можно рассчитывать на некоторый шанс, который может дать регуляция эндогенных механизмов, способствующая долголетию и торможению процессов старения. Иными словами, активизация антистрессорных, эндогенных геропротекторных механизмов, в основе которой лежит коррекция адгезионных механизмов, может быть эффективна для предупреждения и сдерживания онкологического процесса.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Макибетов Э.К., Салихар Р.И., Туманбаев А.М. и др. Эпидемиология рака в мире. Современные проблемы науки и образования 2020;2:168. [Makimbetov E.K., Salihar R.I., Tumanbaev A.M. et al. Cancer epidemiology in the world. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education 2020;2:168. (In Russ.)]. DOI: 10.17513/spno.29718.
- Khatami M. Cancer statistics and concerns for safety of drugs or vaccines: increased population of drug-dependent sick society! In: Inflammation, aging and cancer. Springer, Cham, 2017. Pp. 213–260. DOI: 10.1007/978-3-319-66475-0_5.
- Mayer R.J. Targeted therapy for advanced colorectal cancer – more is not always better. N Engl J Med 2009;360(6):623–5. DOI: 10.1056/NEJMe0809343.
- Tol J., Koopman M., Cats A. et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 2009;360(6):563–72. DOI: 10.1056/NEJMoa0808268.
- Hensley M.L. Big costs for little gain in ovarian cancer. J Clin Oncol 2011;29(10):1230–2. DOI: 10.1200/JCO.2010.34.0489.
- Vogelstein B., Papadopoulos N., Velculescu V.E. et al. Cancer genome landscapes. Science 2013;339(6127):1546–58. DOI: 10.1126/science.1235122.
- Weinberg R.A. The Biology of Cancer. New York: Garland Science Taylor and Francis Group, 2007. Pp. 479–483.
- Khatami M. Immune surveillance in health and diseases of aging: definitions of acute and chronic inflammation [Yin and Yang]. In: Inflammation, aging and cancer. Springer, Cham, 2017. Pp. 37–89. DOI: 10.1007/978-3-319-66475-0_2.
- Maeda H., Khatami M. Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs. Clin Transl Med 2018;7(1):11. DOI: 10.1186/s40169-018-0185-6.
- Bogenrieder T., Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. Oncogene 2003;22(42):6524–36. DOI: 10.1038/sj.onc.1206757.
- Lambert A.W., Weinberg R.A. Emerging Biological Principles of Metastasis. Cell 2017;168(4):670–91. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.037.
- Бочарова О.А. Профилактическая онкология и фитоадаптогены. Вестник ПАМН 2009;64(7):41–5. [Bocharova O.A. Prophylactic oncology and phytoadaptation. Vestnik RAMN = Herald of the Russian Academy of Sciences 2009;64(7):41–5. (In Russ.)].
- Wong S.H.M., Fang C.M., Chuah L.H. et al. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. Crit Rev Oncol Hematol 2018;121:11–22. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2017.11.010.
- Бочарова О.А., Модянова Е.А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онтогенезе у мышей инбредных линий с высокой и низкой частотой спонтанных гепатом. Онтогенез 1982;13(4):427–30. [Bocharova O.A., Modjanova E.A. Changes in intercellular contacts of hepatocytes in ontogenesis in mice of inbred lines with high and low frequency of spontaneous hepatitis. Ontogenez = Ontogenesis 1982;13(4):427–30. (In Russ.)].
- Модянова Е.А., Бочарова О.А., Маленков А.Г. Профилактическое действие контактин-кейлонов на аспонтанный канцерогенез у линейных мышей. Экспериментальная онкология 1983;5(3):39–42. [Modjanova E.A., Bocharova O.A., Malenkov A.G. Preventive effect of contactin-keylons

- on spontaneous carcinogenesis in linear mice. *Экспериментальная онкология = Experimental Oncology* 1983;5(3):39–42. (In Russ.).]
16. Petrova Y.I., Schecterson L., Gumbiner B.M. Roles for E-cadherin cell surface regulation in cancer. *Mol Biol Cell* 2016;27(21):3233–44. DOI: 10.1091/mbc.E16-01-0058.
 17. Edelman G.M. *Topobiology*. Sci American 1989;260(5):76–88. DOI: 10.1038/scientificamerican0589-76.
 18. Jeanes A., Gottardi C.J., Yap A.S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene* 2008;27(55):6920–9. DOI: 10.1038/onc.2008.343.
 19. Ebnet K., Kummer D., Steinbacher T. et al. Regulation of cell polarity by cell adhesion receptors. *Semin Cell Dev Biol* 2018;81:2–12. DOI:10.1016/j.semcdb.2017.07.032.
 20. Mendonsa A.M., Na T.Y., Gumbiner B.M. E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* 2018;37(35):4769–80. DOI: 10.1038/s41388-018-0304-2.
 21. Голенков А.К., Митина Т.А., Новиков В.В. и др. Клиническое значение растворимых молекул адгезии (sCD50-ICAM-3), апоптоза (sCD95) и sHLA I класса при лимфопролиферативных заболеваниях. *Российский биотерапевтический журнал* 2002;1(1):60–4. [Golenkov A.K., Mitina T.A., Novikov V.B. et al. Clinical significance of soluble adhesion molecules (cd50-ICAM-3), apoptosis (cd95), and class I HLA in lymphoproliferative diseases. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2002;1(1):60–4. (In Russ.).]
 22. Shirai A., Furukawa M., Yoshizaki T. Expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 2003;113(11):1955–60. DOI: 10.1097/00005537-200311000-00019.
 23. Spizzo G., Went P., Dirnhofer S. et al. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) is an independent prognostic marker for reduced survival of patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;103(2):483–88. DOI: 10.1016/j.ygyno.2006.03.035.
 24. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. β_2 -интегрины LFA-1 и Mac-1 – мишень для усиления иммунитета против опухоли. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(1):53–8. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. The β_2 integrins LFA-1 and Mac-1 are targets for enhancing immunity against tumors. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(1):53–8. (In Russ.).] DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-53-58.
 25. Enns A., Gassmann P., Schlüter K. et al. Integrins can directly mediate metastatic tumor cell adhesion within the liver sinusoids. *J Gastrointest Surg* 2004;8(8):1049–59. DOI: 10.1016/j.gassur.2004.08.016.
 26. Maksan S.M., Araib P.M., Ryschin E. et al. Immune escape mechanism: defective resting and stimulated leukocyte-endothelium interaction in hepatocellular carcinoma of the rat. *Dig Dis Sci* 2004;49(5):859–65. DOI: 10.1023/b:ddas.0000030100.05979.b7.
 27. Ilyas M. Adhesion molecules expression in breast cancer: the phoenix in tumour metastasis? *J Pathol* 2000;190(1):3–5.
 28. Takatsuki H., Komatsu S., Sano R. et al. Adhesion of gastric carcinoma cells to peritoneum mediated by alpha3beta1 integrin (VLA-3). *Cancer Res* 2004;64(17):6065–70. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-0321.
 29. Garcia-Martin A.B., Zwicky P., Gruber T. et al. VLA-4 mediated adhesion of melanoma cells on the blood-brain barrier is the critical cue for melanoma cell intercalation and barrier disruption. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019;39(10):1995–2010. DOI: 10.1177/0271678X18775887.
 30. Kawaguchi T. Cancer metastasis: characterization and identification of the behavior of metastatic tumor cells and the cell adhesion molecules, including carbohydrates. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2005;5(1):39–64.
 31. Zhou J., Sargiannidou I., Tuszyński G. The role of adhesive proteins in the hematogenous spread of cancer. *In Vivo* 2000;14(1):199–208.
 32. Liu K., Caldwell S.A., Abrahams S.I. Cooperative disengagement of Fas and intercellular adhesion molecule-1 function in neoplastic cells confers enhanced colonization efficiency. *Cancer Res* 2005;65(3):1045–54.
 33. Oshita F., Kameda Y., Hamanaka N. et al. High expression of integrin beta1 and p53 is a greater poor prognostic factor than clinical stage in small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* 2004;27(3):215–9. DOI: 10.1097/01.coc.0000054894.64867.80.
 34. Kong D.H., Kim Y.K., Kim M.R. et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):1057. DOI: 10.3390/ijms19041057.
 35. Ahmed N., Riley C., Rice G., Quinn M. Role of integrin receptors for fibronectin, collagen and laminin in the regulation of ovarian carcinoma functions in response to a matrix microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 2005;22(5):391–402. DOI: 10.1007/s10585-005-1262-y.
 36. Edelman G.M. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Ann Rev Cell Biol* 1986;2:81–116. DOI: 10.1146/annurev.cb.02.110186.000501.
 37. Ломакин М.С. Иммунобиологический надзор. М., 1990. 226 с. [Lomakin M.S. *Immunobiological oversight*. Moscow, 1990. 226 p. (In Russ.).]
 38. Reinisch W., Hung K., Hassan-Zahraee M. et al. Targeting Endothelial Ligands: ICAM-1/alicaforfen, MADCAM-1. *J Crohns Colitis* 2018;12(suppl_2):S669–S677. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jiy059.
 39. Lennartz F., Smith C., Craig A.G., Higgins M.K. Structural insights into diverse modes of ICAM-1 binding by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(40):20124–34. DOI: 10.1073/pnas.1911900116.
 40. Decker S.O., Incamps A., Wilk H. et al. Soluble intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 detects invasive fungal infections. *Biomarkers* 2020;25(7):548–55. DOI: 10.1080/1354750X.2020.1810318.
 41. Horvathova M., Ferencik M. [Adhesion molecules as the strategic goal of immunotherapy (In Slovak.)]. *Bratisl Lec Listy* 2000;101(3):146–51.
 42. Roebuck K., Finnegan A. Regulation of ICAM-1(CD54) gene expression. *J Leukos Biol* 1999;66(6):876–88.
 43. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Способ оценки профилактической активности иммуномодуляторов в отношении опухолей на модели спонтанного гепатоканцерогенеза у мышей. *Методическое руководство для врачей. М.: РОИЦ им. Н.Н. Блохина*, 2016. 27 с. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. A method for evaluating the prophylactic activity of immunomodulators against tumors in a model of spontaneous hepatocarcinogenesis in mice. *Methodological guide for doctors*. Moscow: N.N. Blokhin RNC, 2016. 27 p. (In Russ.).]
 44. Bocharov E.V., Bocharova O.A., Solov'ev Y.N. et al. Morphological studies of hepatocarcinomas in male high-cancer CBA mice exposed to phytoadaptogene. *Bull Exp Biol Med* 2016;161(5):727–30. DOI: 10.1007/s10517-016-3495-y.
 45. Walling B.L., Kim M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Front Immunol* 2018;3(9):952. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00952.
 46. Edelman G.M. Cell adhesion molecules and their role during embryogenesis. *Sci American* 1984;250(4):34–9.
 47. Lin S.H., Pu Y.S. Function and therapeutic implication of C-CAM cell adhesion molecules in prostate cancer. *Semin Oncol* 1999;26(2):227–33.
 48. Tanaka H., Yashiro M., Sunami T. et al. ICAM-2 gene therapy for peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10(14):4885–92. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-0393-03.

49. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Карпова Р.В. и др. Способ оценки противоопухолевой активности иммуномодуляторов *in vivo* на модели спонтанного гепатоканцерогенеза. Методическое руководство для врачей. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2014. 18 с. [Bocharova O.A., Baryshnikov A.Yu., Karpova R.V. et al. Method for assessing the antitumor activity of immunomodulators *in vivo* on a model of spontaneous hepatocarcinogenesis. Methodological guide for doctors. Moscow: N.N. Blokhin RNC, 2014. 18 p. (In Russ.)].
50. Bocharov E.V., Karpova R.V., Bocharova O.A. et al. Lifespan and somatic status of high-cancer mice exposed to phytoadaptogens in early ontogenesis. Bull Exp Biol Med 2017; 163(6):789–92. DOI: 10.1007/s10517-017-3904-x.
51. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л. и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции неспецифическим иммуномодулятором. Иммунология 2004;25(1):36–43. [Bocharova O.A., Pojaritskaya M.M., Chekalina T.L. et al. The role of adhesion disorders in the pathogenesis of leukoplakia and the possibility of their correction with a non-specific immunomodulator. Immunologia = Immunology 2004;25(1):36–43. (In Russ.)].
52. Bocharova O.A., Lyzhenkova M.A., Karpova R.V. et al. Leukoplakia of oral mucosa: pathogenesis and possible correction with phytoadaptogen. Bull Exp Biol Med 2004;138(6):578–83.
53. Чекалина Т.Л., Гладыко В.В., Пожарицкая М.М. и др. Лейкоплакия слизистой оболочки полости рта. Методическое пособие для врачей. М.: Институт усовершенствования врачей, 2010. 30 с. [Chekalina T.L., Glad'ko V.V., Pojaritskaya M.M. et al. Leukoplakia of the oral mucosa. Methodological guide for doctors. Moscow: Institut usovershenstvovaniya vrachei, 2010. 30 p. (In Russ.)].
54. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Давыдов М.И. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии. М.: МИА, 2008. 218 с. [Bocharova O.A., Baryshnikov A.Yu., Davydov M.I. Phytoadaptogens in Oncology and Gerontology. Moscow: MIA, 2008. 218 p. (In Russ.)].
55. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 1). Российский биотерапевтический журнал 2020;19(2):13–21. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Phytoadaptogens in biotherapy of tumors and geriatrics (Part 1). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(2):13–21. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-13-21.
56. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Фитоадаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (Часть 2). Российский биотерапевтический журнал 2020;19(3):12–20. [Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Phytoadaptogens in biotherapy of tumors and geriatrics (Part 2). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(3):12–20. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-12-20.
57. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2012;10:52–9. [Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Investigation of a complex phytoadaptogen by the HPLC method. Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry 2012;10:52–9. (In Russ.)].
58. Zavala V.A., Kalergis A.M. New clinical advances in immunotherapy for the treatment of solid tumours. Immunology 2015;145(2):182–201. DOI: 10.1111/imm.12459.
59. Jin J., Xie S., Sun Q. et al. Upregulation of BCAM and its sense lncRNA BAN are associated with gastric cancer metastasis and poor prognosis. Mol Oncol 2020;14(4):829–45. DOI: 10.1002/1878-0261.12638.
60. Eyvazi S., Farajnia S., Dastmalchi S. et al. Antibody Based EpCAM Targeted Therapy of Cancer, Review and Update. Curr Cancer Drug Targets 2018;18(9):857–68. DOI: 10.2174/1568009618666180102102311.

Благодарность. Авторы выражают благодарность академику Р.М. Хаитову и профессору В.М. Бухману за критическое прочтение рукописи и ценные замечания.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to Academician P.M. Khaitov and Professor V.M. Bukhman for their critical reading of the manuscript and valuable comments.

Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна обзора, обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

В.Б. Матвеев, В.Г. Кучеряну: разработка дизайна обзора, обзор публикаций по теме статьи;

Е.В. Бочаров: обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи;

Р.В. Карпова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование рукописи.

Authors contributions

O.A. Bocharova: developing the review design, reviewing of publications of the article's theme, article writing;

V.B. Matveev, V.G. Kucheryanu: developing the review design, reviewing of publications of the article's theme;

E.V. Bocharov: reviewing of publications of the article's theme, article writing;

R.V. Karpova: reviewing of publications of the article's theme, article editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <http://orcid.org/0000-0002-6365-2888>

В.Б. Матвеев / V.B. Matveev: <http://orcid.org/0000-0001-7748-9527>

Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <http://orcid.org/0000-0003-2342-9881>

Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <http://orcid.org/0000-0003-4893-1472>

В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <http://orcid.org/0000-0002-5071-3581>

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: 26.05.2021. **Принята к публикации:** 20.08.2021.

Article submitted: 26.05.2021. **Accepted for publication:** 20.08.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33>

Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения

Т.Н. Заботина, А.И. Черткова, А.А. Борунова, Е.Н. Захарова, Э.К. Шоуа, Е.В. Артамонова,
Е.И. Коваленко, М.В. Хорошилов, З.Г. Кадагидзе

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

Контакты: Татьяна Николаевна Заботина tatzabotina@yandex.ru

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) относится к гетерогенным заболеваниям. В последние годы стало очевидным, что РМЖ является иммуногенной опухолью. В достаточном числе случаев обнаруживается выраженная инфильтрация опухолевой ткани иммунными клетками, присутствие которых может влиять на клиническое течение заболевания. Иммуногенность РМЖ варьирует в зависимости от молекулярного подтипа.

Цель исследования – изучение основных показателей системного и локального иммунитета у больных РМЖ до лечения и определение их взаимосвязи с непосредственными результатами неоадъювантной химиотерапии.

Материалы и методы. В исследование были включены пациентки со II–III стадиями РМЖ, которые получали стандартную неоадъювантную химиотерапию в соответствии с молекулярными подтипами РМЖ. Методом проточной цитофлуориметрии до лечения определяли процентное содержание основных эффекторных и регуляторных популяций лимфоцитов системного и локального иммунитета.

Результаты. Обнаруженное в опухолевой ткани снижение уровня эффекторных CD8- и CD4-популяций лимфоцитов и повышение уровня клеток супрессорных популяций по сравнению с периферической кровью указывает на иммуносупрессивное состояние локального иммунитета у больных РМЖ. В опухолевой ткани высокий уровень CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-клеток ассоциировался с высоким уровнем регуляторных CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}- и CD8⁺CD11b⁺CD28⁺-лимфоцитов. Были выявлены различия в значимости отдельных популяций лимфоцитов для непосредственных результатов лечения между больными с разными подтипами РМЖ.

Заключение. Определение субпопуляций лимфоцитов, коррелирующих с уровнем PD-1-клеток, а также с результатами проведенного лечения у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ поможет более четко понимать особенности противоопухолевого иммунного ответа при данной патологии, а также послужит основой для установления иммунных биомаркеров, которые смогут использоваться в качестве дополнительных предиктивных факторов при различных вариантах лечения больных РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, неоадъювантная химиотерапия, системный и локальный иммунитет, CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-лимфоциты, степень лечебного патоморфоза опухоли

Для цитирования: Заботина Т.Н., Черткова А.И., Борунова А.А. и др. Взаимосвязь субпопуляций лимфоцитов больных раком молочной железы с результатами лечения. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3): 25–33. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33.

Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results

Tatiana N. Zabolina, Antonina I. Chertkova, Anna A. Borunova, Elena N. Zakharova, Esma K. Shoua, Elena V. Artamonova,
Elena I. Kovalenko, Maksim V. Horoshilov, Zaira G. Kadagidze

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

Contacts: Tatiana Nikolayevna Zabolina tatzabotina@yandex.ru

Introduction. Breast cancer (BC) is an immunogenic tumor. Immune cells infiltration of tumor tissue can affect the clinical course of the disease. The immunogenicity of breast cancer varies depending on the molecular subtype.

The aim of this work was to study the main indicators of systemic and local immunity before patient's treatment and to determine their relationship with the immediate neoadjuvant chemotherapy results.

Materials and methods. Patients with stage II–III BC received standard neoadjuvant chemotherapy in accordance with the molecular subtypes. The percentage of the main effector and regulatory lymphocytes populations of systemic and local immunity was determined by flow cytometry.

Results. A decrease in the level of effector CD8 and CD4 lymphocyte populations and an increase in the level suppressor populations in tumor tissue in comparison with peripheral blood indicate an immunosuppressive state of local immunity in BC patients. In tumor tissue, a high level of CD8⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-1⁺ cells were associated with a high level of regulatory CD4⁺CD25^{high}CD127^{-/low} and CD8⁺CD11b⁻CD28⁻ lymphocytes. Differences were found in the significance of individual lymphocyte populations for the immediate results of treatment between patients with different subtypes of breast cancer.

Conclusion. Determination of lymphocyte subpopulations correlating with the level of PD-1 cells, and the results of treatment in patients with different molecular BC subtypes, will help a clearer understanding of the antitumor immune response in this pathology, and will also serve as a basis for identifying immune biomarkers that can be used as additional predictive factors in various treatment options for BC patients.

Key words: breast cancer, neoadjuvant chemotherapy, systemic and local immunity, CD8⁺PD-1⁺ and CD4⁺PD-1⁺ lymphocytes, tumor pathomorphosis

For citation: Zabotina T.N., Chertkova A.I., Borunova A.A. et al. Relationship of lymphocyte subpopulations in breast cancer patients with treatment results. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):25–33. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-25-33.

Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее частым злокачественным новообразованием у женщин и на молекулярном уровне определяется как гетерогенное заболевание. В последние годы стало очевидным, что РМЖ — иммуногенная опухоль [1, 2], и иммуногенность варьирует в зависимости от молекулярного подтипа опухоли [1, 3]. В последнее время в клинике при лечении многих типов рака, включая РМЖ [4, 5], широко используются моноклональные антитела, направленные против коингибиторных рецепторов Т-клеток и их лигандов, таких как PD-1/PD-L1 (ингибиторы контрольных точек иммунитета) [6, 7]. PD-1 — один из ключевых коингибиторных рецепторов, экспрессируемых на Т-клетках при их активации. Взаимодействие рецептора PD-1 с лигандами (PD-L1/PD-L2) в конечном итоге приводит к гибели активированных Т-клеток. Опухолевые клетки используют эти ингибиторные механизмы для ускользания от иммунологического надзора [7, 8]. Взаимодействие PD-1/PD-L1 является важным, однако не единственным фактором, который может определять клинический исход заболевания. Значительное влияние на клинический ответ, как на иммунотерапию, так и на другие методы лечения, включая химиотерапию, обеспечивает функционирование всех клеток иммунной системы, в первую очередь лимфоцитов системного и локального иммунитета, тесно взаимодействующих друг с другом. В то же время реализация PD-1/PD-L1-пути может воздействовать на различные популяции иммунных клеток, в том числе на их уровень в периферической крови (ПК)

и в составе лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (ЛИО) [9–11].

В связи с этим исследование значения основных популяций лимфоцитов системного и локального иммунитета для результатов лечения больных РМЖ, а также взаимосвязи CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-клеток с другими популяциями лимфоцитов представляется актуальным и может внести вклад в понимание функционирования иммунной системы при РМЖ.

Цель исследования — изучение основных показателей системного и локального иммунитета больных РМЖ до лечения и определение их взаимосвязи с непосредственными результатами неoadъювантной химиотерапии (степенью лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО)).

Материалы и методы

В исследование были включены 65 пациенток со II–III стадиями РМЖ, со следующими подтипами опухоли: трижды негативный (ТН РМЖ) ($n = 23$) — РЭ⁻, РП⁻, HER2⁻; люминальный В HER2-негативный (ЛВ HER2⁻) РМЖ ($n = 23$) — РЭ⁺ и/или РП⁺, HER2⁻, Ki-67 ≥ 20 %; люминальный В HER2-позитивный (ЛВ HER2⁺) РМЖ ($n = 11$) — РЭ⁺ и/или РП⁺, HER2⁺; HER2-позитивный (HER2⁺) РМЖ ($n = 8$) — РЭ⁻, РП⁻, HER2⁺. Медиана возраста пациенток составила 47 лет (28–69 лет). Все пациентки получали неoadъювантную химиотерапию с последовательным применением химиопрепаратов антрациклинового и таксанового ряда в стандартном режиме. При наличии гиперэкспрессии HER2 использовались стандартные

*РЭ — рецепторы эстрогенов; РП — рецепторы прогестерона; HER2 (ErbB-2) — рецептор эпидермального фактора роста, тип 2.

таксановые режимы с добавлением таргетных анти-HER2-препаратов (трастузумаб и пертузумаб). В операционном материале у всех пациенток определяли степень ЛПО. Оценка степени ЛПО проводилась по схеме Г.А. Лавниковой [12].

Иммунологическое исследование. Кровь и образцы опухолевой ткани (Core-биопсия) для исследования брали непосредственно перед началом химиотерапии. Лимфоциты выделяли из ПК (лимфоциты периферической крови (ЛПК)) и полученной из опухолевой ткани клеточной суспензии (ЛИО) по параметрам светорассеяния и экспрессии CD45. Для исследования субпопуляционного состава ЛПК и ЛИО проводили 2-, 3- и 4-цветное окрашивание клеток с использованием панели моноклональных антител к поверхностным и внутриклеточным (Perforin) маркерам лимфоцитов. Методом проточной цитофлуориметрии на 5-параметровом проточном цитофлуориметре аналитического типа FACSCalibur производства компании Becton Dickinson (США) определяли процентное содержание следующих популяций лимфоцитов: Т-клеток ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$), активированных Т-клеток ($CD4^+CD25^+$, $CD3^+HLA-DR^+$), В-клеток ($CD3^-CD19^+$), активированных $CD25^-$, $HLA-DR^-$, $CD3^-HLA-DR^-$ -лимфоцитов, регуляторных (T_{reg}) $CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$ -Т-лимфоцитов ($CD4 T_{reg}$), $CD3^+CD16^+CD56^+$ -NKT- и $CD3^-CD16^+CD56^+$ -NK-клеток, $CD8^+Perforin^+$ - и $CD16^+Perforin^+$ -клеток, $CD8^+CD279^-$ - и $CD4^+CD279^-$ -лимфоцитов. С помощью дополнительного гейтирования $CD45^+CD8^+$ -клеток в составе $CD8^-$ -популяции определяли процентное содержание $CD8^+CD11b^-CD28^-$ -, $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -, $CD8^+CD11b^+CD28^+$ - и $CD8^+CD11b^-CD28^+$ -лимфоцитов. Цитотоксический потенциал $CD16^-$ и $CD8^-$ -лимфоцитов оценивался как процент Perforin-позитивных клеток в составе соответствующей популяции.

Статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета для статистического анализа Statistica 7. Характер распределения иммунологических показателей устанавливали с использованием критерия Колмогорова—Смирнова (для $n > 50$) и Шапиро—Уилка (для $n < 50$). В связи с разным характером распределения переменных в сравниваемых группах все данные представлены в виде медианы (Me) и 25-го и 75-го процентилей (квартилей). Определение различий между показателями 2 независимых групп проводилось с использованием двустороннего U-критерия Манна—Уитни (U) и критерия Вальда—Вулфовица. Для выявления различий между несколькими группами показателей использовали критерий Краскела—Уоллиса. Для оценки корреляционной взаимосвязи между переменными определяли коэффициенты корреляции Спирмена (ρ) и Гамма (γ), рассчитывали 95 % доверительный интервал для ко-

эффициентов корреляции. Уровень значимости во всех исследованиях был принят равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При сравнении уровней всех определявшихся в работе популяций ЛПК и ЛИО у пациенток с разными подтипами РМЖ выявлено только 1 различие в процентном содержании $CD3^-CD16^+CD56^+$ -NK-клеток ПК между больными с ЛВ HER2⁻ РМЖ и с HER2⁺ РМЖ: 14,5 (11,5–20,4) % и 8,9 (6,5–11,7) % соответственно, $p = 0,043$ (критерий Краскела—Уоллиса). В дальнейших исследованиях пациентки с ЛВ HER2⁺ РМЖ и HER2⁺ РМЖ были объединены в 1 группу. В некоторых случаях пациентки с разными подтипами РМЖ исследовались вместе.

Определение субпопуляционного состава ЛПК и ЛИО показало значительные различия между ними (табл. 1). С одной стороны, в составе ЛИО отмечался более высокий процент $CD3^-$, $CD3^+CD8^+$ -Т-клеток, $CD8^+CD11b^+CD28^+$ -Т-клеток памяти по сравнению с ПК и сходный с ПК уровень $CD3^+CD4^+$ -Т-клеток, что может указывать на привлечение в опухолевую ткань основных популяций адаптивного иммунитета. Преобладание в составе ЛИО Т-клеток было продемонстрировано у больных и с другими злокачественными новообразованиями [13, 14]. С другой стороны, в составе ЛИО был повышен по сравнению с ПК уровень регуляторных (супрессорных) Т-лимфоцитов: $CD4 T_{reg}$ ($CD4^+CD25^{high}CD127^{-/low}$) и $CD8-T_{reg}$ ($CD8^+CD11b^+CD28^-$). При этом в составе $CD4^-$ -популяции ПК помимо $CD4 T_{reg}$ обнаруживались и активированные нерегуляторные $CD4^+CD25^+$ -Т-клетки, а в опухолевой ткани все $CD4^+CD25^+$ -Т-клетки являлись $CD4 T_{reg}$. Следует отметить, что значительным по сравнению с ПК было повышение уровня $CD8-T_{reg}$, которые оказались преобладающей популяцией в составе $CD8$ ЛИО (44,1 %), в отличие от $CD8$ ЛПК, где основной популяцией были цитотоксические $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -Т-клетки (46,6 %). Выраженное снижение уровня таких эффекторных популяций лимфоцитов, как цитотоксические $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -Т-клетки, в том числе $CD8^+Perforin^+$ -лимфоциты, а также активированные $CD4^+CD25^+$ -Т-клетки, наряду с повышением уровня супрессорных популяций может указывать на иммуносупрессивное состояние локального иммунитета у больных РМЖ. Преобладание в составе ЛИО Т-клеток закономерно сочеталось также со сниженным по сравнению с ПК уровнем $CD3^-CD16^+CD56^+$ - и $CD16^+Perforin^+$ -NK-клеток. Уровень $CD8^+PD-1^+$ - и $CD4^+PD-1^+$ -лимфоцитов также был намного выше в опухоли, чем в ПК, — почти в 8 и 2,7 раза соответственно. Полученные данные согласуются с утверждением, что в процессе взаимодействия растущей опухоли с иммунной системой формируется сложное, в основном

Таблица 1. Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, у больных раком молочной железы

Table 1. Subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer patients

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population	Периферическая кровь, Ме (квартили), % Peripheral blood, Me (quartiles), %	Опухоль, Ме (квартили), % Tumor, Me (quartiles), %	<i>p</i> (U)
CD3 ⁺ CD19 ⁻	78,9 (73,7–83,8)	86,3 (80,4–90,3)	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺	42,2 (35,5–48,3)	44,1 (38,2–50,5)	0,531
CD3 ⁺ CD8 ⁺	28,5 (23,4–32,1)	40,8 (33,0–48,0)	0,000
CD3 ⁻ CD8 ⁺	5,5 (4,1–8,4)	2,1 (1,1–3,4)	0,015
CD3 ⁻ CD19 ⁺	4,9 (1,3–7,3)	3,7 (2,2–7,7)	0,762
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	9,1 (6,6–13,4)	11,5 (6,2–25,5)	0,079
HLA-DR	14,3 (10,2–19,8)	21,1 (11,8–31,4)	0,011
CD3 ⁻ HLA-DR ⁺	4,8 (2,5–8,3)	4,6 (2,5–8,5)	0,922
CD25	18,8 (14,4–25,5)	17,3 (12,0–21,4)	0,104
CD4 ⁺ CD25 ⁺	13,6 (10,2–17,0)	8,3 (6,8–11,6)	0,000
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{-/low}	6,5 (5,1–8,2)	10,6 (5,7–17,0)	0,000
CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,2 (8,5–16,5)	5,1 (2,9–11,0)	0,000
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	11,7 (8,0–16,5)	8,5 (6,2–14,1)	0,078
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁻	46,6 (35,8–54,7)	18,4 (12,8–27,4)	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 ⁺	7,8 (6,0–12,1)	11,8 (7,1–15,0)	0,008
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁻	7,5 (4,5–11,3)	44,1 (31,7–52,6)	0,000
CD8 ⁺ CD11b ⁻ CD28 ⁺	33,2 (24,3–45,2)	24,8 (16,1–30,0)	0,000
CD16 ⁺ Perforin ⁺	14,0 (9,5–18,4)	3,4 (1,4–4,6)	0,000
CD8 ⁺ Perforin ⁺	16,4 (10,2–20,6)	3,4 (1,9–5,6)	0,000
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,2 (0,9–1,5)	1,0 (0,75–1,36)	0,000
CD8 ⁺ CD279 ⁺ (PD-1)	1,7 (0,9–4,2)	13,4 (6,5–23,2)	0,000
CD4 ⁺ CD279 ⁺ (PD-1)	4,5 (2,6–6,5)	12,2 (8,4–18,50)	0,000

Примечание. Здесь и в табл. 2, 4: U – U-критерий Манна–Уитни.

Note. Here and in tables 2, 4: U – Mann–Whitney U-criterion.

иммуносупрессивное, микроокружение, обеспечивающее ее ускользание от иммунологического надзора [5]. Было также обнаружено, что различия в уровне клеток некоторых популяций ЛПК и ЛИО у пациенток в настоящем исследовании зависели от конкретного подтипа РМЖ. Так, процентное содержание CD4 T_{per} было статистически значимо выше в опухолевой ткани, чем в ПК, только у больных с ЛВ HER2⁻ подтипом; CD3⁺HLA-DR⁺- и HLA-DR-лимфоцитов – у больных с ЛВ HER2⁺ и HER2⁺ подтипами, а CD8⁺CD11b⁺CD28⁺ – только при ТН РМЖ (данные не представлены). Возможно, полученные результаты связаны с различиями в иммуногенности разных молекулярных подтипов РМЖ, что следует

учитывать при исследовании иммунитета у больных с этой формой опухоли [1, 3].

Важную роль в опухолевом микроокружении играют популяции регуляторных (супрессорных) лимфоцитов. Показано, что регуляторные CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Т-клетки могут вносить свой вклад в результаты анти-PD-1/PD-L1-терапии, а ось PD-1/PD-L1 может влиять на дифференцировку и функцию CD4 T_{per}. Однако сложная взаимосвязь между взаимодействием PD-1/PD-L1 и CD4 T_{per} изучена не полностью [15]. При исследовании взаимосвязи уровня CD8⁺PD-1⁺- и CD4⁺PD-1⁺-клеток с процентным содержанием клеток других популяций ЛИО (табл. 2) было выявлено, что их высокий уровень

сочетался с высоким уровнем регуляторных лимфоцитов, причем не только $CD4 T_{per}^+$: $CD8^+PD-1^+$ — с $CD4 T_{per}^+$ и $CD8 T_{per}^+$, а $CD4^+PD-1^+$ — с $CD8 T_{per}^+$. В свою очередь, повышенное процентное содержание $CD4 T_{per}^+$ ($\geq Me$) ассоциировалось с более высоким уровнем $CD8^+CD279^+$ по сравнению с уровнем этих клеток при $CD4 T_{per}^+ < Me$: 19,8 (11,8–27,5) % ($n = 21$) и 11,4 (5,3–15,5) % ($n = 21$) соответственно; $p = 0,015$. В ПК процентное содержание клеток, экспрессирующих рецептор PD-1, не имело значения для уровня регуляторных популяций лимфоцитов. Полученные результаты указывают на наличие в опухолевом микроокружении у больных РМЖ положительной ассоциации между уровнем CD8- и CD4-лимфоцитов, экспрессирующих ингибиторный рецептор PD-1, и уровнем супрессорных клеток, участвующих в подавлении противоопухолевого иммунного ответа.

Определение значения исходного уровня ЛПК и ЛИО для непосредственных результатов лечения больных РМЖ у всей группы пациенток выявило ассоциацию повышенного процентного содержания НК-клеток, как в ПК ($CD3-CD16^+CD56^+$ и $CD3-CD8^+$), так и в составе ЛИО ($CD3-CD16^+CD56^+$), с более низкой степенью ЛПО (табл. 3). У пациенток с I–III степенью ЛПО процент $CD3-CD16^+CD56^+$ -НК-клеток и в ПК, и в опухоли был статистически значимо выше по сравнению с пациентками с высокой IV степенью ЛПО: в ПК — 14,6 (9,9–18,6) % и 9,2 (8,2–13,4) % соответственно ($p = 0,007$, U), в опухоли — 9,2 (3,3–13,7) % и 4,4 (2,5–6,5) % соответственно ($p = 0,045$, U).

Исследование взаимосвязи исходного уровня ЛПК и ЛИО с непосредственными результатами лечения позволило выявить различия в значимости отдельных популяций лимфоцитов у больных с разными

Таблица 2. Взаимосвязь процентного содержания $CD8^+PD-1^+$ - и $CD4^+PD-1^+$ -лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, с уровнем клеток других популяций

Table 2. Relationship between the percentage of $CD8^+PD-1^+$ and $CD4^+PD-1^+$ tumor infiltrating lymphocytes with the level of cells of other populations

Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль (%) Tumor infiltrating lymphocytes (%)	CD8 ⁺ PD-1 ⁺ , Me = 13,4				
	≥Me		<Me		p (U)
	n	Медиана (квартили) Median (quartiles)	n	Медиана (квартили) Median (quartiles)	
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low}	22	12,5 (10,1–18,9)	21	6,7 (3,95–13,45)	0,014
CD8 ⁺ CD11b–CD28 [–]	22	50,2 (44,0–57,1)	21	38,8 (29,5–47,1)	0,009
CD4 ⁺ CD279 ⁺	25	18,0 (12,0–22,2)	25	10,3 (5,6–12,7)	0,000
	CD4 ⁺ PD-1 ⁺ , Me = 12,2				
	≥Me		<Me		p (U)
	n	Медиана (квартили) Median (quartiles)	n	Медиана (квартили) Median (quartiles)	
CD8 ⁺ CD11b–CD28 [–]	22	52,7 (38,8–58,3)	21	40,2 (29,5–49,4)	0,004
CD8 ⁺ CD279 ⁺	25	20,3 (11,7–26,4)	25	7,9 (4,9–16,3)	0,000

Примечание. n — число пациенток.

Note. n — number of patients.

Таблица 3. Корреляционная взаимосвязь процентного содержания лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, до лечения со степенью лечебного патоморфоза опухоли у больных со всеми подтипами РМЖ

Table 3. Correlation between the percentage of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes before treatment with the degree of tumor pathomorphosis in patients with all subtypes of breast cancer

Популяция лимфоцитов Lymphocyte population		ρ (95 % ДИ) ρ (95 % CI)	p
Периферическая кровь (n = 65) Peripheral blood (n = 65)	CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	–0,325 (–0,531; –0,083)	0,008
	CD3-CD8 ⁺	–0,290 (–0,502; –0,045)	0,019
Опухоль (n = 48) Tumor (n = 48)	CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	–0,315 (–0,558; –0,023)	0,031

Примечание. Здесь и в табл. 4: ρ — коэффициент корреляции Спирмена; ДИ — доверительный интервал.

Note. Here and in table 4: ρ — Spearman's correlation coefficient; CI — confidence interval.

Таблица 4. Взаимосвязь процентного содержания лимфоцитов периферической крови и лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль, до лечения со степенью лечебного патоморфоза опухоли (ЛПО) в зависимости от подтипа рака молочной железы (РМЖ)

Table 4. Relationship between the percentage of tumor infiltrating lymphocytes and peripheral blood lymphocytes before treatment with the degree of tumor pathomorphosis, depending on the subtype of breast cancer (BC)

Подтип РМЖ, популяция лимфоцитов Subtype of BC, lymphocyte populations	Содержание лимфоцитов, Ме (квартили), % Percentage of lymphocytes, Me (quartiles), %		p (U)	ρ (95 % ДИ) ρ (95 % CI)	p
	I–III степень ЛПО I–III tumor pathomorphosis	IV степень ЛПО IV tumor pathomorphosis			
Лимфоциты периферической крови Peripheral blood lymphocytes					
ТН РМЖ TN BC	n = 7	n = 16		n = 23	
CD3–CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,2 (13,8–19,8)	8,5 (7,9–13,2)	0,022	–0,530 (–0,783; –0,125)	0,009
CD16 ⁺ Perforin ⁺	20,1 (13,5–24,5)	10,9 (8,6–15,6)	0,039	–0,442 (–0,734; –0,011)	0,035
CD8 ⁺ CD11b–CD28 [–]	2,5 (1,6–7,7)	8,5 (5,4–11,8)	0,012	0,548 (0,151; 0,793)	0,007
HER2 ⁺ (ЛВ HER2 ⁺ и HER2 ⁺) РМЖ HER2 ⁺ (LB HER2 ⁺ & HER2 ⁺) BC	n = 9	n = 10		n = 19	
CD8 ⁺ CD11b–CD28 ⁺	45,2 (38,0–49,3)	28,5 (24,5–33,2)	0,001	–0,601 (–0,839; –0,168)	0,006
CD8 ⁺ CD11b ⁺ CD28 [–]	34,9 (33,7–42,6)	52,2 (42,9–54,7)	0,006	0,512 (0,040; 0,797)	0,025
CD8 ⁺ Perforin ⁺	10,1 (8,7–13,8)	19,2 (16,4–20,3)	0,001	0,619 (0,196; 0,848)	0,006
ЦТП CD8 ⁺ Cytotoxic potential CD8 ⁺	40,8 (31,0–46,5)	55,8 (50,0–69,4)	0,011	0,535 (0,072; 0,808)	0,027
ЛВ HER2 [–] РМЖ LB HER2 [–] BC	n = 18	n = 5		n = 23	
ЦТП CD8 ⁺ Cytotoxic potential CD8 ⁺	45,7 (28,2–63,7)	66,7 (52,0–72,1)	0,166	0,494 (0,077; 0,764)	0,019
CD3–CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,8 (13,9–22,9)	11,5 (10,2–13,1)	0,019	–0,262 (–0,624; 0,193)	0,228
Лимфоциты, инфильтрирующие опухоль Tumor infiltrating lymphocytes					
ТН РМЖ TN BC	n = 12	n = 5		n = 17	
CD3–CD16 ⁺ CD56 ⁺	13,4 (12,6–18,4)	4,45 (3,0–6,0)	0,005, W–W	–0,684 (–0,886; –0,264)	0,035, GC
HER2 ⁺ (ЛВ HER2 ⁺ и HER2 ⁺) РМЖ HER2 ⁺ (LB HER2 ⁺ & HER2 ⁺) BC	n = 16, p >0,05			p >0,05	
ЛВ HER2 [–] РМЖ LB HER2 [–] BC	–				
HLA-DR (n = 11)	–	–	–	0,673 (0,028; 0,922)	0,023
CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{–/low} (n = 16)	–	–	–	0,597 (0,084; 0,860)	0,014

Примечание. ТН РМЖ – трижды негативный подтип РМЖ; ЛВ HER2⁺ – люминальный В HER2-позитивный подтип РМЖ; ЛВ HER2⁻ – люминальный В HER2-негативный подтип РМЖ; HER2⁺ – HER2-позитивный подтип РМЖ; ЦТП – цитотоксический потенциал; n – число пациенток; W-W – критерий Вальда–Вулфовица; GC – коэффициент корреляции гамма; p – уровень статистической значимости.

Note. TN BC – triple negative BC; LB HER2⁺ – luminal B HER2-positive BC; LB HER2⁻ – luminal B HER2-negative BC; HER2⁺ – HER2-positive BC; n – number of patients; W-W – Wald–Wolfowitz criterion; GC – Gamma correlation; p – level of statistical significance.

подтипами РМЖ (табл. 4). Оказалось, что повышенный уровень $CD3^+CD16^+CD56^+$ -NK-клеток и в ПК, и в опухоли имел отрицательное значение для степени ЛПО, главным образом при ТН РМЖ. Ранее мы обнаружили взаимосвязь исходно повышенного процентного содержания NK-клеток со снижением безрецидивной и общей выживаемости пациенток с ТН РМЖ [16, 17]. В данном исследовании повышенный уровень натуральных киллеров у больных с низкой степенью ЛПО был отмечен и у больных с ЛВ $HER2^-$ РМЖ, однако корреляция между этими показателями была статистически незначимой (см. табл. 4), в связи с чем роль этих клеток при данном подтипе РМЖ требует дальнейшего изучения. Показано, что NK-клетки являются гетерогенной популяцией и могут дифференцироваться не только в цитотоксические, но и в регуляторные популяции, а повторное взаимодействие их с опухолевыми клетками в конечном итоге может приводить к дисфункции NK-клеток и потере ими эффекторных реакций [18]. Было продемонстрировано положительное прогностическое значение $CD8^+$ -лимфоцитов при разных подтипах РМЖ [19, 20]. В данном исследовании только у больных с $HER2^+$ -позитивными подтипами РМЖ ($HER2^+$ и $HER2^+$) повышение процентного содержания в ПК эффекторных лимфоцитов $CD8^+CD11b^+CD28^-$, $CD8^+Perforin^+$ и их цитотоксического потенциала оказалось благоприятным фактором для непосредственных результатов лечения. Ассоциация повышенного уровня наивных $CD8^+CD11b^+CD28^-$ -Т-клеток с низкой степенью ЛПО, возможно, связана с нарушением их дальнейшей дифференцировки в клетки-эффекторы у данной группы больных. При ЛВ $HER2^-$ подтипе РМЖ высокая степень ЛПО ассоциировалась с высоким уровнем клеток двух популяций ЛПО — активированных $HLA-DR^+$ -лимфоцитов и $CD4^+T_{reg}^+$, указывая в данном случае на их благоприятное значение для непосредственных результатов лечения. В предыдущих исследованиях мы обнару-

жили отрицательную ассоциацию исходного уровня $HLA-DR^+$ -лимфоцитов с выживаемостью пациенток с ТН РМЖ. Как указывалось ранее, только у больных с ЛВ $HER2^-$ подтипом РМЖ было обнаружено повышение в опухолевой ткани процентного содержания $CD4^+T_{reg}^+$ по сравнению с ПК. Прогностическая значимость $CD4^+T_{reg}^+$ при различных вариантах злокачественных новообразований, включая РМЖ, описывается как отрицательная, положительная или отсутствующая [21, 22]. Вероятно, эта особенность может касаться и другой супрессорной популяции Т-клеток, такой как $CD8^+CD11b^+CD28^-$. В данном исследовании исходный уровень клеток этой популяции положительно ассоциировался со степенью ЛПО только у больных с ТН РМЖ. Различий в уровне $CD8^+CD279^+$ - и $CD4^+CD279^+$ -лимфоцитов в ПК и в опухоли между больными с разной степенью ЛПО ни в целом по группе, ни при разных подтипах РМЖ не наблюдалось.

Заключение

В процессе развития РМЖ в опухоли формируется иммуносупрессивное микроокружение, на что указывает повышение в составе ЛПО супрессорных и снижение эффекторных популяций лимфоцитов. Идентификация популяций лимфоцитов, коррелирующих с уровнем $PD-1^+$ -клеток, послужит основой для определения дополнительных биомаркеров, которые смогут использоваться для отбора пациентов, чувствительных к иммунотерапии ингибиторами контрольных точек иммунитета. Результаты определения взаимосвязи исходного уровня ЛПО и ЛПО с непосредственными результатами лечения показали, что раздельное исследование циркулирующих и инфильтрирующих опухоль эффекторных и супрессорных лимфоидных популяций у больных с разными молекулярными подтипами РМЖ поможет более четкому пониманию особенностей противоопухолевого иммунного ответа у больных с данной патологией.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Harbeck N., Penault-Llorca F., Cortes J. et al. Breast cancer. Nat Rev Dis Primers 2019;5(1):66. DOI: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- Zhang L., Wang X.I., Ding J. et al. The predictive and prognostic value of Foxp3⁺/CD25⁺ regulatory T cells and PD-L1 expression in triple negative breast cancer. Ann Diagn Pathol 2019;40:143–51. DOI: 10.1016/j.anndiagpath.2019.04.004.
- Hammerl D., Smid M., Timmermans A.M. et al. Breast cancer genomics and immuno-oncological markers to guide immune therapies. Semin Cancer Biol 2018;52(Pt 2):178–88. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.003.
- Planes-Laine G., Rochigneux P., Bertucci F. et al. PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences Are Emerging. A Literature Review. Cancers (Basel) 2019;11(7):1033. DOI: 10.3390/cancers11071033.
- Emens L.A. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. Clin Cancer Res 2018;24(3):511–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3001.
- Akinleye A., Rasool Z. Immune checkpoint inhibitors of PD-L1 as cancer therapeutics. J Hematol Oncol 2019;12(1):92. DOI: 10.1186/s13045-019-0779-5.
- Han Y., Liu D., Li L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. Am J Cancer Res 2020;10(3):727–42. Available at: <http://ajcr.us/files/ajcr0108072.pdf>.
- Ai L., Xu A., Xu J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond.

- Adv Exp Med Biol 2020;1248:33–59.
DOI: 10.1007/978-981-15-3266-5_3.
9. Pajens S.T., Vledder A., de Bruyn M., Nijman H.W. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol* 2021;18(4):842–59.
DOI: 10.1038/s41423-020-00565-9.
 10. Lotfinejad P., Kazemi T., Mokhtarzadeh A. et al. PD-1/PD-L1 axis importance and tumor microenvironment immune cells. *Life Sci* 2020;259:118297.
DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118297.
 11. Schnell A., Schmid C., Herr W., Siska P.J. The Peripheral and Intratumoral Immune Cell Landscape in Cancer Patients: A Proxy for Tumor Biology and a Tool for Outcome Prediction. *Biomedicine* 2018;6(1):25.
DOI: 10.3390/biomedicine6010025.
 12. Лавникова Г.А. Гистологический метод количественной оценки терапевтического повреждения опухоли. М.: Методические рекомендации, 1979. 13 с. [Lavnikova G.A. Histological method for quantifying therapeutic tumor damage. Moscow: Metodicheskiye rekomendatsii, 1979. 13 p. (In Russ.)].
 13. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А. и др. Многопараметровое исследование иммунофенотипа лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль у онкологических больных. Российский онкологический журнал 2016;21(1–2):51–4. [Zabotina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A. et al. Multiparameter study of the immunophenotype of lymphocytes infiltrating a tumor in cancer patients. *Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal* = Russian Journal of Oncology 2016;21(1–2):51–4. (In Russ.)].
 14. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Циклаури В.Т. и др. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови и инфильтрирующих опухоль у больных плоскоклеточным раком головы и шеи. *Иммунология* 2019;40(3):10–9. [Zabotina T.N., Chertkova A.I., Tsiklauri V.T. et al. Features of peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes subpopulations in patients with squamous cell head and neck cancer. *Immunologiya* = Immunology 2019;40(3):10–9. (In Russ.)].
DOI: 10.24411/0206-4952-2019-13002.
 15. Cai J., Wang D., Zhang G., Guo X. The Role of PD-1/PD-L1 Axis In Treg Development And Function: Implications For Cancer Immunotherapy. *Oncotargets Ther* 2019;12:8437–45.
DOI: 10.2147/OTT.S221340.
 16. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Заботина Т.Н. и др. Взаимосвязь маркеров ранней и поздней активации лимфоцитов с эффективностью неoadъювантной химиотерапии больных трижды негативным раком молочной железы. *Иммунология* 2021;42(2):112–24. [Kadagidze Z.G., Chertkova A.I., Zabotina T.N. et al. The relationship of markers of early and late lymphocytes activation with the effectiveness of neoadjuvant chemotherapy in patients with triple negative breast cancer with the efficiency of neoadjuvant chemotherapy in triple negative breast cancer patients. *Immunologiya* = Immunology 2021;42(2):112–24. (In Russ.)].
DOI: 10.33029/0206-4952-2021-42-2-112-124.
 17. Заботина Т.Н., Черткова А.И., Кадагидзе З.Г. и др. Популяция CD8⁺-лимфоцитов периферической крови и ее значение для непосредственных и отдаленных результатов лечения больных трижды негативным раком молочной железы. *Иммунология* 2020;41(4):326–36. [Zabotina T.N., Chertkova A.I., Kadagidze Z.G. et al. Peripheral blood CD8⁺-lymphocytes populations and its value for direct and outlying treatment results in triple negative breast cancer patients. *Immunologiya* = Immunology 2020;41(4):326–36. (In Russ.)].
DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-3-326-336.
 18. Wu S.Y., Fu T., Jiang Y.Z., Shao Z.M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* 2020;19(1):120.
DOI: 10.1186/s12943-020-01238-x.
 19. Vihervuori H., Autere T.A., Repo H. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and CD8⁺ T cells predict survival of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145(12):3105–14.
DOI: 10.1007/s00432-019-03036-5.
 20. Ali H.R., Provenzano E., Dawson S.J. et al. Association between CD8⁺ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol* 2014;25(8):1536–43.
DOI: 10.1093/annonc/mdu191.
 21. deLeeuw R.J., Kost S.E., Kakal J.A., Nelson B.H. The prognostic value of FoxP3⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin Cancer Res* 2012;18(11):3022–9.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-3216.
 22. Shang B., Liu Y., Jiang S.J., Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3⁺ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5:15179.
DOI: 10.1038/srep15179.

Вклад авторов

Т.Н. Заботина: разработка плана исследования, написание текста рукописи;
А.И. Черткова: анализ и интерпретация данных, написание текста рукописи;
А.А. Борунова: статистическая обработка данных;
Е.Н. Захарова: подготовка полученных данных к анализу;
Э.К. Шоуа: создание базы клинических данных;
Е.В. Артамонова: клинические исследования, обработка клинических данных;
Е.И. Коваленко: клинические исследования, сбор и обработка клинических данных;
М.В. Хорошилов: получение данных для анализа;
З.Г. Кадагидзе: обзор публикаций по теме статьи, обсуждение и научное редактирование рукописи.

Authors contributions

T.N. Zabotina: development of a research plan, writing the text of the manuscript;
A.I. Chertkova: analysis and interpretation of data, writing the text of the manuscript;
A.A. Borunova: statistical data processing;
E.N. Zakharova: preparation of the obtained data for analysis;
E.K. Shoua: creation of a clinical database;
E.V. Artamonova: clinical trials, processing of clinical data;
E.I. Kovalenko: clinical trials, collection and processing of clinical data;
M.V. Khoroshilov: obtaining data for analysis;
Z.G. Kadagidze: review of publications on the topic of the article, discussion and scientific editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Т.Н. Заботина / T.N. Zabolina: <http://orcid.org/0000-0001-7631-5699>

А.И. Черткова / A.I. Chertkova: <https://orcid.org/0000-0001-9146-5986>

А.А. Борунова / A.A. Borunova: <http://orcid.org/0000-0002-1854-3455>

Е.Н. Захарова / E.N. Zakharova: <https://orcid.org/0000-0003-2790-6673>

Э.К. Шоуа / E.K. Shoua: <https://orcid.org/0000-0003-3937-474X>

Е.В. Артамонова / E.V. Artamonova: <http://orcid.org/0000-0001-7728-9533>

Е.И. Коваленко / E.I. Kovalenko: <http://orcid.org/0000-0003-4763-7992>

М.В. Хорошилов / M.V. Khoroshilov: <https://orcid.org/0000-0002-3770-5173>

З.Г. Кадагидзе / Z.G. Kadagidze: <https://orcid.org/0000-0002-0058-0987>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках темы НИР № ААА-А-А19-119022090028-6.

Funding. The study was performed with the financial support of the Ministry of Health of Russian Federation in the framework of research No AAA-A-A19-119022090028-6.

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

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

Статья поступила: 14.07.2021. Принята к публикации: 20.08.2021.

Article submitted: 14.07.2021. Accepted for publication: 20.08.2021.

Использование метода SeDeM-ODT для разработки таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта

С.В. Тишков, Е.В. Бlynская, К.В. Алексеев, В.В. Буюва

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8

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

Введение. Метод SeDeM-ODT – относительно новый метод, основанный на экспертных оценках и круговых диаграммах, на которых отражены 15 основных параметров пригодности лекарственной формы для прямого прессования и диспергируемости в ротовой полости.

Цель представленного в данной статье **исследования** заключается в изучении фармацевтической субстанции ГК-2 (гексаметиленамида бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)) методом SeDeM, определении направления коррекции технологических свойств с помощью вспомогательных веществ и разработке с помощью представленных методов состава таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта.

Материалы и методы. Получение таблеток – ручной гидравлический пресс ПРГ-50; методика определения сыпучести (ОФС.1.4.2.0016.15, Государственная фармакопея РФ (ГФ), XIV издание, том II) – анализатор насыпной плотности (ERWEKA SVM 221), тестер определения сыпучести GTB (ERWEKA, Германия); прочность таблеток на раздавливание (ОФС.1.4.1.0011.15, ГФ, XIV издание, том II) – анализатор прочности TBF 1000 Copley Scientific® (Великобритания); методика определения распадаемости (ОФС.1.4.2.0013.15, ГФ, XIV издание, том II) – тестер распадаемости PTZ-S (Pharma Test, Германия); потеря в массе при высушивании (ОФС.1.2.1.0010.15, ГФ, XIV издание, том I) – анализатор влажности Sartorius MA-35 (Sartorius AG, Германия); гигроскопичность; определение фракционного состава – вибрационное сито с размерами пор 850, 600, 425, 300 и 250 мкм, используется для определения гранулометрического состава; истираемость таблеток (ОФС.1.4.2.0004.15, ГФ, XIV издание, том II) – тестер истираемости таблеток PTF 30 ERA (Pharma Test, Германия); оптическая микроскопия (ОФС.1.2.1.0009.15, ГФ, XIV издание, том I) – микроскоп Nikon Eclipse E 200; цифровая камера Nikon Ds-Ri2. Данные обработаны с помощью методов SeDeM и SeDeM-ODT.

Результаты. Разработаны модельные составы, содержащие различные типы копроцессных наполнителей и скользящее вспомогательное вещество, которые изучались с помощью основных фармацевтико-технологических методов исследования и оптической микроскопии. На основании полученных данных были построены диаграммы SeDeM-ODT, в которых параметры переводились в «радиусы», отражающие степень приемлемости по каждой технологической характеристике. Кроме того, по круговым диаграммам рассчитывались следующие показатели (факторы): объемный параметр, параметр сыпучести, коэффициенты сжимаемости, устойчивости, дозирования, диспергируемости, а также индекс хорошего прессования, параметрический индекс и параметрический индекс профиля.

Выводы. По результатам исследования отобран наиболее оптимальный состав, приемлемый по всем рассматриваемым факторам и имеющий наиболее высокое значение параметрического индекса.

Ключевые слова: таблетки ГК-2, диспергируемые в полости рта, SeDeM-ODT, круговые диаграммы, оптическая микроскопия, гомогенность

Для цитирования: Тишков С.В., Бlynская Е.В., Алексеев К.В., Буюва В.В. Использование метода SeDeM-ODT для разработки таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта. Российский биотерапевтический журнал 2021; 20(3):34–46. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-34-46.

Using the SeDeM-ODT method for the development of GK-2 tablets dispersed in the oral cavity

Sergey V. Tishkov, Evgenia V. Blynskaya, Konstantin V. Alekseev, Victoria V. Buyeva

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

Contacts: Sergey Valerievich Tishkov sergey-tishkov@ya.ru

Introduction. The SeDeM-ODT method is a relatively new method based on expert judgment and pie charts, which reflect 15 main parameters of the suitability of a dosage form for direct compression and dispersibility in the oral cavity.

The purpose of the research presented in this article is to study the pharmaceutical substance (API) GK-2 (bis-(N-monosuccinyl-L-glutamyl-L-lysine)hexamethylenamide) using the SeDeM-method, to determine the direction for the correction of technological properties using excipients and to develop using the presented methods of the composition of tablets GK-2, dispersible in the oral cavity.

Materials and methods. Preparation of tablets – manual hydraulic press PRG-50; method for determining flowability (GPM.1.4.2.0016.15, GP XIV, volume 2) – bulk density analyzer (ERWEKA SVM 221), GTB flowability tester (ERWEKA, Germany); crushing strength of tablets (GPM.1.4.1.0011.15, GP XIV, volume 2) – strength analyzer TBF 1000 CopleyScientific® (Great Britain); method for determining disintegration (GPM.1.4.2.0013.15, GP XIV edition, volume 2) – PTZ-S disintegration tester (Pharma Test, Germany); weight loss on drying (GPM.1.2.1.0010.15, GP XIV edition, volume 1) – moisture analyzer Sartorius MA-35 (Sartorius AG, Germany); determination of fractional composition – a vibrating sieve with pore sizes: 850, 600, 425, 300 and 250 microns, is used to determine the particle size distribution; tablet abrasion tester (GPM.1.4.2.0004.15, GP XIV edition, volume 2) – tablet abrasion tester PTF 30 ERA (Pharma Test, Germany); Optical microscopy (GPM.1.2.1.0009.15, GP XIV edition, volume I) – microscope Nikon, Eclipse E 200; digital camera Nikon Ds-Ri2. The data were processed using the SeDeM and SeDeM-ODT methods.

Results. Model formulations have been developed containing various types of co-process fillers and a sliding excipient, which have been studied using the main pharmaceutical-technological methods and optical microscopy. Based on the data obtained, SeDeM-ODT diagrams were constructed, in which the parameters were converted into “radii”, reflecting the degree of acceptability for each technological characteristic. In addition, the following factors were calculated from the pie charts: volumetric parameter, compressibility coefficient, flowability parameter, stability coefficient, dosage coefficient, dispersibility coefficient, as well as the index of good pressing, the parametric index and the parametric index of the profile.

Conclusion. As a result of the data obtained, the most optimal composition was selected that was acceptable for all the factors under consideration and had the highest values of the parametric index.

Key words: oral dispersible GK-2 tablets, SeDeM-ODT, pie charts, optical microscopy, homogeneity

For citation: Tishkov S.V., Blynskaya E.V., Alekseev K.V., Buyeva V.V. Using the SeDeM-ODT method for the development of GK-2 tablets dispersed in the oral cavity. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):34–46. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-34-46.

Введение

Таблетки, диспергируемые в полости рта, являются перспективной лекарственной формой (ЛФ), подходящей для широкого круга пациентов, в частности страдающих дисфагией или затруднениями глотания [1–3]. Особенно актуальна данная проблема для пожилых пациентов, которым необходима постоянная пожизненная терапия, например нейропротекторами. В число таких лекарственных средств потенциально могут попасть таблетки, диспергируемые в полости рта, разрабатываемые в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» на основе оригинальной фармацевтической субстанции (ФС) – гексаметиленамида бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина) (ГК-2). Данная ФС обладает нейропротекторной, противопаркинсонической активностью и проявила положительный фармакологический эффект в доклинических испытаниях на моделях болезни Альцгеймера и Паркинсона [4, 5]. Указанная ФС сконструирована и синтезирована под руководством Т.А. Гудашевой в отделе химии лекарственных средств и имеет шифр ГК-2 [6].

Таблетки, диспергируемые в полости рта (орально диспергируемые таблетки), могут быть получены различными методами на основе запатентованных

технологий – с использованием лиофилизации, аддитивных технологий, микро-, наночастиц и т.д. Однако наиболее рациональным и технологически доступным способом получения и производства таблеток, диспергируемых в полости рта, является прямое прессование таблеточных смесей [7].

В настоящее время для подбора и оптимизации состава таблеток для изготовления способом прямого прессования довольно часто используют метод экспертных оценок SeDeM. Это оригинальный, воспроизводимый метод, применяемый в предварительных исследованиях таблеток и предоставляющий информацию о пригодности лекарственного средства и вспомогательных веществ (ВВ) для применения технологии прямого прессования [8, 9]. Метод SeDeM позволяет определять свойства порошкового материала, требующие корректировки, и облегчает разработку готовой ЛФ с помощью технологии прямого прессования. К сожалению, данный метод имеет ряд недостатков. Например, в нем совершенно не отражен такой параметр как распадаемость, который является наиболее критичным для таблеток, диспергируемых в полости рта. По этим причинам для разработки орально диспергируемых таблеток была создана модификация метода – SeDeM-ODT,

в которой, в отличие от стандартного метода, рассмотрены такие параметры, как время распадаемости «с диском», «без диска» и испытание распадаемости, описанное для шипучих таблеток [10–12].

Данный метод более полноценно описывает ВВ, ФС и их смеси по большинству фармацевтико-технологических свойств и в наибольшей степени подходит для изучения таблеток, диспергируемых в полости рта, полученных методом прямого прессования.

Цель настоящего исследования заключается в разработке состава таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта, получаемых способом прямого прессования, с использованием метода экспертной оценки SeDeM-ODT и применением различных типов копроцессных наполнителей. Кроме того, важной составляющей исследования является проведение оценки фармацевтико-технологических свойств составов, в том числе методом оптической микроскопии.

Материалы и методы

Используемые материалы. Субстанция — ГК-2 (гексаметиленамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизин)) (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Россия); ВВ — матрицеобразующие наполнители F-Melt® (Fuji Chemical Industries Co., Япония), Prosolv® ODT G2 (JRS Pharma, Германия), Ludiflash® (BASF, Германия), Pearlitol® Flash (Roquette, Франция); смазывающее вещество — магния стеарат (Nitika Pharmaceutical Specialities, Индия).

Используемое оборудование и методики. Получение таблеток — ручной гидравлический пресс ПРГ-50; методика определения сыпучести (ОФС.1.4.2.0016.15, Государственная фармакопея РФ (ГФ), XIV издание, том II) — анализатор насыпной плотности (ERWEKA SVM 221), тестер определения сыпучести GTB (ERWEKA, Германия); прочность таблеток на раздавливание (ОФС.1.4.1.0011.15, ГФ, XIV издание, том II) — анализатор прочности TBF 1000 Copley Scientific® (Великобритания); методика определения распадаемости (ОФС.1.4.2.0013.15, ГФ XIV, том 2) — тестер распадаемости PTZ-S (Pharma Test, Германия); потеря в массе при высушивании (ОФС.1.2.1.0010.15, ГФ, XIV издание, том I) — анализатор влажности Sartorius MA-35 (Sartorius AG, Германия); гигроскопичность; определение фракционного состава — вибрационное сито с размерами пор 850, 600, 425, 300 и 250 мкм (используется для определения гранулометрического состава); истираемость таблеток (ОФС.1.4.2.0004.15, ГФ, XIV издание, том II) — тестер истираемости таблеток PTF 30 ERA (Pharma Test, Германия); оптическая микроскопия (ОФС.1.2.1.0009.15, ГФ, XIV издание, том I) — микроскоп Nikon Eclipse E 200; цифровая камера Nikon Ds-Ri2).

Для обработки полученных данных фармацевтико-технологических испытаний использовали методы

SeDeM и SeDeM-ODT. В табл. 1 представлены основные параметры, применяемые в данных методах.

Параметры, характеризующие порошковый материал: насыпная плотность без уплотнения (D_a), насыпная плотность с уплотнением (D_c), внутренняя пористость (I_e), индекс Карра (Carr's Index, IC), прессуемость (I_{cd}), число Хауснера (Hausner ratio, IH), угол естественного откоса (α), сыпучесть (t'), потеря в массе при высушивании (%LoD), гигроскопичность (%H), размер частиц (%Pf), гомогенность (I0). Экспертная система SeDeM-ODT основана на 15 параметрах [11], которые дополнительно включают свойства, определяющие коэффициент диспергируемости: время распадаемости «с диском», «без диска» и испытание, предусмотренное для шипучих таблеток.

Ниже приведены основные формулы для расчетов и некоторые процедуры определения основных параметров.

Для интерпретации свойств сыпучести и прессуемости использовали индексы Карра и Хауснера, которые рассчитывают по формулам 1 и 2 соответственно:

$$IC = \left(1 - \frac{D_a}{D_c}\right) \times 100 \quad (1),$$

$$IH = \frac{D_c}{D_a} \quad (2),$$

где D_a — насыпная плотность порошка до уплотнения, D_c — насыпная плотность порошка после уплотнения.

Межчастичная пористость. Значения насыпной плотности до и после уплотнения используются для расчета межчастичной пористости с помощью следующего уравнения [12]:

$$I_e = \frac{D_c - D_a}{D_c \times D_a} \quad (3),$$

где I_e — пористость между частицами, D_c — насыпная плотность (г/мл), D_a — объемная плотность (г/мл).

Угол естественного откоса определяют после истечения порошка из воронки [11], установленной на определенной высоте, и рассчитывают с использованием уравнения:

$$\alpha = \tan^{-1}\left(\frac{H}{r}\right) \quad (4),$$

где α — угол естественного откоса порошка (градусы), H — высота конуса, образованного порошком (см), а r — радиус основания конуса, образованного порошком (см).

Индекс гомогенности (однородности) определяется согласно Европейской фармакопее [13] и рассчитывается по приведенным ниже уравнениям.

Таблица 1. Различные параметры и соответствующие им факторы для расчета радиуса, используемые в методах SeDeM и SeDeM-ODT [9–12]
Table 1. Various parameters and their corresponding factors for calculating the radius used in the SeDeM and SeDeM-ODT methods [9–12]

Параметр (обозначение) Parameter (designation)	Единица измерения Units	Уравнение Equations	Предельное значение (V) Limit value (V)	Радиус Radius	Отношение фактора к V Factor to V ratio
Насыпная плотность без уплотнения (Da) Bulk density (Da)	г/мл g/ml	$Da = P/Va^*$	0–1	0–10	10V
Насыпная плотность с уплотнением (Dc) Tapped density (Dc)	г/мл g/ml	$Dc = P/Vc^{**}$	0–1	0–10	10V
Внутренняя пористость (Ie) Inter-particle porosity (Ie)	—	$Ie = (Dc - Da)/Dc \times Da$	0–1,2	0–10	10V/1,2
Индекс Карра (IC) Carr's index (IC)	%	$IC = (Dc - Da)/Dc$	0–50	0–10	10 – (V/5)
Прессуемость (Icd) Cohesion index (Icd)	Н N	Экспериментально Experimentally	0–200	0–10	V/20
Число Хауснера (IH) Hausner ratio (IH)	—	$IH = Dc/Da$	3–1	0–10	10 – (10V/3)
Угол естественного откоса (α) Angle of repose (α)	°	$A = \tan^{-1} h/r$	0–50	0–10	10 – (V/5)
Сыпучесть (t'') Flowability (t'')	с s	Экспериментально Experimentally	0–20	0–10	10 – (V/5)
Влажность (%LoD) Loss on drying (%LoD)	%	Экспериментально Experimentally	0–10	0–10	10 – V
Гигроскопичность (%H) Hygroscopicity (%H)	%	Экспериментально Experimentally	0–20	0–10	10 – (V/2)
Размер частиц (%Pf) Particles size (%Pf)	%	Экспериментально Experimentally	0–50	0–10	10 – (V/5)
Гомогенность (I θ) Homogeneity index (I θ)	—	Уравнение (6)*** The equation (6)***	0,02	0–10	500V
Распадаемость (с диском) (DDT) Disintegration time with disk (DDT)	Мин Min	Экспериментально Experimentally	0–3	0–10	(3 – V) $\times$ 3,333
Распадаемость (без диска) (DT) Disintegration time without disk (DT)	Мин Min	Экспериментально Experimentally	0–3	0–10	(3 – V) $\times$ 3,333
Испытание для шипучих таблеток (ET) Effervescence test (ET)	Мин Min	Экспериментально Experimentally	0–5	0–10	(5 – V) $\times$ 2

*P – масса исследуемого порошка, Va – объем свободно насыпанного порошка; **P – масса исследуемого порошка, Vc – объем уплотненного порошка; ***Уравнение (6) см. в тексте.

*P is the mass of the test powder, Va is the volume of the freely poured powder; **P is the mass of the test powder, Vc is the volume of the compacted powder; ***See equation (6) in the text.

$$I\theta = \frac{Fm}{100 + \Delta Fmn} \quad (5),$$

где $I\theta$ – показатель относительной однородности, а Fm – процентное содержание частиц в основном диапазоне, ΔFmn – разность процентного содержания частиц с различным размером. К данным, полученным в результате гранулометрического анализа, применяется уравнение (6):

$$I\theta = \frac{Fm}{(100 + (d_m - d_{m-1})F_{m-1} + (d_{m+1} - d_m)F_{m+1} + (d_m - d_{m-d_{m-2}})F_{m-2} + (d_{m+2} - d_m)F_{m+2} + (d_m - d_{m-d_{m-n}})F_{m-n} + (d_{m+n} - d_m)F_{m+n})} \quad (6),$$

где $I\theta$ – показатель относительной однородности частиц по размеру в диапазоне исследуемых фракций; Fm – процентное содержание частиц в основном диапазоне; F_{m-1} – процентное содержание частиц

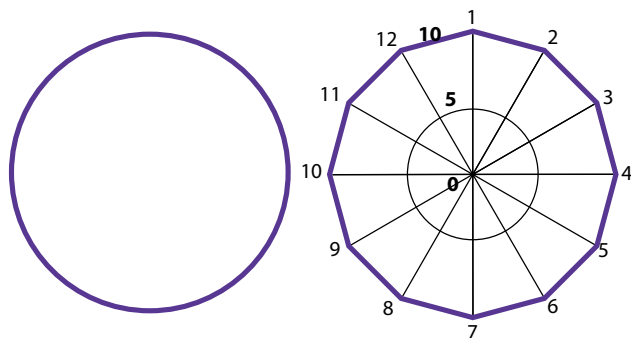


Рис. 1. Принцип построения круговых диаграмм SeDeM

Fig. 1. The principle of constructing pie charts SeDeM

в диапазоне, размер частиц которого непосредственно меньше размера частиц основного диапазона; F_{m+1} — процентное содержание частиц в диапазоне, размер частиц которого непосредственно больше размера частиц основного диапазона; n — порядковый номер частиц, изучаемых в серии, по отношению к основному размеру частиц; d_m — диаметр частиц основной фракции; d_{m-1} — средний диаметр частиц во фракции диапазона непосредственно меньшего размера относительно основного; d_{m+1} — средний диаметр частиц во фракции диапазона, непосредственно большего относительно основного.

После изучения и расчета основных параметров для общей оценки пригодности порошкового материала для прямого прессования необходимо рассчитать математические индексы для образцов, основанных на SeDeM-диаграмме:

- 1) параметрический индекс (IP) = число параметров с радиусом ≥ 5 /общее число параметров (допустимый предел $IP \geq 0,5$);
- 2) параметрический индекс профиля (IPP) = средний радиус всех параметров (допустимый предел $IPP \geq 5$);
- 3) индекс хорошего прессования и диспергируемости (IGC) = $IPP \times f$, где f является фактором (коэффициентом) надежности и f = площадь многоугольника/площадь окружности. Включение большего количества параметров в исследование повысит коэффициент надежности (данная характеристика — сравнительная, и допустимые пределы отсутствуют). Его значения следующие:
 - для бесконечного количества параметров — $f = 1$ (максимальное значение);
 - для 15 параметров — $f = 0,971$;
 - для 12 параметров — $f = 0,952$;
 - для 8 параметров — $f = 0,900$.

Полученные в результате расчетов значения радиуса по каждому параметру откладывают на круговой диаграмме (рис. 1): минимальное значение — 0, максимальное — 10.

Принцип интерпретации результатов в диаграммах SeDeM прост — все показатели больше или равные 5 единицам радиуса считаются удовлетворительными, менее 5 — неудовлетворительными. Идеальное для прямого прессования вещество будет иметь диаграмму в виде круга. Соответственно, чем больше площадь диаграммы, тем больше модельный состав подходит для прямого прессования и получения готовой ЛФ [9, 10].

Таблица 2. Результаты испытания фармацевтической субстанции, значения радиуса диаграммы SeDeM и индексов

Table 2. Results of testing of pharmaceutical substance, values of the radius of the SeDeM diagram and indices

Параметр Option	Обозначение Designation	Значение (V) Value (V)	Радиус (r) Radius (r)
Объемная плотность, г/мл Bulk density, g/ml	Da	0,429	4,290
Насыпная плотность, г/мл Tapped density, g/ml	Dc	0,878	4,290
Пористость Porosity	Ie	1,192	9,934
Индекс Карра, % Carr's index, %	IC	51,139	10,228
Прессуемость, Н Compressibility, N	Icd	65	3,250
Число Хауснера Hausner number	IH	2,047	3,178
Угол естественного откоса, ° Angle of repose, °	α	49	0,200
Сыпучесть, с Looseness, s	t'	20,00	0,000
Влажность, % Residual moisture, %	%LoD	1,9	8,100
Гигроскопичность, % Hygroscopicity, %	%H	3,5	8,250
Размер частиц, % Particle size, %	%Pf	7,41	8,519
Гомогенность Homogeneity	I0	0,009	4,318
IPP			5,380
IGC			5,121
IP			0,417

Примечание. Здесь, на рис. 2, 8 и в табл. 6: IPP — параметрический индекс профиля; IGC — индекс хорошего прессования; IP — параметрический индекс.

Note. Here, on figure 2, 8 and in table 6: IPP — Parametric Profile Index; IGC — Good Compaction Index; IP — Parametric Index.

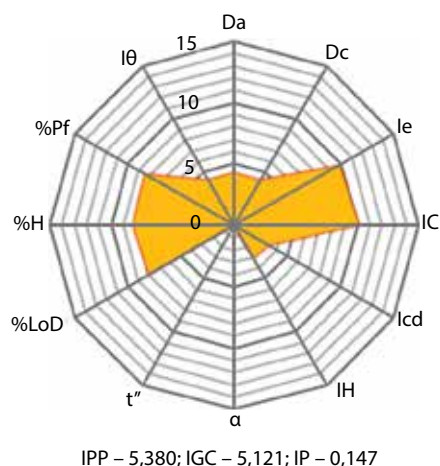


Рис. 2. Круговая диаграмма для фармацевтико-технологических свойств фармацевтической субстанции ГК-2

Fig. 2. Pie chart for pharmaceutical and technological properties of pharmaceutical substance GK-2

Результаты и обсуждение

Для разработки состава таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта, на 1-м этапе исследований оценивали пригодность ФС для прямого прессования с помощью диаграммы SeDeM и определяли свойства, требующие коррекции. Изучение ФС ГК-2 проводили с применением методик, описанных в разделе «Материалы и методы», с помощью диаграммы SeDeM. Результаты испытаний и рассчитанные радиусы представлены в табл. 2.

В результате изучения технологических свойств ФС ГК-2 на диаграмме (рис. 2) наглядно продемонстрирована необходимость улучшения характеристик по объемным параметрам и параметрам сыпучести,

среди остальных технологических характеристик следует выделить неудовлетворительные значения прессуемости и гомогенности. Поэтому, несмотря на общие относительно высокие значения параметрического индекса профиля и индекса хорошего прессования, требуется добавление ВВ, улучшающих указанные фармацевтико-технологические характеристики и позволяющих получить таблетки ГК-2, диспергируемые в полости рта, соответствующие необходимым требованиям ГФ XIV издания.

Для получения модельных составов таблеточных смесей использовали копроцессные наполнители [14] для прямого прессования, смазывающие ВВ, указанные в разделе «Материалы и методы». Копроцессные ВВ представляют собой предварительно смешанные, подготовленные путем технологической обработки материалы, предназначенные для создания быстро диспергируемых таблеток, получаемых методом прямого прессования. Модельные составы и соотношения ВВ представлены в табл. 3, для выбора наилучшей модельной смеси рассматривали основные наполнители для фармацевтического применения.

После получения таблеточных смесей проводили оценку по показателям: сыпучесть (с), насыпная плотность (г/мл) до и после уплотнения, прессуемость, размер и распределение частиц, потеря в массе при высушивании, распадаемость «с диском», «без диска» и в стакане в соответствии с испытаниями, предусмотренными для шипучих таблеток в ГФ XIV издания, рассчитывали коэффициент прессуемости или число Хаусснера, коэффициент Карра, пористость. Данные показатели представлены в табл. 4 и позволяют сделать вывод о схожести результатов

Таблица 3. Состав модельных смесей и таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта, полученных методом прямого прессования

Table 3. Composition of model mixtures and tablets GK-2, dispersible in the oral cavity, obtained by direct compression

Серия Series	Содержание, мг Content, mg					
	ГК-2 GK-2	F-melt M®	Ludiflash®	Prosolv ODT G2®	Pearlitol Flash®	Магния стеарат Magnesium stearate
1	5,0	94,5	—	—	—	0,5
2	5,0	94,0	—	—	—	1,0
3	5,0	—	94,5	—	—	0,5
4	5,0	—	94,0	—	—	1,0
5	5,0	—	—	94,5	—	0,5
6	5,0	—	—	94,0	—	1,0
7	5,0	—	—	—	94,5	0,5
8	5,0	—	—	—	94,0	1,0

Таблица 4. Результаты испытаний таблеточной массы и таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта (средние значения, V)
Table 4. Test results of tablet mass and tablets GK-2, dispersible in the oral cavity (average values, V)

Фармацевтико-технологическое свойство Pharmaceutical and technological properties	Состав, № Composition, №							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Насыпная плотность до уплотнения, г/мл Bulk density, g/ml	0,586	0,582	0,580	0,602	0,614	0,633	0,286	0,284
Насыпная плотность после уплотнения, г/мл Tapped density, g/ml	0,655	0,650	0,664	0,724	0,738	0,850	0,348	0,338
Пористость Inter-particle porosity	0,180	0,180	0,218	0,280	0,274	0,403	0,623	0,563
Индекс Карра, % Carr's index, %	10,534	10,462	12,651	16,851	16,802	25,529	17,816	15,976
Прессуемость, Н Cohesion index, N	128,00	84,520	115,19	107,39	65,390	74,660	91,610	88,180
Число Хауснера Hausner ratio	1,118	1,117	1,145	1,203	1,202	1,343	1,217	1,190
Угол естественного откоса, ° Angle of repose, °	27,000	28,000	34,000	29,000	34,000	35,000	25,000	26,000
Сыпучесть, с Flowability, s	3,70	3,57	2,94	3,45	2,94	2,86	4,00	3,85
Потеря в массе при высушивании, % Loss on drying, %	2,514	2,697	0,887	0,897	2,773	2,247	2,053	2,080
Гигроскопичность, % Hygroscopicity, %	0,838	0,899	0,296	0,299	0,924	0,749	0,684	0,693
Размер частиц, % Particles size, %	32,000	32,500	32,184	32,684	32,653	33,153	14,894	15,394
Гомогенность Homogeneity index	0,017	0,019	0,016	0,018	0,018	0,020	0,008	0,010
Распадаемость (с диском), мин Disintegration time with disk, min	0,74	1,16	5,77	19,38	4,45	5,28	0,26	0,46
Распадаемость (без диска), мин Disintegration time without disk, min	1,14	1,56	6,17	19,78	4,85	5,68	0,31	0,51
Испытание для шипучих таблеток, мин Effervescence test, min	3,64	4,06	8,67	22,28	7,35	8,18	3,01	3,21

по большинству параметров и необходимости применения метода SeDeM-ODT.

Для наиболее полноценного изучения фармацевтико-технологических свойств модельных составов и обоснования влияния фармацевтических факторов детерминации (вида и количества наполнителей и смазывающего вещества) на исследуемые свойства и рассчитанные данные проводили микроскопию таблеточных смесей и описывали размеры и форму основных фракций состава (рис. 3–7).

Исходя из результатов оптической микроскопии (см. рис. 3), можно сделать вывод о том, что частицы модельного состава № 1 и, соответственно, состава № 2 (практически идентичного, но не проиллюстрированного) по степени ассоциации являются конгломератами (смесью нескольких типов частиц), по форме и размерам они относительно однородны, основные фракции представлены крупными равносторонними сферическими частицами, более мелкими колоннообразными частицами, встречаются

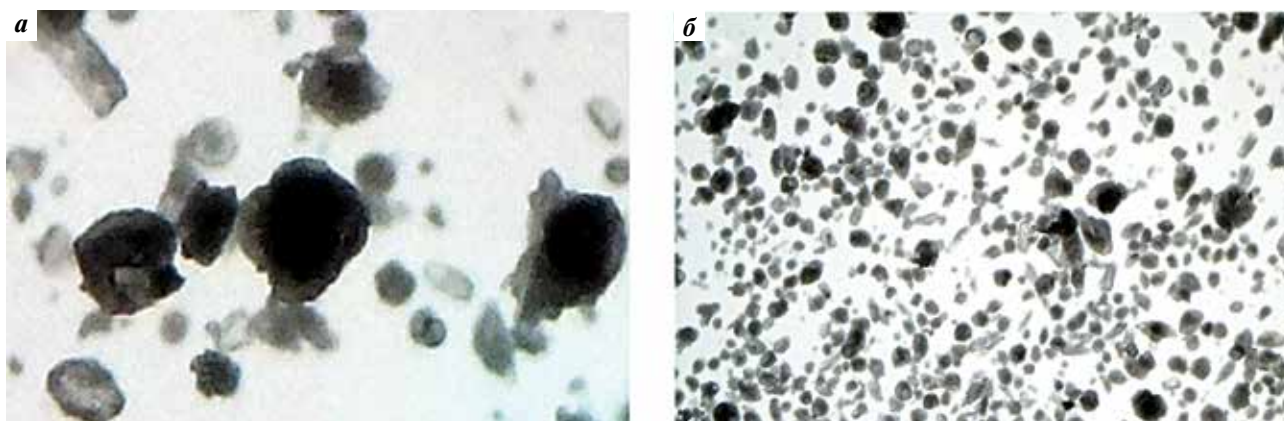


Рис. 3. Микрофотография частиц таблеточной массы модельного состава № 1. $\times 500$ (а); $\times 200$ (б)

Fig. 3. Micrograph of particles of tablet mass of model composition No 1. $\times 500$ (a); $\times 200$ (б)

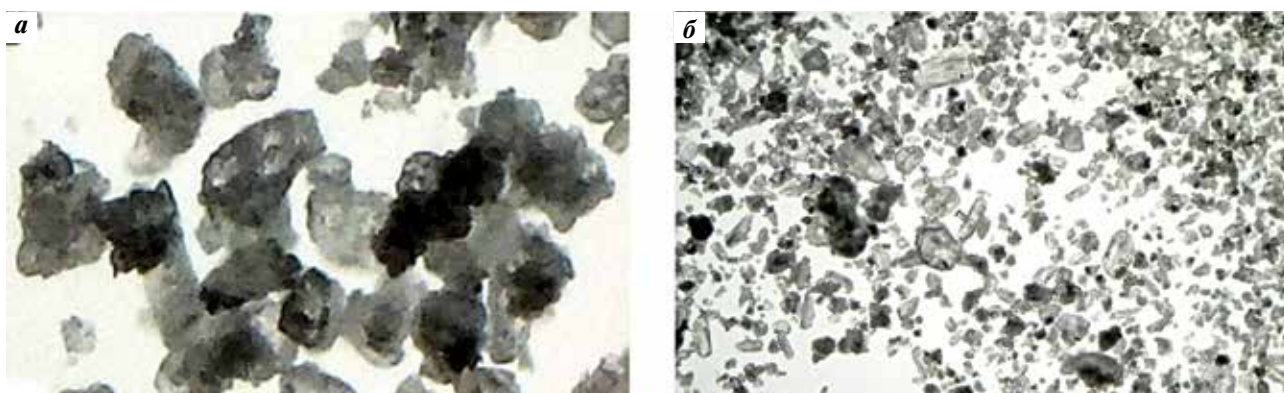


Рис. 4. Микрофотография частиц таблеточной массы модельного состава № 3. $\times 500$ (а); $\times 200$ (б)

Fig. 4. Micrograph of particles of tablet mass of model composition No 3. $\times 500$ (a); $\times 200$ (б)

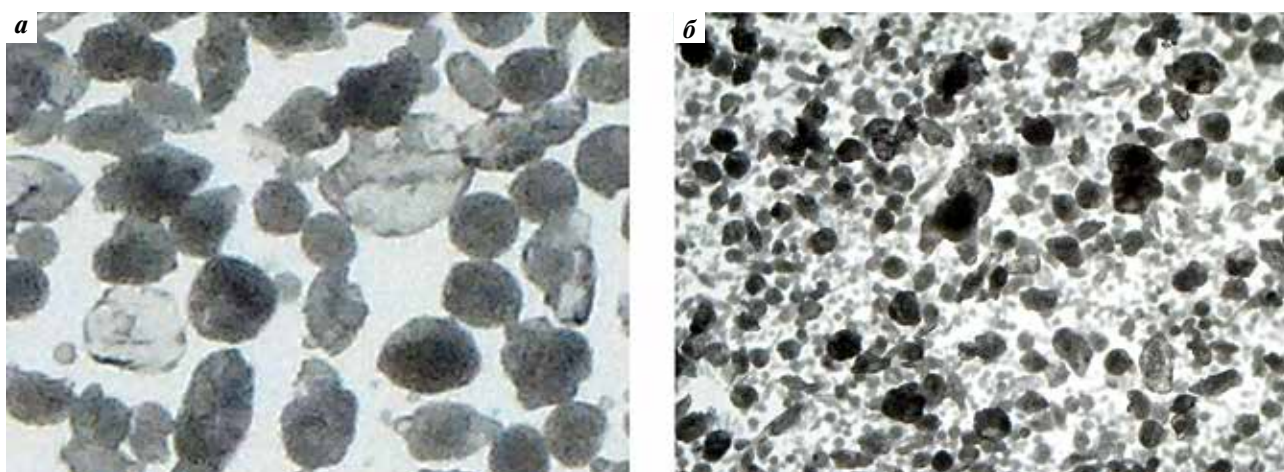


Рис. 5. Микрофотография частиц таблеточной массы модельного состава № 5. $\times 500$ (а); $\times 200$ (б)

Fig. 5. Micrograph of particles of tablet mass of model composition No 5. $\times 500$ (a); $\times 200$ (б)

также планкообразные частицы. Поверхность частиц гладкая, иногда шероховатая с гладкими краями. По результатам анализа модельных составов можно судить об удовлетворительных характери-

стиках морфологии частиц, небольшом распределении по фракциям и гладкой поверхности, что поможет интерпретировать результаты анализа SeDeM-ODT.

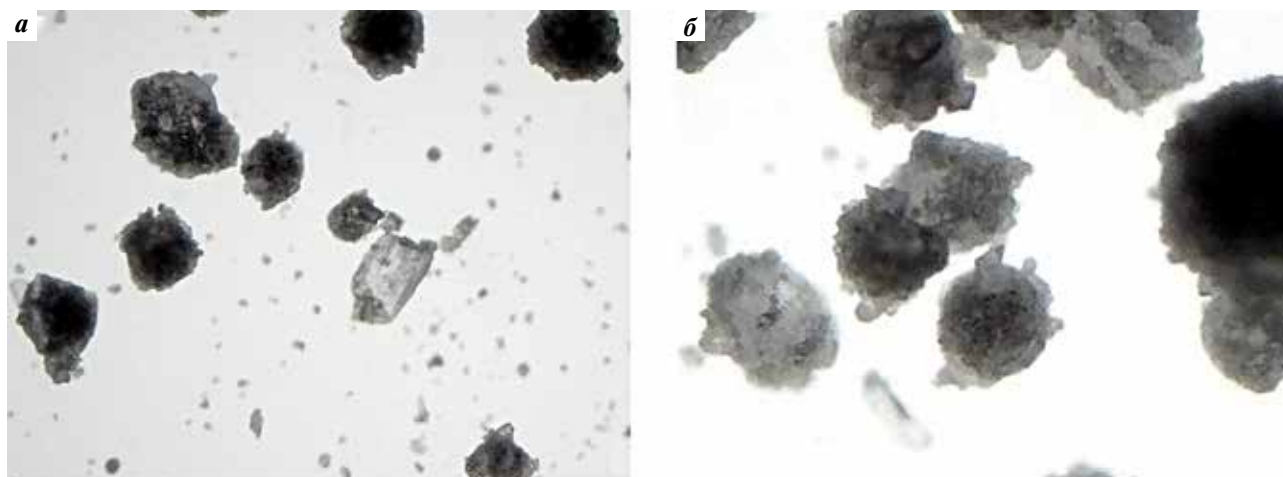


Рис. 6. Микрофотография частиц таблеточной массы модельного состава № 7. $\times 200$ (а); $\times 250$ (б)

Fig. 6. Micrograph of particles of tablet mass of model composition No 7. $\times 200$ (a); $\times 250$ (б)

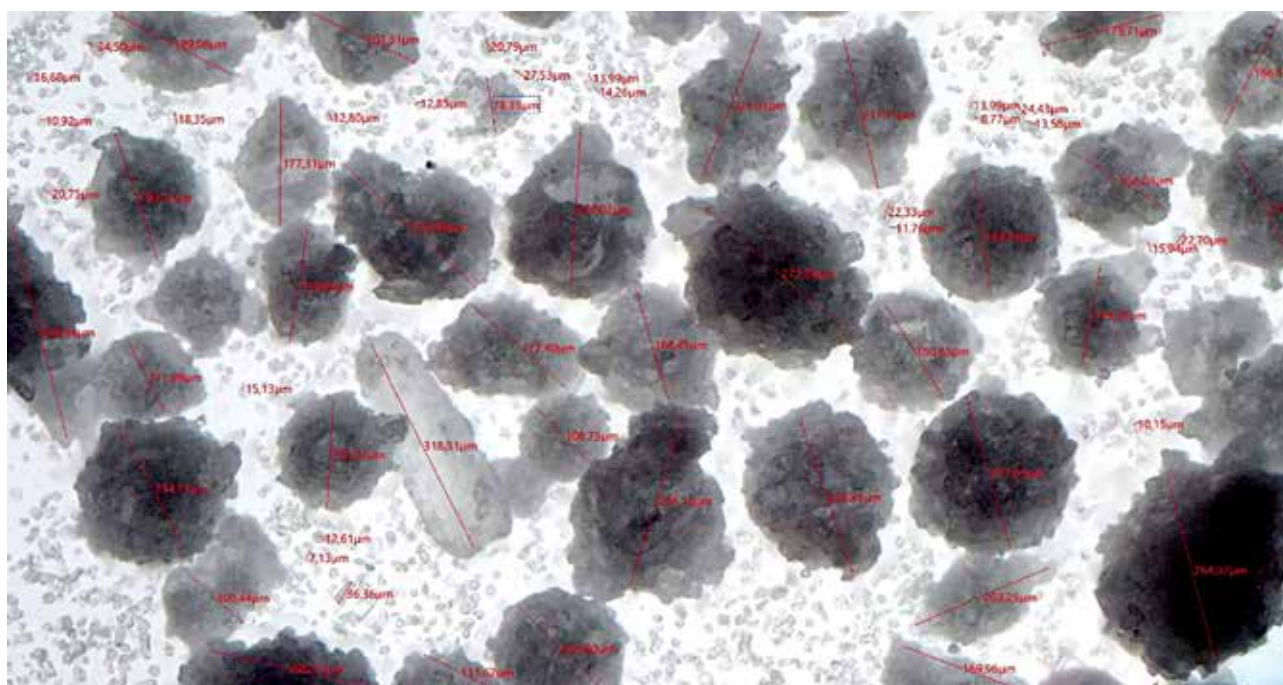


Рис. 7. Микрофотография частиц таблеточной массы модельного состава № 8. $\times 250$

Fig. 7. Micrograph of particles of tablet mass of model composition No 8. $\times 250$

Частицы модельного состава № 3 (см. рис. 4) по степени ассоциации являются конгломератами, состоящими из различных фракций частиц, включающих крупные планкообразные и сферические частицы, пластинчатые, средние колонообразные и мелкие кубические частицы. Встречаются агрегаты из нескольких типов частиц. По характеру поверхности частицы также отличаются: гладкие, шероховатые, иногда изрытые с гладкими и зазубренными краями. Исходя из показателей морфологии частиц, данные составы должны обладать плохой сыпучестью,

однако, возможно, высокой прессуемостью, что подтверждается данными анализа SeDeM.

В результате анализа микрофотографий (см. рис. 5) можно сделать вывод, что модельный состав № 5 представлен несколькими фракциями частиц, отличающимися размерами и формой, прозрачностью, характером поверхности и края. Встречаются крупные и мелкие игольчатые частицы, основная фракция представлена сферическими частицами с шероховатой и иногда изрытой поверхностью. Наблюдаются кубические и планкообразные частицы. С описанными

Таблица 5. Радиусы (r) для диаграмм SeDeM-ODT таблеток ГК-2, диспергируемых в полости ртаTable 5. Radii (r) for SeDeM-ODT diagrams of GK-2 orally dispersible tablets

Фармацевтико-технологическое свойство Pharmaceutical and technological properties	Состав, № Composition, №							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Насыпная плотность до уплотнения Bulk density	5,86	5,82	5,8	6,02	6,14	6,33	2,86	2,84
Насыпная плотность после уплотнения Tapped density	5,860	5,820	5,800	6,020	6,140	6,330	2,860	2,840
Пористость Inter-particle porosity	1,498	1,498	1,818	2,333	2,280	3,361	5,191	4,688
Индекс Карра Carr's index	2,107	2,092	2,530	3,370	3,360	5,106	3,563	3,195
Прессуемость Cohesion index	6,400	4,226	5,760	5,370	3,270	3,733	4,581	4,409
Число Хауснера Hausner ratio	6,274	6,277	6,184	5,991	5,993	5,524	5,944	6,033
Угол естественного откоса Angle of repose	4,600	4,400	3,200	4,200	3,200	3,000	5,000	4,800
Сыпучесть Flowability	8,148	8,214	8,529	8,276	8,529	8,571	8,000	8,077
Потеря в массе при высушивании Loss on drying	7,486	7,303	9,113	9,103	7,227	7,753	7,947	7,920
Гигроскопичность Hygroscopicity	9,581	9,551	9,852	9,851	9,538	9,626	9,658	9,653
Размер частиц Particles size	3,600	3,500	3,563	3,463	3,469	3,369	7,021	6,921
Гомогенность Homogeneity index	8,333	9,333	7,815	8,815	8,936	9,936	3,830	4,830
Распадаемость (с диском) Disintegration time with disk	7,54	6,14	0,00	0,00	0,00	0,00	9,12	8,45
Распадаемость (без диска) Disintegration time without disk	6,21	4,81	0,00	0,00	0,00	0,00	8,95	8,29
Испытание для шипучих таблеток Effervescence test	2,73	1,89	0,00	0,00	0,00	0,00	3,97	3,57

морфологическими характеристиками частиц следует связывать уменьшение значений сыпучести и другие показатели, выявленные при изучении фармацевтико-технологических свойств.

Микроскопия модельных составов № 7 (см. рис. 6), № 8 (см. рис. 7) продемонстрировала, что основную фракцию порошкообразного материала составляют крупные, однородные по размеру и форме частицы сферической и кубической формы с шероховатой поверхностью и агрегированными скользящими ВВ на них. Иногда встречаются крупные колонообразные частицы с шероховатой поверхностью.

На рис. 7 можно заметить мелкую фракцию скользящего вещества среди крупных частиц, не агрегированную на частицах наполнителя во время опудривания при увеличении его количества. Данные результаты свидетельствуют о возможном влиянии распределения скользящего вещества на фармацевтико-технологические характеристики модельных составов. Для наиболее точного сравнения характеристик модельных составов построены диаграммы SeDeM-ODT (рис. 8) и определены их радиусы (табл. 5).

В результате анализа диаграмм SeDeM модельных составов таблеток ГК-2 сделан вывод о пригодности

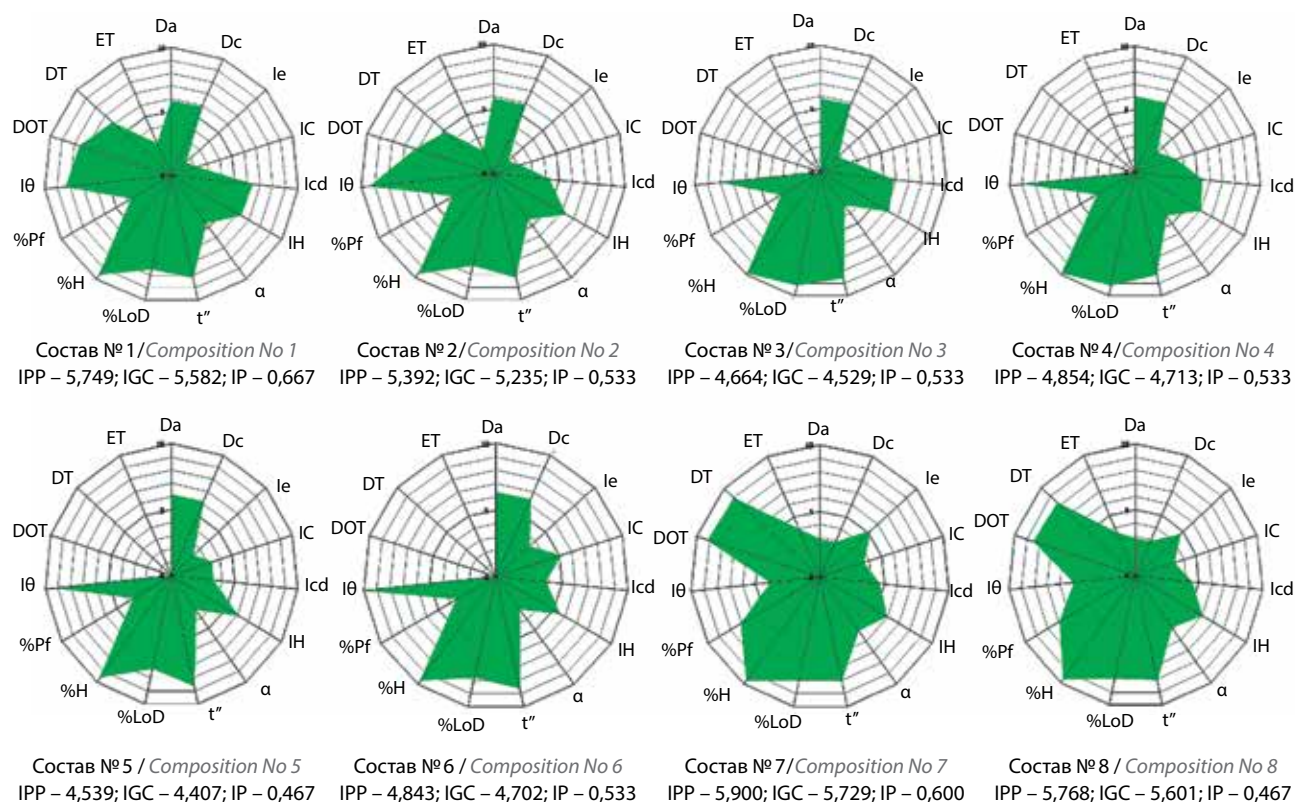


Рис. 8. SeDeM-ODT-диаграммы модельных составов таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта

Fig. 8. SeDeM-ODT diagrams of model compositions of GK-2 orally dispersible tablets

Таблица 6. Факторы и индексы SeDeM-диаграмм таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта

Table 6. Factors and SeDeM indices of diagrams of GK-2 orally dispersible tablets

№ No	Объемный параметр Dimension	Коэффициент сжимаемости Compressibility	Параметр сыпучести Flowability/ Powder flow	Коэффициент устойчивости Lubricity/Stability	Коэффициент дозирования Lubricity/Dosage	Коэффициент диспергируемости Disgregability	IPP	IGC	IP
1	5,86	5,00	9,51	8,53	5,97	5,49	5,75	5,58	0,67
2	5,82	3,91	9,45	8,43	6,42	4,28	5,39	5,24	0,53
3	5,80	5,05	8,96	9,48	5,69	0,00	4,66	4,53	0,53
4	6,02	5,54	9,23	9,48	6,14	0,00	4,85	4,71	0,53
5	6,14	4,46	8,86	8,38	6,20	0,00	4,54	4,41	0,47
6	6,33	6,10	8,55	8,69	6,65	0,00	4,84	4,70	0,53
7	2,86	6,67	9,47	8,80	5,43	7,35	5,90	5,73	0,60
8	2,84	6,15	9,45	8,79	5,88	6,77	5,77	5,60	0,47

составов для создания быстро диспергируемых систем практически по всем параметрам, однако характеристики распадаемости у многих составов превышали допустимые 3 мин для распадаемости и 5 мин – при испытаниях, предусмотренных для шипучих табле-

ток, ввиду чего их радиусы были приравнены к нулю. Например, для составов с наполнителем Prosolv ODT G2® распадаемость «без диска» составляла 4,85 мин и 5,68 мин при используемом давлении прессования. Для выявления наиболее оптимального состава

сравнивали факторы и рассчитанные индексы диаграммы (табл. 6): параметрический индекс, парметрический индекс профиля и индекс хорошего прессования.

При изучении рассчитанных индексов и факторов анализа SeDeM-ODT выделили 3 состава, обладающих наилучшими характеристиками и наиболее высокими значениями индексов. Сравнивая данные показатели, можно отметить, что наиболее высокое значение параметрического индекса было у состава № 1, а наиболее высокие значения индекса хорошего прессования и параметрического индекса профиля — у модельной смеси № 7.

Отбор наиболее оптимального модельного состава осуществляли на основе факторов диаграммы SeDeM-ODT. Ввиду того, что значения радиусов всех факторов для состава № 1 имели значения больше 5, что является допустимым, данный состав признан наилучшим.

Выводы

На основании результатов разработки состава таблеток ГК-2, диспергируемых в полости рта, с помощью методов построения диаграмм SeDeM и SeDeM-ODT сделан вывод о целесообразности их применения для данной ЛФ. С помощью метода

экспертных оценок SeDeM проведена оценка изученных физико-химических и фармацевтико-технологических свойств субстанции ГК-2 и отмечены основные направления по улучшению данных свойств. С учетом представленных факторов проведена разработка модельных составов. Данные модельные составы изучали с помощью оптической микроскопии и других методов оценки фармацевтико-технологических свойств, необходимых для метода SeDeM-ODT. В результате анализа сферических диаграмм выявлен состав, значения параметров которого обеспечивают оптимальный уровень таких факторов пригодности для прямого прессования, как объемный параметр, коэффициент сжимаемости, параметр сыпучести, коэффициент устойчивости, коэффициент дозирования, коэффициент диспергируемости. Кроме того, модельный состав следующего компонентного содержания: ГК-2 0,005 г, F-melt тип M® 0,0945 г, магния стеарат 0,0005 г обладает наибольшим значением параметрического индекса. Однако, ввиду присутствия некоторых недостатков, обнаруженных в результате анализа SeDeM-ODT, следует провести дальнейшую коррекцию фармацевтико-технологических свойств и оптимизацию технологии прямого прессования с помощью методов математического моделирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. и др. Разработка состава и технологии таблеток-лиофилизатов ГК-2. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2019;3:18–25. [Blynskaja E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. et al. Development of the composition and technology of tablets-lyophilizates GK-2. Voprosy obespechenija kachestva lekarstvennyh sredstv = Issues of ensuring the quality of medicines 2019;3:18–25. (In Russ.)].
- Almukainzi M., Araujo G.L.B., Löbenberg R. Orally disintegrating dosage forms. J Pharm Investig 2019;49(2):229–43. DOI: 10.1007/s40005-018-0408-2.
- Blynskaya E., Tishkov S., Alekseev K. et al. Development and optimization of the lyophilized tablets containing a dipeptide mimetic of the Nerve Growth Factor using the desirability function and analysis of variance (ANOVA). Int J Pharm Res 2020;12(Suppl Iss):925–40. DOI: 10.31838/ijpr/2020.SP1.142.
- Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А. и др. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции в крысиных моделях болезни Альцгеймера. Acta Naturae (русскоязычная версия) 2013;5(3):88–95. Povarnina P.Ju., Voroncova O.N., Gudasheva T.A. et al. Original dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2 restores impaired cognitive functions in rat models of Alzheimer's disease. Acta Naturae (Russkoyazichnaya versia) = Acta Naturae (Russian version) 2013;5(3):88–95. (In Russ.)].
- Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н. и др. Нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 на модели двусторонней необратимой перевязки сонных артерий у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология 2012;75(9):15–20. [Povarnina P.Ju., Gudasheva T.A., Voroncova O.N. et al. Neuroprotective effects of dimeric dipeptide mimetic of nerve growth factor GK-2 in a model of bilateral irreversible ligation of the carotid arteries in rats. Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija = Experimental and Clinical Pharmacology 2012;75(9):15–20. (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-15-20.
- Середенин С.Б., Силачев Д.Н., Гудашева Т.А. и др. Исследование нейропротекторного действия дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 при индукции экспериментальной фокальной ишемии в бассейне средней мозговой артерии. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2011;151(5):518–9. [Seredenin S.B., Silachev D.N., Gudasheva T.A. et al. Investigation of the neuroprotective effect of the dipeptide mimetic of the nerve growth factor GK-2 during the induction of experimental focal ischemia in the middle cerebral artery basin. Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine 2011;151(5):518–9. (In Russ.)].
- Блынская Е.В., Тишков С.В., Алексеев К.В. и др. Особенности создания методом лиофилизации таблеток, диспергируемых в полости рта. Фармация 2019;68(2):17–23. [Blynskaja E.V., Tishkov S.V., Alekseev K.V. et al.

- Features of the creation of tablets dispersed in the oral cavity by the method of lyophilization. *Farmacija = Pharmacy* 2019;68(2):17–23. (In Russ.). DOI: 10.29296/25419218-2019-02-03.
8. Aguilar-Díaz J.E., García-Montoya E., Pérez-Lozano P. et al. The use of the SeDeM Diagram expert system to determine the suitability of diluents—disintegrants for direct compression and their use in formulation of ODT. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73(3):414–23. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.07.001.
 9. Dai S., Xu B., Shi G. et al. SeDeM expert system for directly compressed tablet formulation: A review and new perspectives. *Powder Technology* 2019;342:517–27. DOI: 10.1016/j.powtec.2018.10.027.
 10. Khan A. Optimization of the process variables of roller compaction, on the basis of granules characteristics (flow, mechanical strength, and disintegration behavior): an application of SeDeM-ODT expert system. *Drug Dev Ind Pharm* 2019;45(9):1537–46. DOI: 10.1080/03639045.2019.1634094.
 11. Khan A., Nazir S., Alyami H.S., Ullah A. SeDeM-ODT Expert System: A Solution to Challenges in Characterization of Pharmaceutical Powders and Powdered Material. In: *Advanced Functional Materials*. IntechOpen, 2020.
 12. Sipos E., Oltean A.R., Szabó Z.I. et al. Application of the SeDeM expert systems in the preformulation studies of pediatric ibuprofen ODT tablets. *Acta Pharm* 2017;67(2):237–46. DOI: 10.1515/acph-2017-0017.
 13. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg (France): General Monograph. Council of Europe, 2019.
 14. Алексеев К.В., Блынская Е.В., Юдина Д.В. и др. Копроцессные вспомогательные вещества, особенности и современный ассортимент. Вопросы обеспечения качества лекарственных средств 2020;4(30):55–67. [Alekseev K.V., Blynskaja E.V., Judina D.V. et al. Coprocessing excipients, features and modern assortment. *Voprosy obespechenija kachestva lekarstvennyh sredstv* = Issues of ensuring the quality of medicines 2020;4(30):55–67. (In Russ.)].

Вклад авторов

С.В. Тишков: получение материала исследования, написание текста рукописи;
Е.В. Блынская: разработка дизайна исследования, обобщение материала исследования;
К.В. Алексеев: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
В.В. Буюева: обзор публикаций по теме статьи, анализ материала.

Authors contributions

S.V. Tishkov: obtaining research material, writing the text of the manuscript;
E.V. Blynskaya: development of research design, generalization of research material;
K.V. Alekseev: development of research design, analysis of the data obtained;
V.V. Buyeva: review of publications on the topic of the article, analysis of the material.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Тишков / S.V. Tishkov: <https://orcid.org/0000-0002-8321-6952>
Е.В. Блынская / E.V. Blynskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9494-1332>
К.В. Алексеев / K.V. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0003-3506-9051>
В.В. Буюева / V.V. Buyeva: <https://orcid.org/0000-0002-1640-6916>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 24.07.2021. Принята к публикации: 03.09.2021.

Article submitted: 24.07.2021. Accepted for publication: 03.09.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56>

Разработка полимерных микрочастиц с радахлорином и оценка перспектив их использования в фотодинамической терапии

А.М. Мирошкина¹, С.П. Кречетов², Н.Л. Соловьева¹, 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;

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9

Контакты: Анастасия Максимовна Мирошкина asyamir@mail.ru

Введение. Сегодня активно ведутся разработки по получению систем доставки на основе микро- и наночастиц для повышения избирательности и эффективности действия фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии. Такие частицы позволяют повысить эффективность уже используемых химиотерапевтических препаратов за счет их накопления в опухоли, а также способствуют преодолению лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

Цель исследования – получение микрочастиц на основе биосовместимого блок-сополимера молочной и глицериновой кислот с включением фотосенсибилизатора радахлорина, магнитных наночастиц и перфтордекалина и последующая оценка их использования в качестве терапевтических агентов для фотодинамической терапии.

Материалы и методы. Микрочастицы были получены с помощью метода двойной эмульсии, описаны с помощью электронной микроскопии. Оценка фотодинамических свойств таких микрочастиц была проведена с помощью спектрофотометрии и МТТ-теста на культуре клеток.

Результаты. Получены микрочастицы сферической формы размером менее 1 мкм. Высвобождение действующего вещества из микрочастиц происходило постепенно, в течение 2 нед, а в микрочастицах с магнитными наночастицами концентрация радахлорина оставалась практически неизменной в течение месяца. Воздействие на микрочастицы светом красного светодиода сопровождалось образованием синглетного кислорода. Электронная микроскопия показала внутриклеточное положение микрочастиц в опухолевых клетках. МТТ-тест выявил значительное угнетение жизнеспособности клеток в присутствии микрочастиц.

Заключение. Результаты исследования позволяют рассматривать полученные биосовместимые полимерные микрочастицы с включением в них радахлорина в качестве депо радахлорина для местного применения при фотодинамической терапии опухолей.

Ключевые слова: микрочастицы, радахлорин, перфтордекалин, магнитные наночастицы, фотодинамическая терапия

Для цитирования: Мирошкина А.М., Кречетов С.П., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И. Разработка полимерных микрочастиц с радахлорином и оценка перспектив их использования в фотодинамической терапии. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):47–56. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56.

Development of polymeric microparticles with radachlorine and estimation of the prospects of their use in photodynamic therapy

Anastasia M. Miroshkina¹, Sergey P. Krechetov², Natalia L. Solovieva¹, Ivan I. Krasnyuk¹

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

²Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University); 9 Institutskiy per., Dolgoprudny 141701, Russia

Contacts: Anastasia Maximovna Miroshkina asyamir@mail.ru

Introduction. Nowadays, the development of delivery systems based on micro- and nanoparticles is being actively pursued to increase the selectivity and efficiency of photosensitizers in photodynamic therapy. Such microparticles

could increase the effectiveness of the already used chemotherapeutic drugs due to their accumulation in the tumor and help to overcome the drug resistance of tumor cells.

The aim of this research was to obtain microparticles based on a biocompatible block copolymer of lactic and glycolic acids with the inclusion of the photosensitizer radachlorin, magnetic nanoparticles, and perfluorodecalin and their subsequent evaluation as therapeutic agents for photodynamic therapy.

Materials and methods. Microparticles were obtained using the double emulsion method, described using of electron microscopy. Evaluation of their photodynamic properties was carried out using spectrophotometry and MTT-test on cell culture.

Results. Spherical microparticles with a size of less than 1 μm were obtained. The release of the active substance from microparticles occurred gradually over two weeks, and in the case of the presence of magnetic nanoparticles, the concentration of radachlorin remained practically unchanged for a month. Exposure of microparticles to the light of LED is accompanied by the formation of singlet oxygen. Electron microscopy indicated intracellular position of microparticles in tumor cells. The MTT test revealed a significant inhibition of cell viability in the presence of microparticles.

Conclusion. The research results allow us to consider the obtained biocompatible polymer microparticles with the inclusion of radachlorin as a depot of radachlorin for local use in photodynamic therapy of tumors.

Key words: microparticles, radachlorin, perfluorodecalin, magnetic nanoparticles, photodynamic therapy

For citation: Miroshkina A.M., Krechetov S.P., Solovieva N.L., Krasnyuk I.I. Development of polymeric microparticles with radachlorine and estimation of the prospects of their use in photodynamic therapy. Rossiyskiy bioterapevicheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):47–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56.

Введение

Основным недостатком применения химиотерапии при лечении онкологических заболеваний является системное токсическое действие противоопухолевых препаратов [1]. Использование фотодинамической терапии (ФДТ) в клинической практике характеризуется высоким процентом положительных результатов в лечении опухолей на ранних стадиях [2] и относительно меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с химиотерапией [3]. В основе метода ФДТ лежит способность предварительно введенных в организм фотоактивных веществ — фотосенсибилизаторов (ФС) — накапливаться в опухоли и под воздействием лазерного облучения с определенной длиной волны генерировать цитотоксичный синглетный кислород. Применение процедуры ФДТ уменьшает побочные системные эффекты даже при введении ФС в системный кровоток [4]. В сочетании с эндоскопией ФДТ используется для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта, легких, мочеполовых путей, перитонеальной и плевральной полостей [5].

Радачлорин® (РХ) является ФС 2-го поколения, который используется для флуоресцентной диагностики и ФДТ злокачественных опухолей [6]. В качестве действующих веществ он содержит натриевые соли хлорина е6 (до 90 %), хлорина р6 (5–7 %) и пурпурина 5 (1–5 %). Привлекательность использования РХ обусловлена наличием у него выраженного максимума в красной области спектра поглощения (662 нм) и высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода при поглощении света в этой области [7]. Высокая фототоксичность РХ [8], хорошая избирательность накопления препарата в опухоли и быстрое выведение его из организма обуславливают

отсутствие гиперфоточувствительности кожных покровов и малое количество побочных системных эффектов после ФДТ [8]. Эффективность ФДТ с использованием РХ показана для злокачественных новообразований кожи, легких, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей [9, 10].

Системы доставки на основе микро- и наночастиц (МЧ и НЧ) позволяют повысить эффективность действия на опухоли уже использующихся при лечении рака химиотерапевтических препаратов [11, 12] путем увеличения местного воздействия на молекулярные мишени в результате накопления таких частиц в опухоли. Еще одним положительным моментом использования систем доставки на основе МЧ и НЧ является преодоление лекарственной устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам в молекулярной форме [13].

Включение ФС в состав МЧ и НЧ позволяет повысить эффективность ФДТ не только с помощью описанных выше общих преимуществ использования МЧ и НЧ в качестве систем доставки [14]. Наличие у ФС собственной флуоресценции позволяет визуализировать частицы с этими веществами в тканях организма, что делает МЧ и НЧ с ФС пригодными для тераностики: диагностики, лечения и наблюдения за изменениями в опухоли в ходе лечения [15].

Использование биоразлагаемых полимеров в качестве основы для получения систем доставки стало возможным благодаря их способности образовывать стабильные МЧ и эффективному включению лекарственных веществ различной физико-химической природы в полимерную матрицу. Основными критериями выбора материала для каркаса МЧ являются биосовместимость с клетками, простота изготовления,

отсутствие токсичности и ответных воспалительных процессов, иммунологических и тромбогенных ответов [16].

Включение магнитных наночастиц (МНЧ) в полимерную матрицу МЧ и дальнейшее управление ими с помощью внешнего магнитного поля позволяют рассматривать подобные МЧ в качестве системы целевой доставки лекарственного препарата к соответствующему биологическому объекту [17]. Способность МНЧ поглощать внешнюю электромагнитную энергию и преобразовывать ее в тепло привлекательна для использования таких частиц в качестве гипертермических агентов, улучшающих эффективность лучевой и химиотерапии за счет ускорения процесса поражения и деструкции клеток опухоли [18]. Накопление МЧ, содержащих МНЧ, в пораженной области организма также способствует контрастированию картины, получаемой с помощью магнитно-резонансной томографии [19].

Совместное включение РХ и МНЧ в полимерную матрицу МЧ рассматривается как перспективное направление повышения эффективности использования РХ для ФДТ и флуоресцентной диагностики. Создание таких частиц должно способствовать внутриклеточному накоплению и депонированию РХ, а также пролонгированию его действия. Это позволит еще больше локализовать действие ФС и увеличить продолжительность терапевтического окна для ФДТ.

Цель данного исследования — получение биосовместимых, биodeградируемых полимерных МЧ с включением РХ и МНЧ и оценка возможности использования таких частиц в качестве терапевтических агентов для ФДТ.

Материалы и методы

При изготовлении МЧ в качестве ФС использовали концентрат для приготовления раствора для инфузий «Радахлорин» («РАДА-ФАРМА», Россия), содержащий 3,5 мг/мл смеси натриевых солей хлорина е6, хлорина р6, пурпурина 5.

В работе были использованы: блок-сополимер 65:35 молочной и гликолевой кислот (СМГК) Resomer RG 653 H (Evonik Industries AG, Германия); лецитин Lipoid S 100 (Lipoid GmbH, Германия); перфтордекалин (ПФД), 1,3-дифенилбензофуран (ДФБФ), диметилсульфоксид (Sigma, США); поливиниловый спирт 18–88 (Merck, Германия); метилцеллюлоза А4М (Ashland, США). Хлористый метилен, ацетонитрил, а также реактивы, применявшиеся для приготовления буферных растворов, имели квалификацию «химически чистый» или «чистый для анализа» и были получены от «Химмед» (Россия). Суспензия стабилизированных олеиновой кислотой гидрофобных МНЧ в хлороформе (18,5 мг/мл) была предоставлена Е.Л. Колчиным (лаборатория нанобиотехнологий

МФТИ, Россия). В работе использовали деионизованную воду, полученную на установке обратного осмоса УВОИ 1812С6 («НПК Медиана-Фильтр», Россия).

Метод изготовления МЧ. Для приготовления МЧ по методу множественной дисперсии «твердое в масле в воде» (Т/М/В) лиофильно высушивали 30 мкл раствора для инфузий «Радахлорин». Затем лиофилизат диспергировали в растворе 2,5 % СМГК и 0,1 % лецитина в хлористом метиле. Полученную первичную дисперсию «твердое в масле» эмульгировали по каплям в 20 мл водного раствора 1 % поливинилового спирта и 0,5 % метилцеллюлозы при температуре 4 °С с использованием Ultra Turrax 25 (IKA, Германия). Готовую вторичную эмульсию Т/М/В смешивали с охлажденными до 4 °С 500 мл воды и выдерживали в течение 6 ч при комнатной температуре с перемешиванием при 300 мин⁻¹ верхнеприводной мешалкой Eurostar 20 digital (IKA, Германия) с пропеллерным перемешивающим элементом до удаления дихлорметана и затвердевания МЧ. Созревшие МЧ осаждали центрифугированием при 2000 g. Супернатант сливали, а осадок промывали ресуспендированием в 50 мл воды с последующим осаждением в указанных выше условиях. Отмытые МЧ замораживали при –25 °С и высушивали в течение 15 ч в лиофильной сушилке VaCo 2 (ZIRBUS, Германия).

При включении в МЧ стабилизированных олеиновой кислотой МНЧ и ПФД на стадии получения первичной дисперсии «твердое в масле» в раствор СМГК и лецитина в хлористом метиле добавляли 55 мкл суспензии МНЧ и 20 мкл ПФД перед диспергированием лиофилизата РХ.

Растровая электронная микроскопия (РЭМ). Изображения получены с использованием микроскопа MAIA3 (TESCAN, Чехия). Образцы частиц для электронной микроскопии наносили на кремниевые подложки в виде суспензии в воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Изображения получали при ускоряющем напряжении 10 кВ.

Измерение размеров и дзета-потенциала МЧ. Размеры и дзета-потенциал МЧ измеряли в водной суспензии на анализаторе размеров частиц и дзета-потенциала Photocor Compact-Z («Фотокор», Россия).

Определение содержания РХ в МЧ. Для определения содержания РХ навеску МЧ растворяли в ацетонитриле и измеряли оптическую плотность при длине волны 662 нм относительно ацетонитрила. Для калибровки использовали растворы РХ в ацетонитриле, получаемые разведением раствора для инфузий «Радахлорин». Содержание воды в калибровочных растворах было менее 0,05 % по объему. Измерения оптической плотности и снятие оптических спектров поглощения образцов проводили на спектрофотометре UV 3600 (Shimadzu, Япония).

Высвобождение РХ из МЧ. Высвобождение РХ из МЧ исследовали в 50 мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,4. В 5 мл буфера в центрифужной пробирке суспендировали 8–10 мг МЧ, разливали по 0,4 мл в пробирки Ерпендорф 1,5 мл и инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Перед отбором проб для определения высвободившегося РХ суспензию перемешивали до однородности встряхиванием, а затем осаждали МЧ центрифугированием при 10 000 g 10 мин. На каждый срок отбирали по 0,3 мл супернатанта. Отобранные пробы супернатанта хранили в замороженном состоянии при –20 °С. По завершении эксперимента все отобранные пробы размораживали с последующим определением концентрации РХ по его флуоресценции с использованием планшетного считывателя CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия) в 96-луночных планшетах. Флуоресценция возбуждалась на длине волны 401 нм, регистрировалась на длине волны от 660 нм. Для калибровки использовали растворы РХ в 50 мМ калий-фосфатном буфере, получаемые разведением раствора для инфузий «Радахлорин». Высвобождение РХ из МЧ сравнивали с его разрушением при инкубации в тех же условиях.

Генерация синглетного кислорода МЧ. Способность РХ в составе МЧ к образованию синглетного кислорода оценивали при облучении светом светоизлучающего диода (СИД) LZ1 00R202 (OSRAM SYLVANIA LED Engin, США) с максимумом излучения 660 нм. 0,5 мг/мл МЧ в 50 мМ калий-фосфатном буфере с pH 7,4 помещали в стандартную кювету спектрофотометра при температуре 25 °С. К полученной суспензии добавляли 20 мкл 1 мМ раствора ДФБФ в этаноле, и кювету в заданное время облучали сверху светом СИД. До и после облучения измеряли оптическую плотность при 415 нм в полосе поглощения ДФБФ, превращающегося при взаимодействии с синглетным кислородом в эндоперекись, не поглощающую при этой длине волны. Убыль оптической плотности использовали в качестве характеристики интенсивности образования синглетного кислорода. Образование синглетного кислорода МЧ, содержащими РХ, сравнивали с образованием синглетного кислорода в растворе РХ с концентрацией 8,75 мкг/мл.

Исследование фотодинамического эффекта МЧ в культуре клеток. Клеточные культуры СНО (клетки яичников сирийского хомячка) были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). При изучении влияния МЧ на клетки использовали 6-луночные планшеты. Высеивали по 10^5 клеток в лунку в 2 мл среды DMEM 12, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамина. Клетки культивировали в темноте при

температуре 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % содержанием CO₂. После 24 ч культивирования и формирования монослоя в одной трети лунок 1-го планшета культуральную среду заменяли на свежую, в другой трети лунок — на раствор 1,75 мкг/мл РХ в культуральной среде, и в остальных лунках — на суспензию 0,5 мг/мл различных видов МЧ в культуральной среде. Через 24 ч во всех лунках культуральную среду заменяли свежей и половину лунок каждого вида облучали 10 мин светом СИД LZ1 00R202 с облученностью на поверхности культуральной среды 100 мВт/см². Влияние МЧ и фотодинамического облучения на клетки оценивали через 24 ч. Микрофотографирование клеток осуществляли на световом микроскопе Axio Observer.A1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованном осветителями HAL 100, HBO 100 и цифровой монохромной камерой AxioCam 503 mono, работающей под управлением программного обеспечения ZEN 2. При микроскопии устанавливали блок светофильтров 45 HQ TexasRed (EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75).

Оценка жизнеспособности клеток. Для оценки жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста во всех лунках культуральную среду заменяли на свежую, содержащую 0,5 мг/мл МТТ, и инкубировали 0,5 ч в темноте при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % CO₂. После этого среду удаляли и содержимое лунок растворяли в 1 мл диметилсульфоксида. Количество образовавшегося формазана характеризовали оптической плотностью полученных растворов в лунках при 550 нм, измеренной с использованием планшетного считывателя CLARIOstar. Жизнеспособность клеток после воздействия МЧ и фотодинамического облучения характеризовали отношением оптических плотностей в лунках с клетками, подвергшимися воздействию, и в лунках с контрольными клетками без каких-либо воздействий (100 % жизнеспособность).

Статистическая обработка. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel. Приводимые экспериментальные данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение по результатам как минимум 3 независимых измерений. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Полученные МЧ характеризуются субмикронным размером. Отрицательный заряд частиц обуславливает наличие концевых карбоксильных групп у используемой для получения МЧ СМГК. Полученная величина дзета-потенциала находится на уровне значений, известных из литературы для немодифицированных частиц, что указывает на отсутствие заметного

влияния РХ в составе МЧ на их заряд. На изображениях РЭМ видно, что полученные МЧ без МНЧ вне зависимости от присутствия ПФД – сферической формы (рис. 1). При наличии МНЧ в полимерной матрице МЧ имеют неправильную форму с выраженными складками. Данные изменения формы могут быть связаны с образованием 2 фаз – на поверхности МЧ и в ее ядре в начале созревания МЧ. Отсутствие растворимости СМГК в углеводородах [20] предполагает низкое сродство этого полимера к олеиновой кислоте, покрывающей МНЧ, что является предпосылкой для образования внутри созревающей МЧ гидрофобной фазы, обогащенной МНЧ, но с низким содержанием СМГК. Эта фаза более гидрофобна, чем окружающий ее раствор с более высоким содержанием СМГК в хлористом метилена. Диффузия и испарение хлористого метилена из системы приводят в начале созревания МЧ к концентрированию этого раствора с формированием достаточно плотной оболочки, которая по мере диффузии через нее растворителя и уменьшения объема внутренней фазы сморщивается и формирует видимые на изображениях РЭМ складки. Сходным образом происходит образование складок на поверхности частиц, получаемых из полимеров распылительной сушкой с высокой скоростью [21].

Включение РХ в МЧ составило около 10 % от расчетного в образцах без МНЧ (см. таблицу). Наличие МНЧ в МЧ приводит к существенному увеличению включения РХ – до 60–70 %. Необходимо отметить, что добавление лецитина в значительной степени способствует включению РХ в полимерную матрицу МЧ: по результатам предварительных экспериментов при его отсутствии включение РХ в МЧ без МНЧ не превышает 1 %.

На спектрах поглощения образцов, полученных при растворении МЧ в ацетонитриле, присутствуют характерные для РХ пики (рис. 2): длинноволновый в районе 662 нм и коротковолновый в районе 402 нм. Это указывает на то, что РХ, инкапсулированный в МЧ, сохраняет исходные оптические свойства, важные для ФДТ.

Выявляемое достоверно ($p < 0,05$) более высокое образование синглетного кислорода МЧ с РХ по сравнению с МЧ без РХ при облучении водной суспензии МЧ красным СИД указывает на возможность использования таких частиц для ФДТ (рис. 3). Присутствие в полимерной матрице ПФД и МНЧ значительно увеличивает генерацию синглетного кислорода. В МЧ с ПФД это может быть связано с повышенным общим содержанием кислорода в дисперсии из-за его большей растворимости в перфторуглеродах. Интенсификация образования синглетного кислорода в МЧ с МНЧ может быть объяснена выявленным в данном случае увеличением включения РХ в МЧ.

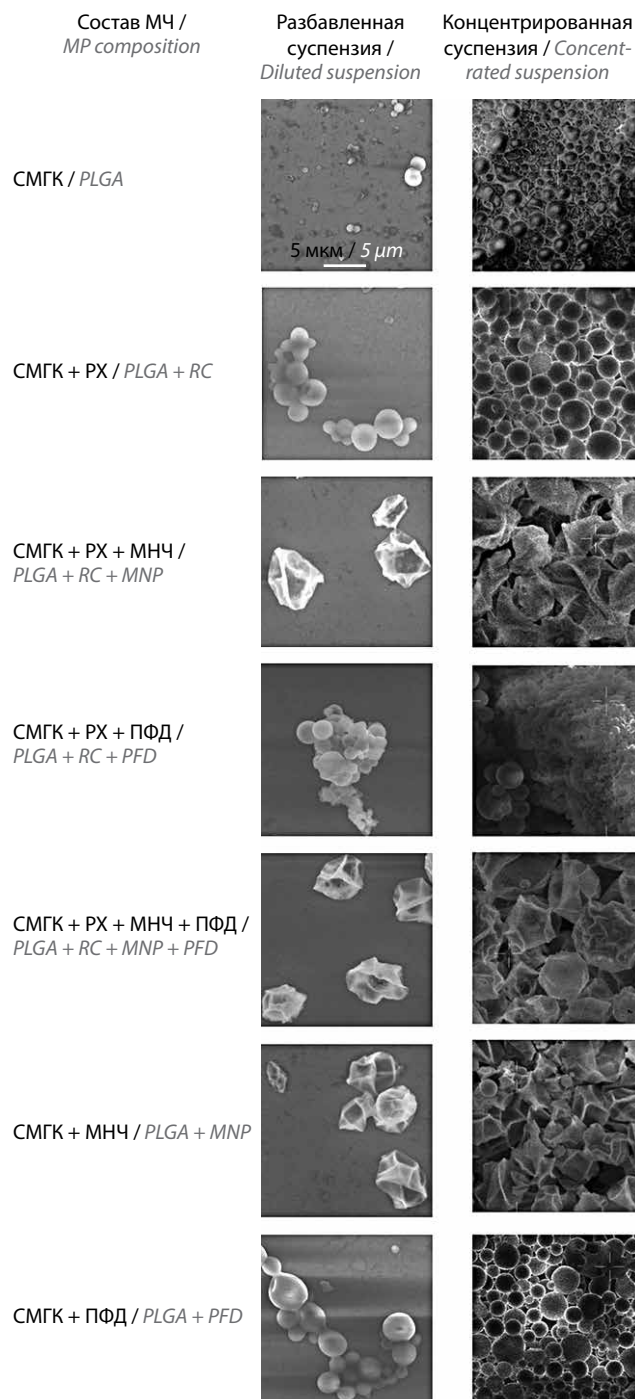


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия микрочастиц разного состава. Масштабная метка – общая для всех изображений. Здесь, а также на рис. 2–6 и в таблице: МЧ – микрочастицы, СМГК – сополимер молочной и гликолевой кислот, РХ – радацилорин, МНЧ – магнитные наночастицы, ПФД – перфтордекалин

Fig. 1. Scanning electron microscopy of microparticles with different composition. Scale mark is common to all images. Here, on figures 2–6 and in table: MP – microparticles, PLGA – Poly(lactide-co-glycolide acid), RC – radachlorin, MNP – magnetic nanoparticles, PFD – perfluorodecalin

Согласно полученным данным (рис. 4), в водной дисперсии МЧ в течение 1-го часа достигается

Характеристики МЧ

Characteristics of MP

Состав МЧ MP composition	Гидродинамический радиус МЧ ($\bar{R} \pm \sigma_R$), мкм Hydrodynamic radius of MP ($\bar{R} \pm \sigma_R$), μm	Коэффициент полидисперсности МЧ ($\sigma_R^2/\bar{R}^2$)* Polydispersity factor of MP ($\sigma_R^2/\bar{R}^2$)*	Дзета-потенциал МЧ, мВ Zeta potential of MP, mV	Содержание РХ в МЧ, мкг/мг RC content in MP, $\mu\text{g}/\text{mg}$	Включение РХ в МЧ**, % Inclusion of RC in MP**, %
СМГК PLGA	$0,270 \pm 0,143$	0,280	$-16,6 \pm 2,0$	—	—
СМКГ + РХ PLGA + RC	$0,112 \pm 0,018$	0,027	$-19,5 \pm 4,5$	$0,27 \pm 0,11$	$6,6 \pm 2,7$
СМКГ + РХ + МНЧ PLGA + RC + MNP	$0,240 \pm 0,045$	0,035	$-23,6 \pm 6,8$	$2,34 \pm 0,78$	$60,6 \pm 20,1$
СМКГ + РХ + ПФД PLGA + RC + PFD	$0,138 \pm 0,054$	0,150	$-18,7 \pm 0,4$	$0,27 \pm 0,20$	$16,9 \pm 12,3$
СМКГ + РХ + МНЧ + ПФД PLGA + RC + PFD + MNP	$0,318 \pm 0,150$	0,224	$-19,6 \pm 1,8$	$1,16 \pm 0,59$	$72,3 \pm 36,8$
СМКГ + МНЧ PLGA + MNP	$0,315 \pm 0,092$	0,086	$-17,6 \pm 2,0$	—	—
СМКГ + ПФД PLGA + PFD	$0,378 \pm 0,129$	0,116	$-16,0 \pm 1,1$	—	—

*Рассчитан по приведенным результатам измерения размеров частиц; **доля от теоретического содержания РХ в МЧ при условии его полного включения.

*Calculated according to the given results of measuring the particle sizes; **fraction of the theoretical content of RC in the MP, subject to its full inclusion.

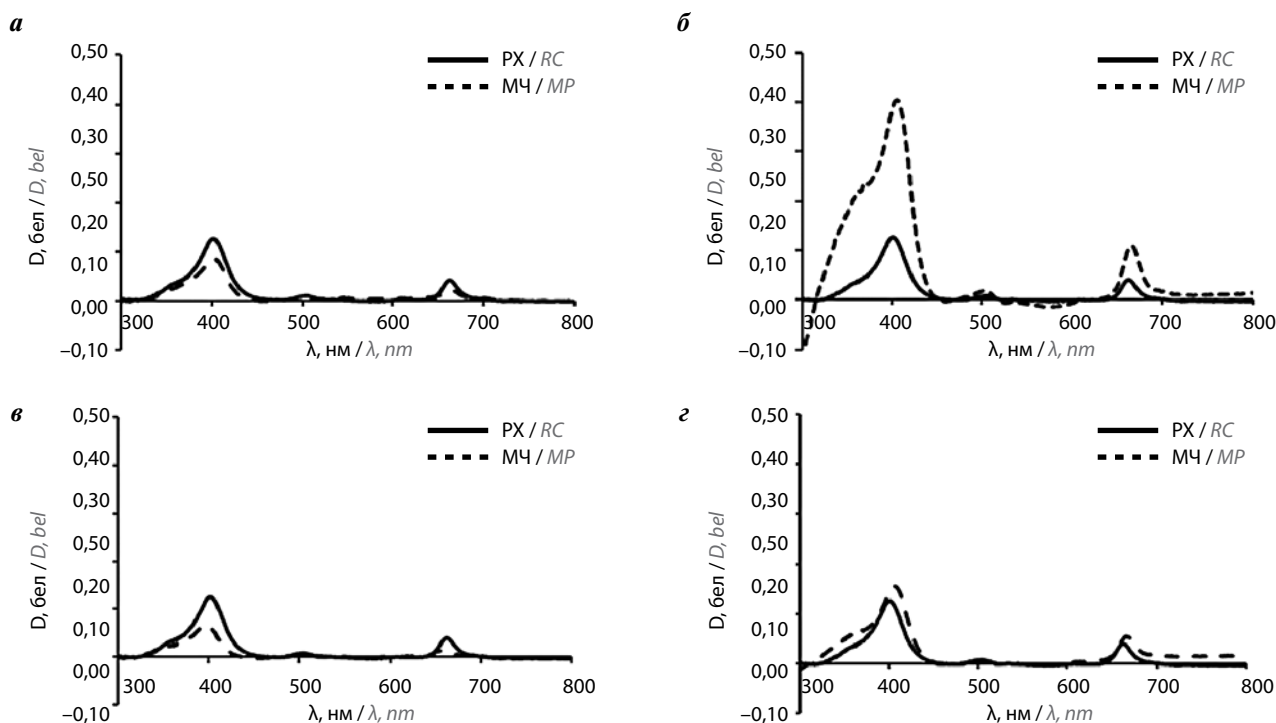


Рис. 2. Спектры поглощения РХ (8,75 мкг/мл) и МЧ (1 мг/мл) в ацетонитриле: а – СМГК + РХ; б – СМГК + РХ + МНЧ; в – СМГК + РХ + ПФД; з – СМГК + РХ + ПФД + МНЧ

Fig. 2. Absorption spectra of RC (8.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and MP (1 mg/ml) in acetonitrile: а – PLGA + RC; б – PLGA + RC + MNP; в – PLGA + RC + PFD; з – PLGA + RC + PFD + MNP

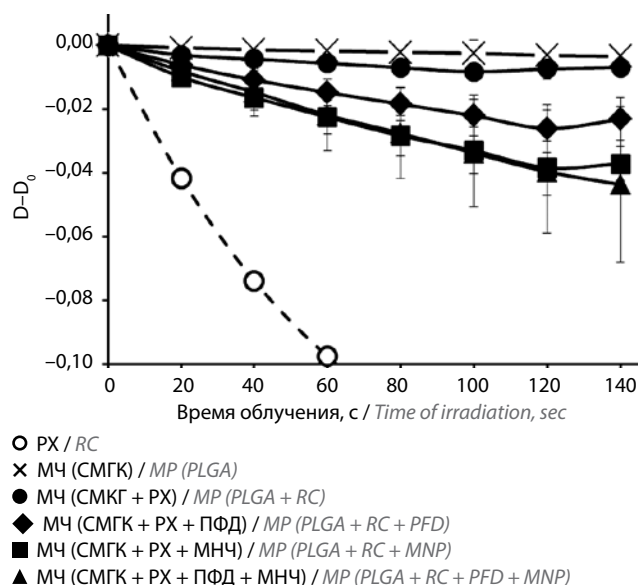


Рис. 3. Генерация синглетного кислорода

Fig. 3. Generation of singlet oxygen

близкая к максимальной концентрация РХ, которая затем медленно снижается в течение периода до 1 мес. В растворе РХ без частиц с исходной концентрацией РХ, практически равной максимальной концентрации высвободившегося из МЧ РХ, его содержание убывает существенно быстрее и уже через сутки оказывается достоверно ниже, чем в суспензии МЧ. При этом в суспензии МЧ без МНЧ концентрация РХ убывает лишь до половины от максимальной только через 2 нед, а в случае присутствия в полимерной матрице МНЧ концентрация РХ остается практически неизменной в течение 30 дней. Описанная кинетика высвобождения характеризует МЧ как депо с пролонгированным высвобождением РХ, пригодное для проведения нескольких последовательных сеансов ФДТ без повторных инъекций ФС.

Согласно результатам проведенных исследований с использованием световой микроскопии, МЧ с РХ поглощаются клетками и накапливаются в цитоплазме, не вызывая при этом существенных изменений в плотности монослоя (рис. 5). Хорошо различимая флуоресценция МЧ на изображениях флуоресцентной микроскопии указывает на возможность использования таких частиц в качестве агентов для диагностики посредством визуализации поглотивших их клеток.

В результате МТТ-теста выявлено, что поглощение МЧ, содержащих РХ, клетками СНО в культуре сопровождается снижением их жизнеспособности различной степени в зависимости от состава МЧ (рис. 6). Наблюдаемое угнетение метаболизма может быть связано как с цитотоксическим действием высвобождающегося внутри клеток РХ, так и с нарушением их структуры поглощенными МЧ. Наиболее значи-

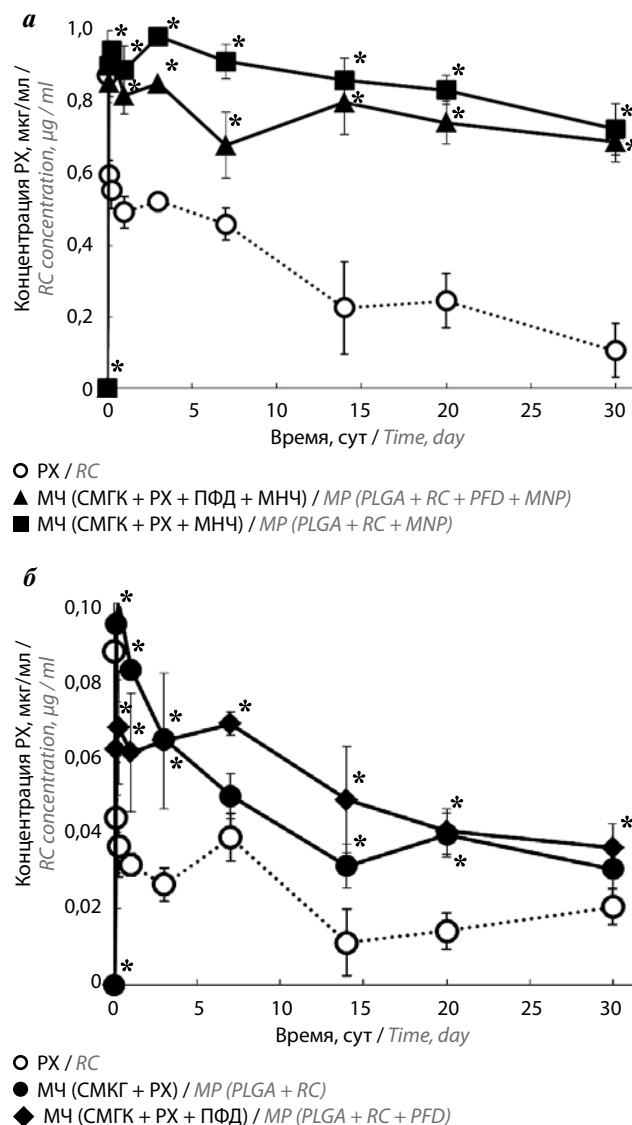
Рис. 4. Высвобождение РХ из МЧ: а — РХ (0,875 мкг/мл), МЧ (СМГК + РХ + ПФД + МНЧ), МЧ (СМГК + РХ + МНЧ); б — РХ (0,0875 мкг/мл), МЧ (СМГК + РХ), МЧ (СМГК + РХ + ПФД), * $p < 0,05$ для отличий от пробы только с РХ

Fig. 4. RC release from MP: а — RC (0.875 µg/ml), MP (PLGA + RC + PFD + MNP), MP (PLGA + RC + MNP); б — RC (0.0875 µg/ml), MP (PLGA + RC), MP (PLGA + RC + PFD); * $p < 0.05$ for the differences from samples with RC alone

тельное угнетение жизнедеятельности клеток заметно для МЧ, содержащих в полимерной матрице РХ и МНЧ. Однако это, по-видимому, не связано с описанными особенностями поверхности таких частиц, поскольку в отсутствие РХ не наблюдается угнетающего действия на клетки МЧ, содержащих МНЧ. Кроме того, согласно полученным данным, наличие МНЧ не способствует фотодинамическому действию на клетки РХ в составе МЧ. В то же время свободный РХ и МЧ, содержащие только РХ, обладают заметным фотодинамическим повреждающим действием. Наличие ПФД в составе МЧ не сопровождается заметным

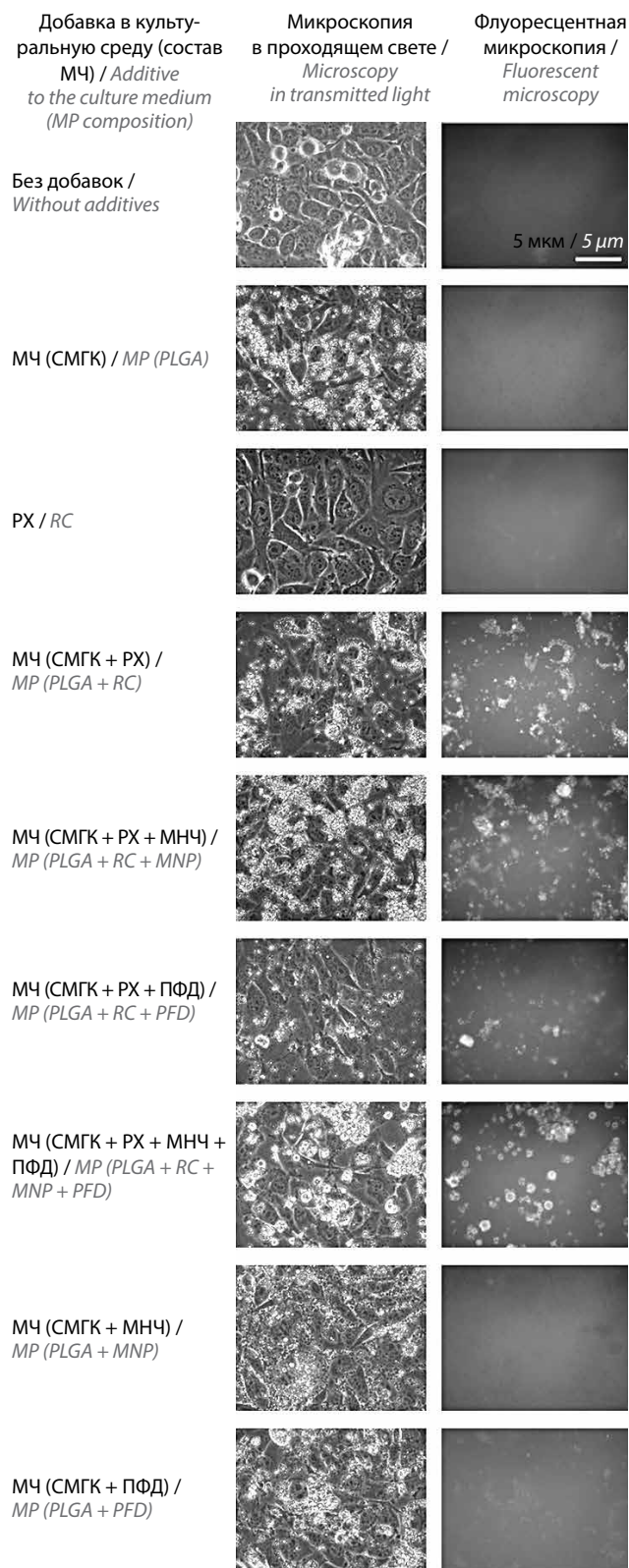


Рис. 5. Световая микроскопия монослая клеток СНО (клетки яичников сирийского хомячка) через 1 сут после инкубации с МЧ разного состава. Масштабная метка — общая для всех изображений

Fig. 5. Light and fluorescence microscopy of a monolayer of CHO cells (Syrian hamster ovary cells) 1 day after incubation with MPs of different composition. Scale mark is common to all images

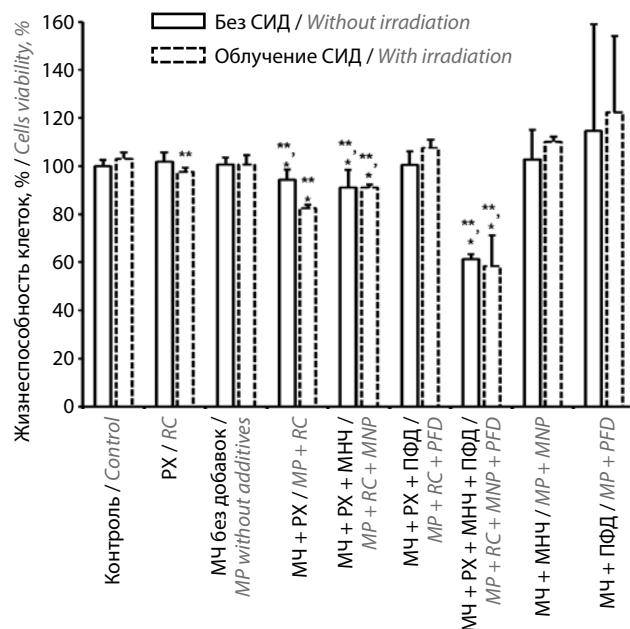


Рис. 6. Влияние PX и содержащих PX МЧ на жизнеспособность клеток и фотодинамическое действие на эти клетки облучения светом излучающим диодом (СИД) по результатам МТТ-теста; * $p < 0,05$ для отличий от контроля без облучения СИД и воздействия МЧ и PX; ** $p < 0,05$ для отличий между облученными СИД клетками по отношению к клеткам без облучения СИД после инкубации с определенным видом МЧ или PX

Fig. 6. Influence of RC and RC-containing MPs on cell viability and photodynamic effect of light irradiation on these cells according to the MTT test results; * $p < 0.05$ for differences from the line cells without any additives and irradiation; ** $p < 0.05$ for differences between irradiated cells in relation to cells without irradiation after incubation with certain type of MP or RC

влиянием на особенности реакции поглотивших МЧ клеток и на фотодинамический эффект. Можно лишь отметить более сильное повреждающее действие МЧ, в которых одновременно присутствуют PX, МНЧ и ПФД.

Закключение

Применение технологии Т/М/В позволяет получить содержащие PX МЧ, пригодные для использования в качестве депо, которое в течение 30 дней может поддерживать в своем микроокружении концентрации ФС, способные вызывать цитотоксический фотодинамический эффект. При введении полученных МЧ в опухоль их поглощение клетками будет способствовать повышению эффективности ФДТ за счет внутриклеточного высвобождения действующего вещества.

Поскольку МЧ имеют размер меньше 1 мкм и отрицательный заряд, то их поглощение клетками должно протекать в основном по типу фагоцитоза. При внутрисосудистом введении накопление полученных МЧ, вероятнее всего, будет происходить главным образом в печени, селезенке, легких и других

органах с высоким содержанием клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Выход полученных МЧ из кровеносного русла в других местах будет невысоким. Однако присутствие в полимерной матрице таких МЧ МНЧ позволит накапливать полученные МЧ в интересующих местах кровеносного русла за счет воздействия на них внешнего магнитного поля. Присутствие МНЧ в полимерной матрице МЧ значительно увеличивает включение в них РХ, а также продолжительность его постепенного выхода в среду по отношению к простым МЧ с РХ, что позволяет рассматривать такие частицы в качестве фотодинамического средства пролонгированного действия.

В целом полученные результаты показывают, что на основе биodeградируемого СМГК могут быть

получены биосовместимые МЧ с включением РХ, обладающие способностью к его пролонгированному высвобождению. Воздействие на такие частицы светового излучения, применяемого при ФДТ с использованием РХ, сопровождается образованием синглетного кислорода, обладающего цитотоксическим эффектом для опухолевых клеток. Присутствие в полимерной матрице МЧ МНЧ и ПФД увеличивает процент включения РХ и интенсифицирует образование синглетного кислорода. Длительное высвобождение инкапсулированного РХ из таких частиц и их возможное накопление в проблемных областях с помощью воздействия внешних факторов позволяет увеличить терапевтическое окно при использовании ФС.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Falzone L., Salomone S., Libra M. Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium. *Front Pharmacol* 2018;9:1300. DOI: 10.3389/fphar.2018.01300.
- Гамаюнов С.В., Шахова Н.М., Денисенко А.Н. и др. Фотодинамическая терапия — преимущества новой методики и особенности организации службы. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2014;2:101–4. [Gamayunov S.V., Shakhova N.M., Denisenko A.N. et al. Photodynamic therapy: the benefits of the new technique and service organization details. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal* 2014;2:101–4. (In Russ.)].
- Филоненко Е.В., Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике. *Biomedical Photonics* 2016;5(2):26–37. [Filonenko E.V., Serova L.G. Photodynamic therapy in clinical practice. *Biomedical Photonics* 2016;5(2):26–37 (In Russ.)].
- Ozog D.M., Rkein A.M., Fabi S.G. et al. Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. *Dermatol Surg* 2016;42(7):804–27. DOI: 10.1097/DSS.0000000000000800.
- Yanovsky R.L., Bartenstein D.W., Rogers G.S. et al. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2019;35(5):295–303. DOI: 10.1111/phpp.12489.
- Bergh H., Vogel A. Therapeutic Laser Applications and Laser-Tissue Interactions II. *Proceedings of the SPIE* 2005;5863:186–97.
- Vargas F., Díaz Y., Yartsev V. et al. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media. *Ciencia* 2004;12(1):70–7.
- Douillard S., Lhommeau I., Olivier D., Patrice T. *In vitro* evaluation of Radachlorin sensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2010;98(2):128–37. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2009.11.011.
- Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009;6(2):94–6. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2009.06.001.
- Shiryaev A.A., Musaev G.K., Levkin V.V. et al. Combined treatment of nonresectable cholangiocarcinoma complicated by obstructive jaundice. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2019;26:218–23. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2019.04.006.
- Nair P.R. Delivering Combination Chemotherapies and Targeting Oncogenic Pathways via Polymeric Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)* 2019;11(4):630. DOI: 10.3390/polym11040630.
- Pan J., Rostamizadeh K., Filipczak N., Torchilin V.P. Polymeric Co-Delivery Systems in Cancer Treatment: An Overview on Component Drugs' Dosage Ratio Effect. *Molecules* 2019;24(6):1035. DOI: 10.3390/molecules24061035.
- Zhou L., Wang H., Li Y. Stimuli-Responsive Nanomedicines for Overcoming Cancer Multidrug Resistance. *Theranostics* 2018;8(4):1059–74. DOI: 10.7150/thno.22679.
- Li T., Yan L. Functional Polymer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* 2018;11(4):133. DOI: 10.3390/ph11040133.
- Wang J.W., Xu J.H., Li J. et al. Improvement of the Antitumor Efficacy of Intratumoral Administration of Cucurbitacin Poly(Lactic-co-Glycolic Acid) Microspheres Incorporated in *In Situ*-Forming Sucrose Acetate Isobutyrate Depots. *J Pharm Sci* 2016;105(1):205–11. DOI: 10.1002/jps.24695.
- Mariana B.O., João F.M. Polymer-Based Microparticles in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Biotechnol Prog* 2011;27(4):897–912. DOI: 10.1002/btpr.618.
- Никифоров В.Н. Биомедицинские применения магнитных наночастиц. *Наука и технологии в промышленности* 2011;1:90–9. [Nikiforov V.N. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. *Nauka i tekhnologii v promyshlennosti* 2011;1:90–9. (In Russ.)].
- Wang Zh., Zhang F., Shao D. et al. Janus Nanobullets Combine Photodynamic Therapy and Magnetic Hyperthermia to Potentiate Synergetic Anti-Metastatic Immunotherapy. *Adv Sci* 2019;6(22):1901690. DOI: 10.1002/adv.201901690.
- Próspero A.G., Quini C.C., Bakuzis A.F. et al. Real-time *in vivo* monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *J Nanobiotechnology* 2017;15(1):22. DOI: 10.1186/s12951-017-0257-6.
- Thomasin C., Hô N.T., Merkle H.P., Gander B. Drug microencapsulation by PLA/PLGA coacervation in the light of thermodynamics. I. Overview and theoretical considerations. *J Pharm Sci* 1998;87(3):259–68. DOI: 10.1021/js970047r.
- Jablczyńska K., Janczewska M., Kulikowska A., Sosnowski T.R. Preparation and characterization of biocompatible polymer particles as potential nanocarriers for inhalation therapy. *Int J Polymer Sci* 2015;22:1–8. DOI: 10.1155/2015/763020.

Вклад авторов

А.М. Мирошкина: получение экспериментальных данных, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
С.П. Кречетов: разработка дизайна исследования, получение экспериментальных данных, анализ полученных данных;
Н.Л. Соловьева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;
И.И. Краснюк: разработка дизайна исследования.

Authors contributions

A.M. Miroshkina: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;
S.P. Krechetov: research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
N.L. Solovieva: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;
I.I. Krasnyuk: research design development.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.М. Мирошкина / A.M. Miroshkina: <https://orcid.org/0000-0001-7028-0966>
С.П. Кречетов / S.P. Krechetov: <https://orcid.org/0000-0003-2861-6010>
Н.Л. Соловьева / N.L. Solovieva: <https://orcid.org/0000-0002-0781-7553>
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 declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (договор № 02.G25.31.0001) в рамках реализации Постановления Правительства Российской Федерации от 09.04.2010 № 218.

Financing. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (contract No 02.G25.31.0001) as part of the implementation of the Decree of the Government of the Russian Federation No 218 of 09.04.2010.

Статья поступила: 26.03.2021. Принята к публикации: 20.08.2021.

Article submitted: 26.03.2021. Accepted for publication: 20.08.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65>

Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола с солюбилизаторами

С.П. Кречетов¹, М.С. Масленникова², Н.Л. Соловьева³, И.И. Краснюк³

¹ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»; Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9;

²ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; Россия, 109240 Москва, Устьинский пр-д, 2/14;

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

Контакты: Мария Сергеевна Масленникова sok.mary.serg@gmail.com

Введение. Увеличение биодоступности малорастворимых фармацевтических субстанций является одной из важных проблем фармацевтической технологии. Ресвератрол – полифенол растительного происхождения, обладающий широким спектром биологического действия. Однако на сегодняшний день отсутствуют лекарственные препараты на основе ресвератрола. Данный полифенол представлен на фармацевтическом рынке только в качестве биологически активного вещества, входящего в состав биологически активных добавок к пище.

Цель исследования – выбор оптимального солюбилизатора для увеличения растворимости ресвератрола посредством определения параметров солюбилизации.

Материалы и методы. Были изучены спектрофотометрические характеристики ресвератрола при использовании 3 групп солюбилизаторов: полоксамеров, полисорбатов и циклодекстринов. Исследования проводили в 50 мМ солянокислом буфере (pH 1,2) и 50 мМ фосфатном буфере (pH 6,8). Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре UV/VIS-3600 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн 220–380 нм. Влияние солюбилизаторов на спектрофотометрические характеристики ресвератрола изучали в буферных растворах, содержащих солюбилизатор и ресвератрол в концентрации, существенно меньшей, чем его собственная растворимость в воде. Многократный избыток использованного солюбилизатора обеспечивал нахождение всего ресвератрола в солюбилизированной форме. При определении параметров солюбилизации к заведомому избытку ресвератрола добавляли буферные растворы, содержащие от 2 до 10 мМ солюбилизаторов. Такое количество ресвератрола обеспечивало наличие его осадка во всех экспериментах для определения полноты солюбилизации исследуемого полифенола.

Результаты. Исходя из полученных спектрофотометрических характеристик растворов солюбилизаторов с ресвератролом наиболее привлекательными для дальнейшей разработки твердых лекарственных форм для перорального приема выступают полоксамер 407, полисорбат 80 и модифицированный метил-бета-циклодекстрин, обеспечивающие полное растворение исследуемого полифенола при его содержании в композиции с солюбилизатором около 10 %.

Заключение. На основании полученных данных о спектрофотометрических характеристиках ресвератрола с использованием солюбилизаторов можно утверждать, что возможно создание препаратов с улучшенной растворимостью исследуемого полифенола. На основе его композиций с полоксамером 407, полисорбатом 80 и модифицированным метил-бета-циклодекстрином при подборе соответствующих вспомогательных веществ могут быть разработаны твердые лекарственные формы для перорального приема.

Ключевые слова: ресвератрол, солюбилизация, комплекс включения, мицелла

Для цитирования: Кречетов С.П., Масленникова М.С., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И. Обоснование оптимального состава композиций ресвератрола с солюбилизаторами. Российский биотерапевтический журнал 2021; 20(3):57–65. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65.

Development of optimal composition formulation of resveratrol and solubilisers

Sergey P. Krechetov¹, Maria S. Maslennikova², Natalia L. Solovieva³, Ivan I. Krasnyuk³

¹Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University); 9 Institutskiy per., Dolgoprudnyi 141701, Russia;

²Scientific Research Institute of Nutrition, Biotechnology and Food Safety; 2/14 Ust'inskiy proezd, Moscow 109240, Russia;

³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Contacts: Maria Sergeevna Maslennikova sok.mary.serg@gmail.com

Introduction. Increasing of poorly soluble pharmaceutical substances bioavailability is one of important problems of pharmaceutical technology. Resveratrol is a plant origin polyphenol with a broad spectrum of biological effects. However, due to poor solubility and, as a result, low bioavailability, it is not promising for the development of oral drugs. Thus, today resveratrol is presented only as a biologically active substance that is component of biologically active food supplements.

The objective of the research is selection of the optimal solubilizer to increase the solubility of resveratrol by determining the solubilization parameters.

Materials and methods. The spectrophotometric characteristics of resveratrol were studied using three groups of solubilizers: poloxamers, polysorbates and cyclodextrins. Studies were carried out in 50 mM hydrochloric acid buffer (pH 1.2) and 50 mM phosphate buffer (pH 6.8). Spectrophotometric measurements were carried out on a spectrophotometer UV/VIS-3600 Shimadzu (Japan) in the wavelength range of 220–380 nm. The effect of solubilizers on the spectrophotometric characteristics of resveratrol was determined in buffer solutions containing the solubilizer and resveratrol in significantly less concentration of its own solubility in water. The used multiple excess of the solubilizer ensured the finding of all resveratrol in a solubilized form. During the determining parameters of solubilization, buffer solutions containing from 2 to 10 mM solubilizers were added to the obviously excess of resveratrol. The indicated amount of resveratrol ensured the presence of its precipitate in all experiments to determine the completeness of solubilization of the studied polyphenol.

Results. Based on the obtained spectrophotometric characteristics of solubilizers solutions with resveratrol, the most effective for the further development of solid dosage forms for oral administration are poloxamer 407, polysorbate 80 and modified methyl-beta-cyclodextrin, which ensure complete dissolution of resveratrol when its content in the composition with a solubilizer is about 10 %.

Conclusion. Based on the data obtained on the spectrophotometric characteristics of resveratrol using solubilizers, it can be argued that it is possible to create drugs with improved solubility of the studied polyphenol. On the basis of its compositions with poloxamer 407, polysorbate 80 and modified methyl-beta-cyclodextrin, with the selection of appropriate excipients, solid dosage forms for oral intake can be developed.

Key words: resveratrol, solubilization, inclusion complex, micelle

For citation: Krechetov S.P., Maslennikova M.S., Solovieva N.L., Krasnyuk I.I. Development of optimal composition formulation of resveratrol and solubilisers. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):57–65. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-57-65.

Введение

Ресвератрол (3,5,4'-тригидроксистерильбен) — фитоалексин, который оказывает гиполипидемическое, противоопухолевое, противовоспалительное, антиоксидантное действие и рассматривается как перспективное действующее вещество для создания лекарственных препаратов [1]. Из существующих цис- и транс-изомеров исследуемого биологически активного вещества транс-изомер обладает большей биологической активностью [2]. Однако ресвератрол малорастворим в воде, в связи с чем его биодоступность при пероральном применении ограничена [3]. Поэтому на сегодняшний день на фармацевтическом рынке отсутствуют лекарственные препараты с ресвератролом, он представлен только в составе биологически активных добавок к пище.

Эффективным способом повышения биодоступности плохо растворимых фармацевтических субстанций является использование солюбилизаторов в составе лекарственных препаратов [4]. Известны

работы, в которых демонстрируется повышение пероральной биодоступности ресвератрола в присутствии солюбилизаторов [5–7], а также более высокая биологическая активность его композиций с солюбилизаторами по сравнению с чистым ресвератролом в экспериментах по исследованию антиоксидантной и противоопухолевой активности этого вещества *in vitro* [8, 9] и *in vivo* [10, 11]. Однако указанные исследования не содержат сведений о полноте солюбилизации данного полифенола при растворении используемых композиций. Такая информация необходима для выбора оптимального соотношения ресвератрол—солюбилизатор при разработке лекарственного препарата.

Цель — исследовать параметры солюбилизации ресвератрола с поллоксамерами и полисорбатами, являющимися неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ), и циклодекстринами (ЦД), способными к образованию комплексов включения, для дальнейшего выбора наиболее эффективного для растворения солюбилизатора.

Материалы и методы

В работе использовали транс-ресвератрол (RSV) resVida® (DSM Nutritional, Швейцария), содержащий не менее 99 % действующего вещества и соответствующий требованиям к фармацевтическим субстанциям, используемым в лекарственных препаратах. В качестве солюбилизаторов использовали полоксамеры Kolliphor 188 (P188) и 407 (P407) от BASF (Германия); полисорбаты Tween 20 (T20), 40 (T40) и 80 (T80) от Sigma-Aldrich (США); ЦД: альфа-ЦД (α -CD), бета-ЦД (β -CD), гамма-ЦД (γ -CD), гидроксипропил-альфа-ЦД (HP- α -CD) от Ashland Industries Europe GmbH (Швейцария), гидроксипропил-гамма-ЦД (HP- γ -CD), метил-бета-ЦД (M- β -CD) от Wacker Chemie AG (Германия), сукцинил-альфа-ЦД (S- α -CD) от Sigma-Aldrich (США). Реактивы, применявшиеся для приготовления буферных растворов, имели квалификацию «химически чистый» и были получены от «Кемикал Лайн» (Россия). В работе использовали 50 мМ солянокислый буфер с pH 1,2 и 50 мМ фосфатный буфер с pH 6,8. Для приготовления растворов использовали воду, очищенную по ФС.2.2.0020.15, полученную на установке обратного осмоса УВОИ-1812С6 («НПК Медиана-Фильтр», Россия).

Влияние солюбилизаторов на спектрофотометрические характеристики RSV изучали в буферных растворах, содержащих 1 мМ солюбилизатора и исследуемого полифенола в концентрации 0,025 мМ – существенно меньшей, чем его собственная растворимость в воде [3]. Многократный избыток использованного солюбилизатора обеспечивал нахождение всего RSV в солюбилизированной форме. Снятие спектров поглощения производили после инкубации приготовленных растворов в течение 1 ч при температуре 24 °С в темноте. Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре UV/VIS-3600 (Shimadzu, Япония) в диапазоне длин волн от 220 до 380 нм, при спектральной ширине щели 2 нм и температуре 24 °С.

При определении параметров солюбилизации к 10 мг RSV, находящегося в круглодонных герметично закрывающихся стеклянных пробирках объемом 5 мл, добавляли по 1,5 мл буферных растворов, содержащих от 2 до 10 мМ солюбилизаторов. Указанное количество RSV обеспечивало наличие его осадка во всех экспериментах. Образцы инкубировали в темноте при температуре 37 °С и встряхивании с частотой 180 об/мин на встряхивателе KS 3000 i control (IKA, Германия) в течение 24 ч. После инкубации стеклянные пробирки помещали в прогретые до температуры 37 °С центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 5 мин при 200 g на центрифуге LMC-3000 (Biosan, Латвия). По окончании центрифугирования из пробирок отбирали супернатант, разводили его фосфатным и солянокислым буферами до оптической плотности менее 4 Б в максимуме

поглощения RSV и проводили спектрофотометрические измерения с использованием в качестве образцов сравнения растворов солюбилизаторов, разведенных буфером до концентрации, как в образце с исследуемым полифенолом.

Статистическую обработку экспериментальных данных выполняли с использованием программы Microsoft Excel. Приводимые экспериментальные данные представляют собой среднее по результатам 3 независимых измерений или представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего.

Результаты

Оптимальный состав композиции с солюбилизатором определяется молярным коэффициентом солюбилизации (K_{mc}):

$$K_{mc} = \frac{[L]_c}{C_c} \quad (1),$$

где $[L]_c$ – молярная концентрация RSV в солюбилизированной форме при молярной концентрации солюбилизатора C_c и насыщенной концентрации свободного RSV (его собственная растворимость) в водной фазе. При таком соотношении будет иметь место полная солюбилизация RSV, тогда как при его превышении часть RSV может оставаться в осадке, а при значениях меньше этой величины будет использована не вся возможность солюбилизатора, включаемого в рецептуру.

Кажущаяся концентрация RSV в присутствии солюбилизатора равна сумме концентраций свободной $[L]$ и солюбилизированной $[L]_c$ частей RSV в растворе. Принцип аддитивности поглощения света и закон Бугера–Ламберта–Бера позволяют записать выражения для оптической плотности раствора RSV в присутствии солюбилизатора:

$$D = D_L + D_{L_c} = \varepsilon_L \times [L] \times l + \varepsilon_{L_c} \times [L]_c \times l \quad (2),$$

где D_L и D_{L_c} – вклад в оптическую плотность раствора свободного RSV и RSV в составе солюбилизатора, ε_L и ε_{L_c} – молярные коэффициенты поглощения свободного RSV и RSV в составе солюбилизатора, l – длина оптического пути в кювете спектрофотометра. В случае избытка RSV и его неполного растворения имеет место равенство концентрации RSV в свободной форме его собственной растворимости ($[L] = [L]_0$) вследствие равновесия с твердой (нерастворенной) фазой. С учетом этого уравнение (2) переписывается:

$$\frac{D}{\varepsilon_L \times l} = [L]_0 + \frac{\varepsilon_{L_c}}{\varepsilon_L} \times [L]_c \quad (3),$$

$$\text{откуда с учетом (1)} \quad \frac{D}{\varepsilon_L \times l} = [L]_0 + \frac{\varepsilon_{L_c}}{\varepsilon_L} \times K_{mc} \times C_c \quad (4).$$

При солюбилизации за счет образования комплексов включения LS (S — молекула комплексообразователя, например ЦД) концентрация RSV в солюбилизированной форме равна концентрации комплексов включения и рассчитывается по формуле [12]:

$$[L]_c = [LS] = \frac{K_k \times [L]_0}{1 + K_k \times [L]_0} \times C_c \quad (5),$$

где K_k — константа комплексообразования. Исходя из (1) и (5), при солюбилизации с образованием комплексов включения

$$K_{mc} = \frac{K_k \times [L]_0}{1 + K_k \times [L]_0} \quad (6).$$

При использовании в качестве солюбилизатора мицеллообразующего вещества концентрация RSV определяется коэффициентом ее распределения между мицеллярной и водной фазами и вычисляется по формуле [13]:

$$[L]_c = K_m \times [L]_0 \times (C_c - [S]_{ккм}) \quad (7),$$

где K_m — коэффициент распределения RSV между мицеллярной и водной фазами, $[S]_{ккм}$ — критическая концентрация мицеллообразования солюбилизатора, а $(C_c - [S]_{ккм})$ — концентрация мицеллярной фазы. Исходя из (1) и (7), при мицеллярной солюбилизации

$$K_{mc} = K_m \times [L]_0 \times \left(1 - \frac{[S]_{ккм}}{C_c}\right) \quad (8).$$

Поскольку у исследуемых мицеллообразующих солюбилизаторов $[S]_{ккм} \leq 10^{-4}$ М [8, 9], то при используемых в работе экспериментальных концентрациях этих вспомогательных веществ имеет место соотношение $C_c \gg [S]_{ккм}$. Это позволяет переписать формулу (8) в виде:

$$K_{mc} = K_m \times [L]_0 \quad (9).$$

Согласно формулам (6) и (9), в условиях проведенных экспериментов коэффициент молярной солюбилизации K_{mc} не зависит от концентрации солюбилизатора, что указывает на возможность использования линейного уравнения (4) для обработки экспериментальных данных. Получаемое значение K_{mc} с учетом уравнения (1) позволяет рассчитать оптимальное содержание (α) RSV в композиции с солюбилизатором в весовых процентах:

$$\alpha = \frac{\mu_L \times [L]_c}{\mu_L \times [L]_c + \mu_c \times C_c} \times 100 = \frac{\mu_L}{\mu_L + \mu_c \times K_{mc}} \times 100 \quad (10),$$

где μ_L и μ_c — молярные массы RSV и солюбилизатора соответственно.

Согласно полученным данным, солюбилизация RSV как при включении в мицеллы, так и при образовании молекулярных комплексов сопровождается значительным снижением поглощения и небольшим сдвигом положения максимума поглощения. Рис. 1 иллюстрирует характерные изменения спектров поглощения RSV, вызываемые разными видами солюбилизаторов (на примере их отдельных представителей), а в табл. 1 и 2 приводятся положения максимумов ($\lambda_{\text{макс}}$) и рассчитанные по экспериментальным данным молярные коэффициенты поглощения для всех исследованных солюбилизаторов. В кислой среде с pH 1,2 (см. рис. 1, а и табл. 1) все исследованные солюбилизаторы вызывают сходные изменения спектра поглощения RSV как по величине снижения поглощения, так и по сдвигу максимума в сторону увеличения длины волны. Однако при близком к нейтральному pH 6,8 (см. рис. 1, б и табл. 2) включение в молекулярные комплексы приводит к более выраженному снижению поглощения RSV, чем при включении в мицеллы. Кроме того, при данном pH имеет место различная направленность сдвига максимума поглощения в солюбилизаторах разных видов. Так, практически для всех неионогенных ПАВ, за исключением высокомолекулярного P407, сохраняется сдвиг в сторону увеличения длины волны, а для всех ЦД сдвиг максимума поглощения исследуемого полифенола происходит в коротковолновую область. Одинаковая с ЦД направленность сдвига максимума поглощения в присутствии P407 может отражать сходство микроокружения ресвератрола в этих солюбилизатах. В частности, из-за большей величины молекул P407 по сравнению с другими использованными неионогенными ПАВ в его мицеллах может иметь место ограничение доступности молекулы RSV для молекул воды, сходное с ограничением в полости молекул ЦД.

Представленные в табл. 1 и 2 молярные коэффициенты поглощения были использованы для обработки данных по солюбилизации RSV в соответствии с уравнением (4). На рис. 2 приведены примеры характерных зависимостей

$$\frac{D}{\varepsilon_L \times l} \text{ от } \frac{\varepsilon_{Lc}}{\varepsilon_L} \times C_c$$

для отдельных представителей разных видов солюбилизаторов, а в табл. 3 — полученные по результатам линейного регрессионного анализа молярные коэффициенты солюбилизации RSV для всех использованных солюбилизаторов. Также в табл. 3 приведены оптимальные составы самодиспергирующихся композиций RSV с солюбилизаторами, рассчитанные по уравнению (10) с использованием полученных значений K_{mc} .

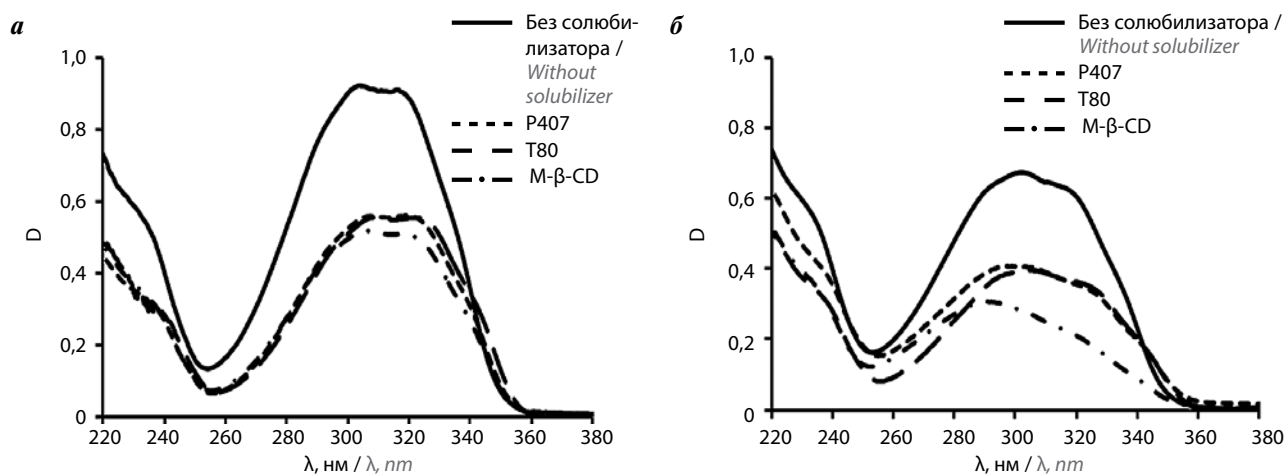


Рис. 1. Спектры поглощения транс-ресвератрола в присутствии солюбилизаторов разных видов (P407, T80, M-β-CD) и без них при pH 1,2 (а) и 6,8 (б)

Fig. 1. Absorption spectra of trans-resveratrol in the presence of different types of solubilizers (P407, T80, M-β-CD) and without them at pH 1.2 (a) and 6.8 (b)

Таблица 1. Спектральные характеристики транс-ресвератрола (RSV) в солянокислом буфере с pH 1,2 в присутствии солюбилизаторов и без них
Table 1. Spectral characteristics of trans-resveratrol (RSV) in hydrochloric acid buffer pH 1.2 with and without solubilizers

Солюбилизатор Solubilizer	$\lambda_{\text{макс}}$ в присутствии солюбилизатора, нм λ_{max} with solubilizer, nm	Молярный коэффициент поглощения RSV при $\lambda_{\text{макс}}$, $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ Molar absorption coefficient of RSV at λ_{max} , $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	
		в присутствии солюбилизатора with solubilizer	без солюбилизатора without solubilizer
—	303,8 ± 1,6	—	41 078 ± 323
P188	306,2 ± 3,0	25 642 ± 233	40 826 ± 324
P407	307,0 ± 2,4	24 796 ± 185	40 707 ± 315
T20	308,2 ± 2,2	25 301 ± 262	40 662 ± 332
T40	308,4 ± 2,5	25 137 ± 187	40 603 ± 331
T80	308,8 ± 1,8	24 617 ± 248	40 544 ± 319
α-CD	306,2 ± 1,7	24 157 ± 285	40 826 ± 324
β-CD	305,6 ± 2,8	24 989 ± 217	40 960 ± 335
γ-CD	304,0 ± 3,0	26 980 ± 365	41 034 ± 319
HP-α-CD	305,2 ± 2,0	12 916 ± 192	40 989 ± 329
HP-γ-CD	304,0 ± 2,5	21 988 ± 228	41 034 ± 320
M-β-CD	306,2 ± 2,4	22 939 ± 313	40 826 ± 328
S-α-CD	307,4 ± 2,9	22 849 ± 244	40 677 ± 318

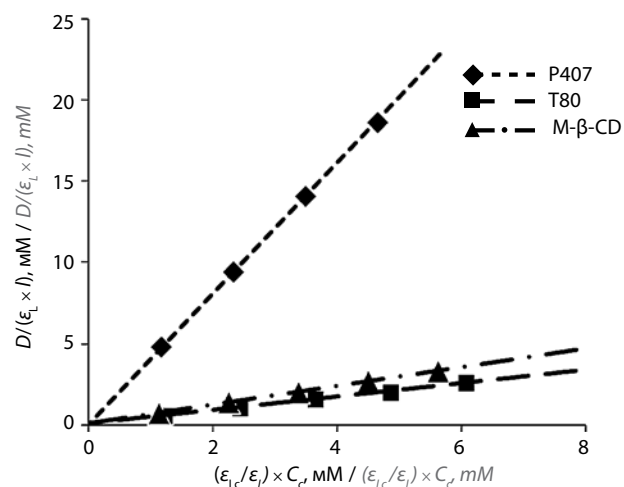
Согласно полученным данным, в кислой среде практически все солюбилизаторы характеризуются несколько меньшими молярными коэффициентами солюбилизации $K_{\text{мс}}$ RSV по сравнению с нейтральной средой. Исключение составляет HP-α-CD, у которого в кислой среде этот параметр немного выше, чем в нейтральной. Мицеллообразующие солюбилизаторы в основном проявляют более высокую солюбили-

зирующую способность по сравнению с ЦД независимо от pH. При этом обращает на себя внимание очень большое значение $K_{\text{мс}}$ у полоксамера P407. Немодифицированные ЦД и модифицированный янтарной кислотой S-α-CD обладают низкой способностью солюбилизировать RSV, тогда как модифицированные гидроксипропил- и метил-ЦД характеризуются существенно более высокой солюбилизирующей

Таблица 2. Спектральные характеристики транс-ресвератрола (RSV) в фосфатном буфере с pH 6,8 в присутствии солюбилизаторов и без них
Table 2. Spectral characteristics of trans-resveratrol (RSV) in phosphate buffer pH 6.8 with and without solubilizers

Солюбилизатор Solubilizer	$\lambda_{\text{макс}}$ в присутствии солюбилизатора, нм λ_{max} with solubilizer, nm	Молярный коэффициент поглощения RSV при $\lambda_{\text{макс}}$, $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ Molar absorption coefficient of RSV at λ_{max} , $\text{M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	
		в присутствии солюбилизатора with solubilizer	без солюбилизатора without solubilizer
—	$301,8 \pm 1,7$	—	30085 ± 262
P188	$305,2 \pm 1,6$	$21\,676 \pm 245$	$29\,773 \pm 241$
P407	$299,0 \pm 2,8$	$18\,111 \pm 175$	$29\,817 \pm 239$
T20	$306,6 \pm 2,1$	$18\,883 \pm 253$	$29\,475 \pm 257$
T40	$304,6 \pm 2,6$	$17\,427 \pm 158$	$29\,877 \pm 225$
T80	$304,6 \pm 2,0$	$17\,575 \pm 242$	$29\,877 \pm 248$
α -CD	$292,0 \pm 2,8$	$14\,931 \pm 167$	$28\,317 \pm 266$
β -CD	$292,0 \pm 2,9$	$15\,228 \pm 155$	$28\,317 \pm 238$
γ -CD	$294,8 \pm 2,9$	$15\,911 \pm 203$	$29\,000 \pm 259$
HP- α -CD	$290,0 \pm 1,6$	$9\,196 \pm 128$	$27\,841 \pm 231$
HP- γ -CD	$290,6 \pm 2,7$	$14\,470 \pm 202$	$27\,633 \pm 276$
M- β -CD	$290,6 \pm 2,8$	$13\,638 \pm 186$	$27\,841 \pm 242$
S- α -CD	$290,0 \pm 2,0$	$13\,653 \pm 122$	$27\,633 \pm 238$

a



б

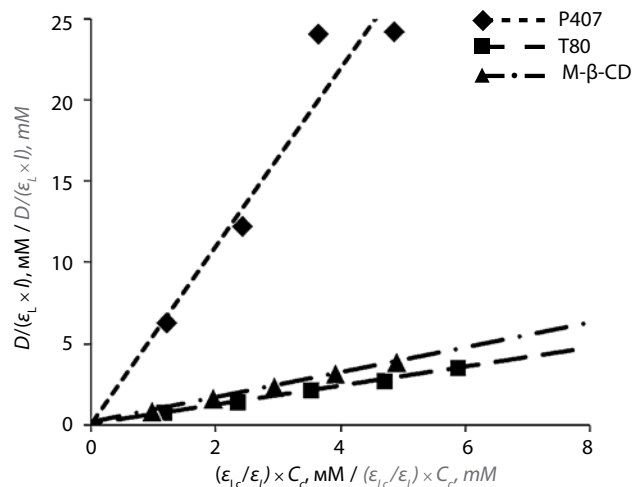


Рис. 2. Солюбилизация транс-ресвератрола солюбилизаторами разных видов при pH 1,2 (а) и 6,8 (б). Точки отображают экспериментальные данные, а линии проведены с использованием коэффициентов, полученных в результате линейного регрессионного анализа этих данных
Fig. 2. Solubilization of trans-resveratrol with different types of solubilizers at pH 1.2 (a) and 6.8 (b). Points represent experimental data, and lines are drawn using coefficients obtained from linear regression analysis of these data

способностью. Особо выделяется М-β-CD, у которого значение $K_{\text{мс}}$ не только самое большое среди ЦД, но и превосходит значения, полученные для всех мицеллообразующих солюбилизаторов, кроме P407.

Переход к имеющему большее практическое значение оптимальному содержанию RSV в самодиспергирующей композиции, которое рассчитывается с использованием полученных значений $K_{\text{мс}}$, ставит особо выделяющийся по значению $K_{\text{мс}}$ P407 на один

Таблица 3. Коэффициенты молярной солюбилизации транс-ресвератрола (RSV) при pH желудочного и кишечного отделов желудочно-кишечного тракта и оптимальные составы самодиспергирующих композиций с солюбилизаторами

Table 3. Molar solubilization coefficients of trans-resveratrol (RSV) at pH of the gastric and intestinal gastrointestinal tract and optimal compositions of self-dispersing compositions with solubilizers

Солюбилизатор Solubilizer	Молярная масса солюбилизатора, г/моль Molar mass of the solubilizer, g/mol	Молярный коэффициент солюбилизации ресвератрола Molar solubilization coefficient of resveratrol		Содержание RSV в оптимальной самодиспергирующей композиции, % RSV content in an optimal self-dispersing composition, %	
		pH 1,2	pH 6,8	pH 1,2	pH 6,8
P188	8400	0,35 ± 0,07	0,42 ± 0,08	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2
P407	12 600	3,98 ± 0,69	5,68 ± 1,02	6,7 ± 1,2	9,3 ± 1,7
T20	1227	0,33 ± 0,04	0,45 ± 0,06	5,8 ± 0,6	7,7 ± 1,0
T40	1277	0,40 ± 0,07	0,57 ± 0,11	6,6 ± 1,1	9,2 ± 1,8
T80	1310	0,42 ± 0,07	0,58 ± 0,11	6,8 ± 1,2	9,2 ± 1,8
α-CD	972	0,08 ± 0,01	0,13 ± 0,01	1,9 ± 0,3	3,0 ± 0,3
β-CD	1135	0,16 ± 0,03	0,23 ± 0,03	3,2 ± 0,6	4,4 ± 0,6
γ-CD	1297	0,08 ± 0,01	0,12 ± 0,02	1,4 ± 0,2	2,1 ± 0,4
HP-α-CD	1185	0,32 ± 0,04	0,22 ± 0,02	5,8 ± 0,7	4,1 ± 0,4
HP-γ-CD	1576	0,15 ± 0,03	0,29 ± 0,04	2,2 ± 0,4	4,0 ± 0,5
M-β-CD	1312	0,58 ± 0,09	0,77 ± 0,11	9,2 ± 1,4	11,9 ± 1,7
S-α-CD	1572	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,01	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,2

Примечание. В расчете содержания RSV в самодиспергирующей композиции по уравнению (10) использовалось значение молярной массы 228 г/моль. Молекулярные массы солюбилизаторов приведены в соответствии с данными производителей.

Note. The molar mass value of 228 g/mol was used to calculate the RSV content in the self-dispersing composition according to equation (10). The molecular weights of solubilizers are given in accordance with the manufacturers' data.

уровень с полисорбатами. Одновременно другой полоксамер, P188, оказывается солюбилизатором с самым низким оптимальным содержанием RSV в композиции. Описанное снижение положения полоксамеров в ряду привлекательности солюбилизаторов в значительной степени отражает их большие молекулярные массы. Использование в качестве характеристики солюбилизатора оптимального содержания RSV в самодиспергирующей композиции сохраняет положение ЦД как уступающих мицеллообразующим солюбилизаторам, за исключением M-β-CD. Последний не только сохраняет положение лучшего солюбилизатора RSV среди ЦД, но оказывается лучшим среди всех исследованных солюбилизаторов.

В соответствии с уравнением (4), кроме оценки $K_{мс}$, регрессионный анализ результатов экспериментов по солюбилизации позволяет получить значения собственной растворимости RSV при использовавшихся pH, которые соответствуют разным отделам желудочно-кишечного тракта. Усредненные по всем

солюбилизаторам данные дают для pH 1,2 величину $[L]_0 = 0,13 \pm 0,02$ mM, а для pH 6,8 – $[L]_0 = 0,18 \pm 0,03$ mM.

Приведенные величины подтверждают низкие значения и недостоверный характер различий собственной растворимости RSV при pH желудочного и кишечного отделов желудочно-кишечного тракта, что указывает на целесообразность разработки композиции RSV с солюбилизатором для повышения его биодоступности во всех отделах желудочно-кишечного тракта.

Обсуждение

С учетом полученных в настоящей работе данных в качестве солюбилизаторов, которые целесообразно использовать в лекарственном препарате для повышения биодоступности RSV, выступают P407, T80 и модифицированный M-β-CD. Высокая температура плавления (253–255 °C) RSV и нестабильность при нагревании [3] делают непривлекательным использование для получения композиций таких методов, как его сплавление с твердыми солюбилизаторами

или растворение при высоких температурах в жидких солюбилизаторах. Поэтому наиболее подходящим методом является растворение RSV и солюбилизатора в интересующем соотношении в общем растворителе с последующим его удалением. В качестве наиболее подходящих растворителей выступают спирты, в которых растворим RSV и легкорастворимы полоксамеры и полисорбаты [14, 15]. Однако в них практически не растворимы немодифицированные ЦД [16], тогда как модифицированные растворимы умеренно [17]. Поэтому в ряду ЦД

последние выступают как технологически наиболее привлекательные для использования в качестве солюбилизаторов RSV.

Заключение

В целом результаты проведенных исследований указывают на перспективность разработки препаратов с повышенной растворимостью RSV и, как следствие, возможным улучшением его биодоступности на основе композиций с такими солюбилизаторами, как P407, T80 и модифицированный М-β-CD.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Park E.J., Pezzuto J.M. The pharmacology of resveratrol in animals and humans. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(6):1071–113. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.01.014.
2. Pangeni R., Sahni J.K., Ali J. et al. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* 2014;11(8):1285–98. DOI: 10.1517/17425247.2014.919253.
3. Francioso A., Mastromarino P., Masci A. et al. Chemistry, Stability and Bioavailability of Resveratrol. *Med Chem* 2014;10(3):237–45. DOI: 10.2174/15734064113096660053.
4. van Hoogevest P., Liu X., Fahr A. Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs: the industrial perspective. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8(11):1481–500. DOI: 10.1517/17425247.2011.614228.
5. Hao J., Tong T., Jin K. et al. Folic acid-functionalized drug delivery platform of resveratrol based on Pluronic 127/D-α-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate mixed micelles. *Int J Nanomedicine* 2017;12:2279–92. DOI: 10.2147/IJN.S130094.
6. Chang C.W., Wong C.Y., Wu Y.T. et al. Development of a Solid Dispersion System for Improving the Oral Bioavailability of Resveratrol in Rats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2017;42(2):239–49. DOI: 10.1007/s13318-016-0339-0.
7. Calvo-Castro L.A., Schiborr C., David F. et al. The Oral Bioavailability of Trans-Resveratrol from a Grapevine-Shoot Extract in Healthy Humans is Significantly Increased by Micellar Solubilization. *Mol Nutr Food Res* 2018;62(9):e1701057. DOI: 10.1002/mnfr.201701057.
8. Summerlin N., Qu Z., Pujara N. et al. Colloidal mesoporous silica nanoparticles enhance the biological activity of resveratrol. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016;144:1–7. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.076.
9. Jadhav P., Bothiraja C., Pawar A. Resveratrol-piperine loaded mixed micelles: formulation, characterization, bioavailability, safety and *in vitro* anticancer activity. *RSC Advances* 2016;6(114):112795–805. DOI: 10.1039/C6RA24595A.
10. Berta G.N., Salamone P., Sprio A.E. et al. Chemoprevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamster cheek pouch by topical application of resveratrol complexed with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Oral Oncol* 2010;46(1):42–8. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2009.10.007.
11. Moyano-Mendez J.R., Fabbrocini G., De Stefano D. et al. Enhanced antioxidant effect of trans-resveratrol: potential of binary systems with polyethylene glycol and cyclodextrin. *Drug Dev Ind Pharm* 2014;40(10):1300–7. DOI: 10.3109/03639045.2013.817416.
12. Yang G., Jain N., Yalkowsky S.H. Combined effect of SLS and (SBE)7M-β-CD on the solubilization of NSC-639829. *Int J Pharm* 2004;269(1):141–8. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2003.09.001.
13. Zhao L., Li P., Yalkowsky S.H. Solubilization of fluasterone. *J Pharm Sci* 1999;88(10):967–9. DOI: 10.1021/js9901413.
14. Solubility enhancement with BASF pharma polymers: Solubilizer compendium. Ed by T. Reintjes. *Lampertheim: BASF*, 2011. 128 p.
15. Knoch H., Ulbrich M.H., Mittag Judith J. et al. Complex Micellization Behavior of the Polysorbates Tween 20 and Tween 80. *Mol Pharm* 2021;18(8):3147–57. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00406.
16. de Miranda J.C., Martins T.E.A., Veiga F., Ferras H.G. Cyclodextrins and ternary complexes: technology to improve solubility of poorly soluble drugs. *Braz J Pharm Sci* 2011;47(4):665–81. DOI: 10.1590/S1984-82502011000400003.
17. Crini G., Fourmentin S., Lichtfouse E. The History of Cyclodextrins. Ser.: Environmental Chemistry for a Sustainable World. Springer, Cham., 2020.

Вклад авторов

С.П. Кречетов: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

М.С. Масленникова: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Н.Л. Соловьева: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных;

И.И. Краснюк: разработка дизайна исследования.

Authors contribution

S.P. Krechetov: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

M.S. Maslennikova: review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

N.L. Solovieva: review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

I.I. Krasnyuk: research design development.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.П. Кречетов / S.P. Krechetov: <https://orcid.org/0000-0003-2861-6010>

М.С. Масленникова / M.S. Maslennikova: <https://orcid.org/0000-0002-6416-7091>

Н.Л. Соловьева / N.L. Solovieva: <https://orcid.org/0000-0002-0781-7553>

И.И. Краснюк / I.I. Krasnyuk: <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (договор № 02.G25.31.0001) в рамках реализации Постановления Правительства РФ от 09.04.2010 № 218.

Financing. This work was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (contract No 02.G25.31.0001) within the framework of the implementation of the Government Decree of the Russian Federation of 09.04.2010 No 218.

Статья поступила: 13.08.2021. Принята к публикации: 03.09.2021.

Article submitted: 13.08.2021. Accepted for publication: 03.09.2021.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2021-20-3-66-72>

Влияние производного 5-оксипиримидина на рост и метастазирование меланомы B16 у мышей линии C57BL/6

Р.В. Журиков, Л.П. Коваленко, С.В. Никитин, А.Д. Дурнев

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова»; Россия, 125315, Москва, Балтийская улица, 8

Контакты: Руслан Владимирович Журиков zhurikovrv@gmail.com

Введение. Подавление активации альтернативного иммунного ответа является перспективным направлением иммунотерапии опухолей. В данной работе было изучено влияние соединения СНК-411 на метастазирование и рост меланомы B16.

Цель исследования – оценка противоопухолевой и антиметастатической активности производного 5-оксипиримидина СНК-411 на модели меланомы B16.

Материалы и методы. Исследование проводили на мышах C57BL/6 с подкожно имплантированной меланомой B16-F10. Производное 5-оксипиримидина СНК-411 вводили внутрибрюшинно со 2-го по 15-й день развития опухоли в дозах 10 и 25 мг/кг и в сочетании с однократным введением доксорубина в дозе 4 мг/кг. Доксорубин также использовали в качестве положительного контроля при однократном введении в дозе 4 мг/кг на 2-й день развития опухоли. Противоопухолевую активность определяли по торможению роста опухоли, антиметастатическую – рассчитывая индекс ингибирования процесса метастазирования (ИИМ).

Результаты. Производное 5-оксипиримидина СНК-411 в дозах 10 и 25 мг/кг, а также в комбинации с однократным введением доксорубина в дозе 4 мг/кг проявляло выраженную антиметастатическую активность. ИИМ при введении СНК-411 в дозе 10 мг/кг составил 72 %, при введении в дозе 25 мг/кг метастазирование подавлялось на 82,9 %. При применении комбинации 14-дневного введения СНК-411 в дозе 10 мг/кг и однократного введения доксорубина в дозе 4 мг/кг ИИМ составил 97,1 %; у половины мышей этой группы на 21-й день развития меланомы B16 метастазы в легких не были выявлены. После применения СНК-411 достоверного торможения роста опухоли на 21-й день развития меланомы B16 в опытных группах не обнаружено.

Заключение. СНК-411 обладает выраженными антиметастатическими свойствами на модели меланомы B16, что требует дополнительного изучения.

Ключевые слова: 5-оксипиримидин, индекс ингибирования метастазирования, меланома, интерлейкин, иммунотерапия

Для цитирования: Журиков Р.В., Коваленко Л.П., Никитин С.В., Дурнев А.Д. Влияние производного 5-оксипиримидина на рост и метастазирование меланомы B16 у мышей линии C57BL/6. Российский биотерапевтический журнал 2021;20(3):66–72. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-66-72.

Effects of 5-hydroxypyrimidine derivative on growth and metastasis of melanoma B16 in C57BL/6 mice

Ruslan V. Zhurikov, Larisa P. Kovalenko, Sergey V. Nikitin, Andrey D. Durnev

V.V. Zakusov institute of pharmacology; 8, Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

Contacts: Ruslan Vladimirovich Zhurikov zhurikovrv@gmail.com

Introduction. Suppression of activation of an alternative immune response is promising approach of tumor immunotherapy. In this study we evaluated antitumor and antimetastatic activity of SNK-411.

Objective. Evaluation of antitumor and antimetastatic activity of 5-hydroxypyrimidine derivative SNK-411 in mouse melanoma B16 model.

Materials and methods. Antitumor and antimetastatic activity of the SNK-411 were studied in tests on male C57BL/6 mice using the B16-F10 melanoma model. SNK-411 was injected intraperitoneally at doses of 10 and 25 mg/kg

from day 2 to day 15 of melanoma development. Doxorubicin was injected at dose of 4 mg/kg on day 2 of tumor development to act as positive control. Antitumor and antimetastatic activity were studied by calculation of tumor growth inhibition and metastasis inhibition index (MII).

Results. SNK-411 at doses of 10 and 25 mg/kg and in combination with single injection of doxorubicin in dose of 4 mg/kg showed antimetastatic activity. MII in SNK-411 at 10 mg/kg dose was 72 %, at dose of 25 mg/kg was 82,9 %. The combination of 14-day course of intraperitoneal injections of SNK-411 at dose of 10 mg/kg and injection of doxorubicin 4 mg/kg revealed MII 97,1 %, in half of mice in this group metastasis were not observed on 21st day of melanoma development. All results are statistically significant. There was no significant inhibition of tumor growth in all groups.

Conclusion. SNK-411 has antimetastatic activity in tests on melanoma B16 model. Further investigation is required.

Key words: 5-hydroxypyrimidine, metastasis inhibition index, melanoma, interleukin, immunotherapy

For citation: Zhurikov R.V., Kovalenko L.P., Nikitin S.V., Durnev A.D. Effects of 5-hydroxypyrimidine derivative on growth and metastasis of melanoma B16 in C57BL/6 mice. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2021;20(3):66–72. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-3-66-72.

Введение

Современный этап развития онкологии характеризуется разработкой различных подходов к иммунотерапии опухолей. Поступившие в клиническую практику ингибиторы контрольных точек противоопухолевого иммунного ответа (Anti-CTLA4, Anti-PD–L1) позволяют эффективно лечить пациентов с меланомой, однако ее высокая метастатическая активность продолжает оставаться проблемой при лечении поздних стадий заболевания.

Согласно нашим предыдущим исследованиям, производное 5-оксипиридина СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин) обладает противоопухолевыми свойствами, оказывает иммуностимулирующее действие на NK-клетки и цитотоксические Т-лимфоциты у мышей C57BL/6 и F1 (CBA × C57BL/6). На разных моделях СНК-411 демонстрирует выраженное противовоспалительное действие, понижает содержание плейотропного интерлейкина (ИЛ) 4 и провоспалительного ИЛ-6 в сыворотке крови у мышей-опухоленосителей C57BL/6 с эпидермоидной карциномой легкого Льюис (LLC), *in vitro* в концентрации 10⁵ М значительно увеличивает гибель клеток линии К-562 (хроническая миелоидная лейкемия), индуцированную мононуклеарами периферической крови человека [1–3].

Производные пиридина нашли свое применение в лечении инфекционных, хирургических, неврологических, онкологических и многих других заболеваний и представляют собой группу химических веществ с широким спектром фармакологической активности и высоким профилем лекарственной безопасности. В связи с этим данная группа веществ и в настоящее время рассматривается как основа для синтеза новых фармакологически эффективных соединений [4].

Цель исследования — оценка противоопухолевой и антимагистатической активности производного 5-оксипиридина СНК-411 при его курсовом вве-

дении и в сочетании с однократным введением доксорубина на модели меланомы В16.

Материалы и методы

В отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» синтезировано производное 5-оксипиридина — СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиридин) [5]. СНК-411 использовано в настоящей работе в виде фармацевтической субстанции. В соответствии с методическими указаниями по изучению антимагистатических и противоопухолевых свойств новых противоопухолевых соединений, в данной работе была использована экспериментальная модель меланомы В16, обладающая высокой способностью к метастазированию [6–8].

Работа выполнена на 50 мышах-самцах линии C57BL/6, полученных из филиала «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животных содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» при 12-часовом световом режиме, на стандартном сбалансированном брикетированном корме, со свободным доступом к пище и воде, при естественном освещении и температуре воздуха 20–21 °С.

В качестве экспериментальной модели злокачественного роста была использована модель меланомы В16-F10 *in vivo*, штамм В16-F10 получен из банка опухолевых материалов НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Взвесь опухолевых клеток меланомы В16-F10 имплантировали мышам подкожно в область подмышечной впадины по 50 мг в 0,5 мл раствора Хэнкса на мышь. Прививочная доза составляла не менее 5 × 10⁶ клеток/мышь. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли. В качестве положительного контроля

использовали доксорубин гидрохлорид (ЭБЕВЕ ФАРМА Гес. м. б. Х.Нфг. КГ, Австрия), который растворяли в изотоническом растворе натрия хлорида и вводили однократно внутривенно в дозе 4 мг/кг на 2-й день развития опухоли (через 48 ч после прививки опухоли) [6]. По данным литературы, доксорубин в опытах на мышах с меланомой В16 обладал эффективностью в экспериментальных исследованиях [8]. В ранее проведенных экспериментах *in vitro* на линии клеток хронической миелоидной лейкемии К-562 при введении комбинации СНК-411 и доксорубина был выявлен аддитивный эффект [3]. В настоящее время доксорубин идентифицирован как индуктор иммуногенной клеточной гибели с регрессией раковых клеток, вызывающий выраженный противоопухолевый иммунный ответ [9], поэтому его выбрали для совместного использования с СНК-411, который обладает иммунофармакологической активностью.

СНК-411 растворяли в 1 % растворе крахмала и внутривенно вводили в дозах 10 и 25 мг/кг в течение 14 дней со 2-го по 15-й дни развития меланомы В16.

Животных рандомизировали по группам:

- активного контроля – внутривенное введение 1 % раствора крахмала;
- доксорубин в дозе 4 мг/кг;
- СНК-411 в дозе 10 мг/кг;
- СНК-411 в дозе 10 мг/кг + доксорубин в дозе 4 мг/кг;
- СНК-411 в дозе 25 мг/кг.

Противоопухолевый эффект регистрировали на 11, 15 и 21-е сутки развития опухоли. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

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

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

После вскрытия мышей метастазы в легких изучали под лупой с 8-кратным увеличением (Magnifier Lamp 8608 E-D XB с кольцевой люминесцентной подсветкой).

Индекс ингибирования метастазирования (ИИМ, %) определяли по формуле:

$$\text{ИИМ} = [(A_k \times B_k - A \times B)/A_k \times B_k] \times 100,$$

где A_k и A – частота метастазирования в легких у мышей контрольной и опытной группы соответственно; B_k и B – среднее число метастазов в легких в контрольной и опытной группах соответственно.

В случае большого количества метастатических узлов оценивали степень метастатического поражения по общепринятой шкале [10].

Минимальные критерии противоопухолевой активности – ТРО ≥ 50 % [6]. Минимальные критерии антимагистатической активности – ингибирование процесса спонтанного метастазирования в присутствии первичного опухолевого узла 35–75 % [11].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы STATISTICA 10. Результат выражали в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок осуществляли по критерию Шапиро–Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью непарного t -критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

После окончания курсового введения СНК-411 в дозах 10 и 25 мг/кг и в сочетании с однократным введением доксорубина статистически значимого ТРО на 21-й день развития меланомы В16 в опытных группах не обнаружено (табл. 1). Минимальный противоопухолевый эффект (ТРО = 58,2 %) получен на 11-е сутки после применения комбинации СНК-411 и доксорубина.

Влияние СНК-411 на процесс метастазирования в легких мышей оценивали на 21-е сутки после инокуляции меланомы В16 и эвтаназии животных. Частота метастазирования у животных контрольной группы составила 100 %. В контрольной группе у мышей выявили метастазы различных размеров (табл. 2). При 14-дневном внутривенном введении производного 5-оксипиримидина в дозах 10 и 25 мг/кг, а также в комбинации с однократным внутривенным введением доксорубина в дозе 4 мг/кг СНК-411 проявляло выраженную антимагистатическую активность (см. табл. 2). ИИМ при введении СНК-411 в дозе 10 мг/кг составил 72 %, при введении в дозе 25 мг/кг метастазирование подавлялось на 82,9 %. При применении комбинации 14-дневного введения СНК-411 в дозе 10 мг/кг и однократного введения доксорубина в дозе 4 мг/кг ИИМ составил 97,1 %, у половины мышей этой группы на 21-й день развития меланомы В16 метастазы в легких не были выявлены.

Согласно данным литературы, микроокружение меланомы обладает иммуносупрессивными свойствами [12]. На IV (метастатической) стадии развития меланомы появляются нарушения иммунного гомеостаза в виде повышения уровня цитокинов Th2 (ИЛ-4, 5, 10 и 13) и снижения уровня цитокинов Th1 (ИЛ-2, трансформирующий фактор роста β и интерферон γ), что указывает на переход из состояния острого воспаления в состояние хронического воспаления [13]. Активация альтернативного иммунного ответа,

Таблица 1. Влияние СНК-411 при внутрибрюшинном введении в разных дозах и совместно с однократным введением доксорубина на рост меланомы B16

Table 1. Effect of SNK-411 intraperitoneal injections course in different doses and in combination with a single injection of doxorubicin on growth of melanoma B16

Группа Group	11-е сутки 11 th day	15-е сутки 15 th day	21-е сутки 21 st day
Объем опухоли, мм³ Tumor volume growth, mm ³			
Контроль, 1 % раствор крахмала Control, 1 % starch solution	896 ± 75,1	2795 ± 597,7	5036,9 ± 643,3
Доксорубин 4 мг/кг Doxorubicin 4 mg/kg	754,8 ± 42,6	2169 ± 399,5	3160,8 ± 647,6
СНК-411 10 мг/кг SNK-411 10 mg/kg	861,6 ± 145,8	1781 ± 469,4 ^{*ac}	5185,5 ± 554,9
СНК-411 10 мг/кг + доксорубин 4 мг/кг SNK-411 10 mg/kg + doxorubicine 4 mg/kg	374,9 ± 115,8 ^{*abc}	1752 ± 166,2	4779,3 ± 545,4
СНК-411 25 мг/кг SNK-411 25 mg/kg	785,3 ± 90,3	2400 ± 390,5	3926 ± 754,3
Торможение роста опухоли, % Tumor growth inhibition, %			
Доксорубин 4 мг/кг Doxorubicin 4 mg/kg	15,8	22,4	37,25
СНК-411 10 мг/кг SNK-411 10 mg/kg	3,8	36,3	—
СНК-411 10 мг/кг + доксорубин 4 мг/кг SNK-411 10 mg/kg + doxorubicine 4 mg/kg	58,2	37,3	5,11
СНК-411 25 мг/кг SNK-411 25 mg/kg	12,4	14,1	22,05

^{*}*p* < 0,05 в сравнении с контрольной группой, критерий Манна–Уитни; ^a*p* < 0,05 в сравнении с группой доксорубина 4 мг/кг, критерий Манна–Уитни; ^b*p* < 0,05 в сравнении с группой СНК-411 10 мг/кг, критерий Манна–Уитни; ^c*p* < 0,05 в сравнении с группой СНК-411 25 мг/кг, критерий Манна–Уитни.

Примечание. Число особей в группах *n* ≥ 9.

^{*}*p* < 0,05 vs control group, Mann–Whitney U-test; ^a*p* < 0,05 vs doxorubicin 4 mg/kg group, Mann–Whitney U-test; ^b*p* < 0,05 vs SNK-411 10 mg/kg group, Mann–Whitney U-test; ^c*p* < 0,05 vs SNK-411 25 mg/kg, Mann–Whitney U-test.

Note. The number of mice in groups *n* ≥ 9.

в котором активно участвуют ИЛ-4, 10, 17 [14–18], секретируемые клетками в микроокружении опухолей, в частности ТАМ (tumor associated macrophages) [13, 15], способствует росту самой опухоли и эпителиально-мезенхимальному переходу клеток опухоли, что является ключевым компонентом метастазирования [16, 17, 19, 20]. При онкологических заболеваниях ИЛ-4 действует через STAT6-сигнальный путь, увеличивает резистентность к CD95-зависимому апоптозу раковых клеток. В микроокружении солидных опухолей обнаружено повышенное содержание ИЛ-4, который вызывает активацию развития опухоли-ассоциированных иммунодепрессивных макрофагов (ТАМ). В первичной опухоли ТАМ-макрофаги

микроокружения под влиянием ИЛ-4 способствуют инвазии метастатических опухолевых клеток [14, 16, 17, 19, 20].

Согласно ранее полученным нами данным на модели эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC), в группах животных с имплантированной LLC, получавших СНК-411 в дозах 25 и 50 мг/кг со 2-го по 8-й день развития LLC, выявлено выраженное снижение уровня ИЛ-4 – в 4 и 3,6 раза соответственно и ИЛ-6 – в 2,7 и 1,6 раза соответственно, что коррелирует с данными о достоверном ТРО в 1,8 и 2,2 раза в эти сроки [2].

По данным литературы, доксорубин обладает антиметастатическим действием. В механизмах

Таблица 2. Показатели метастазирования меланомы В16 при курсовом введении соединения СНК-411 в разных дозах и совместно с однократным введением доксорубина

Table 2. B16 melanoma metastasis parameters for a course of SNK-411 in different doses and in combination with a single injection of doxorubicin

Группа Group	Среднее число метастазов (M ± m) Average number of metastases (M ± m)	Степень поражения легких метастазами, % Degree of lung damage by metastases, %						ИИМ на 21-е сутки развития опухоли, % MI1 on 21 st day of tumor development, %
		Низкий потенциал колонизации легких Low lung colonization potential			Высокий потенциал колонизации легких High lung colonization potential			
		0	1	2	3	4	5	
Контроль, 1 % раствор крахмала Control, 1 % starch solution	11,4 ± 1,2	—	40	20	—	20	20	—
Доксорубин 4 мг/кг Doxorubicin 4 mg/kg	3,3 ± 1,2*	33	50	—	—	17	—	80,5
СНК-411 10 мг/кг SNK-411 10 mg/kg	3,8 ± 1,7*	17	67	—	—	17	—	72,0
СНК-411 10 мг/кг + док- сорубин 4 мг/кг SNK-411 10 mg/kg + doxo- rubicin 4 mg/kg	0,7 ± 0,3 ^а	50	33	—	—	17	—	97,1
СНК-411 25 мг/кг SNK-411 25 mg/kg	3,1 ± 1,3 ^в	38	50	—	—	13	—	82,9

* $p < 0,05$ по непарному t -критерию Стьюдента в сравнении с контролем; ** $p < 0,01$ по непарному t -критерию Стьюдента в сравнении с контролем; * $p < 0,05$ по непарному критерию Стьюдента в сравнении с СНК-411 10 мг/кг.

Примечание. Число особей в группах $n \geq 9$; ИИМ — индекс ингибирования метастазирования.

* $p < 0,05$ vs control group, unpaired Student t -criterion; ** $p < 0,01$ vs control group, unpaired Student t -criterion; * $p < 0,05$ vs SNK-411 10 mg/kg, unpaired Student t -criterion.

Note. The number of mice in groups $n \geq 9$; MII — metastasis inhibition index.

антиметастатического и противоопухолевого действия доксорубина принимает участие его способность индуцировать иммуногенную клеточную смерть [9]. Вследствие этого процесса активируются такие клетки, как классические дендритные клетки (сDC) и плазматоидные дендритные клетки (pDC). Данные клетки обладают провоспалительным фенотипом, способствуют дифференцировке Т-хелперов (CD4⁺) и цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺), что приводит к активации иммунного ответа на опухолевые клетки и их элиминации [21].

Противовоспалительные и иммуностропные свойства СНК-411 на разных моделях [1–3] и подавление содержания плейоторопного ИЛ-4 и провоспалительного ИЛ-6 [2], возможно, объясняют антиметастатическое действие СНК-411 в данной работе.

Заключение

После окончания курсового введения СНК-411 внутрибрюшинно в дозах 10 и 25 мг/кг достоверного ТРО на 21-й день развития меланомы не обнаружено. При введении СНК-411 внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг ИИМ составил 72 %, в дозе 25 мг/кг — 83 %, при комбинации 14-дневного введения СНК-411 в дозе 10 мг/кг и однократного введения доксорубина в дозе 4 мг/кг ИИМ составил 97 %. На модели меланомы В16-F10 подтверждено антиметастатическое действие СНК-411, определена аддитивность эффекта курсового введения СНК-411 совместно с однократным введением доксорубина. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейших исследований антиметастатической активности производного 5-оксипиримидина СНК-411.

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

- Кузнецова О.С., Таллерова А.В., Никитин С.В., Коваленко Л.П. Иммунофармакологические свойства нового производного 5-оксипириримидина СНК-411. Экспериментальная и клиническая фармакология 2015;78(4):6–9. [Kuznetsova O.S., Talerova A.V., Nikitin S.V., Kovalenko L.P. Immunopharmacological properties of new 5-pyrimidol derivative SNK-411. Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology 2015;78(4):6–9. (In Russ.)]. DOI: 10.30906/0869-2092-2015-78-4-6-9.
- Kuznetsova O.S., Talerova A.V., Nikitin S.V., Kovalenko L.P. Effects of 5-pyrimidinol derivative SNK-41 on cytokine profile of mice with Lewis lung carcinoma. Bull Exp Biol Med 2016;160(4):483–5. DOI: 10.1007/s10517-016-3202-z.
- Кузнецова О.С., Таллерова А.В., Соколовская А.А. Цитотоксическая активность производного 5-оксипириримидина (СНК-411) в отношении опухолевых клеток К-562. Вестник ВГУ. Сер.: Химия. Биология. Фармация 2015;1:142–6. [Kuznetsova O.S., Talerova A.V., Sokolovskaya A.A. et al. Cytotoxic activity of 5-hydroxypyrimidine derivative(SNK-411) on tumor cell line K-562. Vestnik VGU. Ser.: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy 2015;1:142–6 (In Russ.)].
- Самотруева М.А., Цибизова А.А., Ясеновская А.Л. и др. Фармакологическая активность производных пириимидинов. Астраханский медицинский вестник 2015;10(1):12–30. [Samotrueva M.A., Tsbizova A.A., Yasenevskaya A.L. et al. Pharmacological activity of pyrimidine derivatives. Astrakhanskiy medicinskiy vestnik = Astrakhan medical journal 2015;10(1):12–30].
- Середенин С.Б., Никитин С.В., Коваленко Л.П. и др. Производное 5-оксипириримидина, обладающее противоопухолевой активностью. Патент РФ № 2518889 С2, 10.06.2014. Бюлл. № 16. [Seredenin S.B., Nikitin S.V., Kovalenko L.P. et al. 5-Hydroxypyrimidine derivative with antitumor activity. Patent RU № 2518889 С2, 10.06.2014, Bulletin № 16].
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. С. 642–657. [Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Ed. by A.N. Mironov et al. Part one. Moscow: Griff i K, 2012. Pp. 642–657. (In Russ.)].
- Teicher B.A. Tumor Models in Cancer Research. Boston, USA: Springer, 2010. 682 p.
- Experimental Evaluation of Antitumor Drugs in the USA and USSR and Clinical Correlations. Natl Cancer Inst Monogr, Issue 55, 1980. 179 p.
- Radogna F, Dicato M., Diederich M. Natural modulators of the hallmarks of immunogenic cell death. Biochem Pharmacol 2019;162:55–70. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.12.016.
- Tarin D., Price J. Metastatic colonization potential of primary tumour cells in mice. Br J Cancer 1979;39:740–54. DOI: 10.1038/bjc.1979.128.
- Зуева Е.П., Козлов А.М., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по доклиническому изучению средств, обладающих способностью ингибировать процесс метастазирования и повышать эффективность цитостатической терапии злокачественных опухолей. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. С. 637–649. [Zueva E.P., Kozlov A.M., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the drugs capable of inhibiting metastasis process and increasing efficacy of cytostatic therapy of malignant tumors. Guidelines for preclinical studies of new pharmacological substances. Moscow: Meditsina, 2005. Pp. 637–649 (In Russ.)].
- Mansfield A.S., Holtan Sh.G., Grotz T.E. et al. Regional immunity in melanoma: immunosuppressive changes precede nodal metastasis. Mod Pathol 2011;24(4):487–94. DOI: 10.1038/modpathol.2010.227.
- Nevala W.K., Vachon C.M., Leontovich A.A. et al. Evidence of systemic Th2 driven chronic inflammation in patients with metastatic melanoma. Clin Cancer Res 2009;15(6):1931–39. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1980.
- Mantovani A., Marchesi F., Malesci A. et al. Tumor-Associated Macrophages as Treatment Targets in Oncology. Nat Rev Clin Oncol 2017;14(7):399–416. DOI: 10.1038/nrclinonc.2016.217.
- Gupta S., Jain A., Syed Sh.N. et al. IL-6 augments IL-4-induced polarization of primary human macrophages through synergy of STAT3, STAT6 and BATF transcription factors. Oncoimmunology 2018;7(10):e1494110. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1494110.
- Binnemars-Postma K., Bansal R., Storm G., Prakash J. Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer. FASEB J 2018;32(2):969–78. DOI: 10.1096/fj.201700629R.
- Shirota H., Klinman D.M., Ito S. et al. IL4 from T Follicular Helper Cells Downregulates Antitumor Immunity. Cancer Immunol Res 2016;5(1):61–71. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-16-0113.
- Taniguchi K., Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. Semin Immunol 2014;26(1):54–74. DOI: 10.1016/j.smim.2014.01.001.
- Bonde A.-K., Tischler V., Kumar S. et al. Intratumoral macrophages contribute to epithelial-mesenchymal transition in solid tumors. BMC Cancer 2012;12:35. DOI: 10.1186/1471-2407-12-35.
- Kitamura T., Qian B.-Zh., Pollard J.W. Immune cell promotion of metastasis. Nat Rev Immunol 2015;15(2):73–86. DOI:10.1038/nri3789.
- Terlizzi M., Popolo A., Pinto A., Sorrentino R. Plasmacytoid dendritic cells contribute to doxorubicin-induced tumor arrest in a mouse model of pulmonary metastasis. J Immunother 2014;37(4):214–24. DOI: 10.1097/CJI.000000000000026.

Вклад авторов

Р.В. Журиков: написание текста статьи, получение экспериментальных данных, анализ данных и их интерпретация;
Л.П. Коваленко: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, предоставление материалов исследования, редактирование статьи;
С.В. Никитин: получение данных для анализа, предоставление материалов исследования, редактирование статьи;
А.Д. Дурнев: анализ данных, редактирование статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Authors contributions

R.V. Zhurikov: article preparation, data collection, data analysis and interpretation;
L.P. Kovalenko: concept and design, data collection, provision of study material, article editing;
S.V. Nikitin: provision of study material, data collection, article editing;
A.D. Durnev: data analysis, approval of the final version of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Р.В. Журиков / R.V. Zhurikov: <https://orcid.org/0000-0003-1084-690X>
Л.П. Коваленко / L.P. Kovalenko: <https://orcid.org/0000-0002-2083-0832>
С.В. Никитин / S.V. Nikitin: <https://orcid.org/0000-0001-7630-7816>
А.Д. Дурнев / A.D. Durnev: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена за счет средств государственного бюджета Российской Федерации в рамках госзадания № 0521-2019-0004.

Financing. The study was carried out with the financial support of Russian Federation's state budget in the framework of the experimental scientific development No 0521-2019-0004.

Соблюдение правил биоэтики. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях) и правилами работы с животными, утвержденными этической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова».

Compliance with principles of bioethics. All animal experiments were conducted in compliance with international rules (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the European Union Committee dated September 22, 2010, for the protection of animals used for scientific purposes) and rules for working with animals that were approved by the V.V. Zakusov institute of pharmacology ethics commission.

Статья поступила: 04.03.2021. Принята к публикации: 03.09.2021.

Article submitted: 04.03.2021. Accepted for publication: 03.09.2021.