

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

2022 • ТОМ 21 • № 4

Российский Биотерапевтический Журнал



**Russian Journal
of Biotherapy**

4

ТОМ 21
2022

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

4^{ТОМ 21}
'22

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

Адрес учредителя и редакции:
115522, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 2.

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

E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

Адрес издательства:
115478, Москва, Каширское
шоссе, 24, стр. 15, НИИ
канцерогенеза, 3-й этаж.
Тел./факс: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Редактор Е.М. Печерская
Корректор Е.С. Самойлова

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.
2022. Том 21. № 4. 1–88.

© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2022
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, д.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., профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», президент АНО «Национальный Альянс специалистов по опухолям наружных локализаций» (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

Барышников 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., 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 гемопоза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). Journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

Peer-reviewed theoretical and SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

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

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

FOUNDED IN 2002 by Professor A.Yu. Baryshnikov

4^{VOL. 21}
'22

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 115522.

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
Proofreader E.S. Samoylova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

The journal is registered

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

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

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

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2022. Volume 21. No 4. 1–88.

© PH "ABV-Press", 2022
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, DSc, 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, Professor of Department of Oncology and Radiology of the Institute of Medicine, RUDN University, President of the National Alliance of Specialists in Tumors of External Localization (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, Director of Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia (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

- М.В. Дмитриева, М.А. Барышникова, О.Л. Орлова, В.С. Косоруков*
Технологические аспекты создания неопептидных вакцин10
- Е.М. Трещалина, М.А. Барышникова, Е.В. Неборак, В.С. Косоруков*
Пептидные противоопухолевые вакцины, направленные на HER2/неу22

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А.В. Лобов, Е.А. Погодина, П.И. Иванова, Н.В. Угарова, Е.В. Сорокина, И.Ж. Шубина*
Интерфероновый статус человека. Проблемы стандартизации исследования и установления референсных значений30
- Д.С. Кутилин, М.А. Гусарева, Н.Г. Кошелева*
Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки41
- С.В. Чулкова, Е.Н. Шолохова, И.В. Поддубная, И.С. Стилиди, Н.Н. Тупицын*
Экспрессия мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) при молекулярных подтипах рака молочной железы50
- Л. Або Кура, Е.А. Морозова, В.С. Коваль, В.В. Куликова, Т.С. Спирина, Е.А. Демидова, Т.В. Демидкина, В.С. Покровский*
Цитотоксические и противоопухолевые свойства конъюгата метионин γ -лиаза-дайдзеин в комбинации с сульфоксидами S-алк(ен)ил-L-цистеина62
- Д.С. Воробьев, Е.С. Петухова, Ю.В. Волох, О.М. Афанасьева, М.М. Токарская, А.Ю. Леонова, О.В. Жигунова, И.Б. Семенова, Н.Ф. Гаврилова, И.В. Яковлева, Н.Е. Ястребова*
Серотипнезависимая протективная активность рекомбинантной формы пневмолизина в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипов 4 и 6В71
- И.Б. Меркулова, И.С. Голубева, Д.А. Хоченков, Т.В. Абрамова, Н.П. Ермакова, Л.В. Эктова*
Влияние ЛХС-1269 на морфологию и ангиогенез карциномы легкого Льюис76

REVIEWS

<i>Maria V. Dmitrieva, Maria A. Baryshnikova, Olga L. Orlova, Vyacheslav S. Kosorukov</i> Technological aspects of creating neopeptide vaccines	10
<i>Helen M. Treshalina, Maria A. Baryshnikova, Ekaterina V. Neborak, Vyacheslav S. Kosorukov</i> Peptide antitumor vaccines targeting HER2/neu	22

ORIGINAL REPORTS

<i>Anton V. Lobov, Ekaterina A. Pogodina, Polina I. Ivanova, Natalia V. Ugarova, Ekaterina V. Sorokina, Irina Zh. Shubina</i> Human interferon status. Standardization of the tests and establishing reference values	30
<i>Denis S. Kutilin, Marina A. Gusareva, Natalia G. Kosheleva</i> Genetic locus copy number variation level and minimally invasive assessment of radiation therapy efficiency in rectal cancer patients	41
<i>Svetlana V. Chulkova, Elena N. Sholokhova, Irina V. Poddubnaya, Ivan S. Stylidi, Nikolay N. Tupitsyn</i> Expression of monomorphic HLA-determinants, transferrin receptor 1 (TfR1) in molecular subtypes of breast cancer	50
<i>Louay Abo Qoura, Elena A. Morozova, Vasily S. Koval, Vitalia V. Kulikova, Tatiana S. Spirina, Elena A. Demidova, Tatyana V. Demidkina, Vadim S. Pokrovsky</i> Cytotoxic and antitumor properties of methionine γ-lyase conjugate in combination with S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides	62
<i>Denis S. Vorobyev, Ekaterina S. Petukhova, Yury V. Volokh, Olga M. Afanasyeva, Marina M. Tokarskaya, Anna Yu. Leonova, Olga V. Zhigunova, Irina B. Semenova, Natalya F. Gavrilova, Irina V. Yakovleva, Natalia E. Yastrebova</i> Serotype-independent protective activity of recombinant pneumolysin in a model of systemic infection caused by <i>Streptococcus pneumoniae</i> serotypes 4 and 6B	71
<i>Irina B. Merkulova, Irina S. Golubeva, Dmitriy A. Khochenkov, Tatiana V. Abramova, Nadezhda P. Ermakova, Lidia V. Ektova</i> Effect of LHS-1269 on morphology and angiogenesis of Lewis lung carcinoma	76

Технологические аспекты создания неопептидных вакцин

М.В. Дмитриева, М.А. Барышникова, О.Л. Орлова, В.С. Косоруков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24

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

Персонализированные неоантигенные вакцины представляют собой группу индивидуально разработанных противоопухолевых вакцин, которые усиливают собственные антигенспецифические иммунные ответы пациентов. К ним относятся вакцины на основе дендритных клеток, ДНК, мРНК и синтетических пептидов. В результате анализа 98 клинических исследований неоантигенных вакцин из базы данных ClinicalTrials.gov установлено, что пептидные вакцины являются одними из самых исследуемых противораковых вакцин – на них приходится около 50 % клинических испытаний. Они состоят, как правило, из смеси длинных или коротких пептидов, растворенных в зависимости от их свойств в соответствующем растворителе, и адъюванта, который стабилизирует и повышает их эффективность. Наиболее применяемыми иммуноадъювантами при составлении композиции неопептидной вакцины являются агонисты toll-подобных рецепторов (poly-ICLC) и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор. Создание неоантигенных вакцин, в отличие от других типов вакцин, сопряжено с рядом проблем. Процесс должен охватывать и подтверждать различные этапы, связанные с разработкой, производством и введением вакцин, чтобы максимизировать их эффективность и безопасность. В технологии производства пептидных вакцин можно выделить 3 основных этапа: 1) скрининг и идентификация неоэпитопов с использованием подходов компьютерного прогнозирования, коиммунопреципитации, масс-спектрометрии и цитотоксических экспериментов; 2) синтез пептидов методами стандартной твердофазной синтетической пептидной химии; 3) собственно получение вакцинного препарата, пригодного для хранения, транспортировки и введения пациенту. С учетом специфичности препарата производственный процесс должен осуществляться строго в соответствии со стандартами Надлежащей производственной практики (Good Manufacturing Practice) с обязательным контролем качества промежуточных и готовых продуктов.

Ключевые слова: неопептиды, персонализированная вакцина, технология, адъювант

Для цитирования: Дмитриева М.В., Барышникова М.А., Орлова О.Л., Косоруков В.С. Технологические аспекты создания неопептидных вакцин. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):10–21. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-10-21

Technological aspects of creating neopeptide vaccines

Maria V. Dmitrieva, Maria A. Baryshnikova, Olga L. Orlova, Vyacheslav S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe shosse, Moscow 115522, Russia

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

Personalized neoantigen vaccines are a group of individually designed cancer vaccines that enhance patients' own antigen-specific immune responses. These include vaccines based on dendritic cells, DNA, mRNA and synthetic peptides. An analysis of 98 clinical trials of neoantigenic vaccines from the ClinicalTrials.gov database found that peptide vaccines are one of the most popular cancer vaccines, accounting for about 50 % of clinical trials. They usually consist of a mixture of long or short peptides, dissolved depending on their properties in an appropriate solvent, and an adjuvant that stabilizes and increases their effectiveness. The most used immunoadjuvants in the formulation of neopeptide vaccines are Toll-like receptor agonists (poly-ICLC) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. The development of neoantigenic vaccines presents a number of distinctive challenges compared to other types of vaccines. The process should cover and validate the various steps in the development, production and administration processes in order to maximize the efficacy and safety of vaccines. In the technology

for the production of peptide vaccines, 3 main stages can be distinguished: 1) screening and identification of neopeptides using the approaches of computer prediction, co-immunoprecipitation, mass spectrometry and cytotoxic experiments; 2) synthesis of peptides by methods of standard solid-phase synthetic peptide chemistry; 3) actually obtaining a vaccine preparation suitable for storage, transportation and administration to the patient. Taking into account the specificity of the drug, the manufacturing process must be carried out strictly according to the Good Manufacturing Practice standard with mandatory quality control of intermediate and finished products.

Keywords: neopeptides, personalized vaccine, technology, adjuvant

For citation: Dmitrieva M.V., Baryshnikova M.A., Orlova O.L., Kosorukov V.S. Technological aspects of creating neopeptide vaccines. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):10–21. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-10-21

Введение

Вакцины традиционно использовались для профилактики инфекционных заболеваний, однако способность таких агентов вызывать и усиливать антигенспецифические иммунные ответы уже давно признана потенциально ценным средством для лечения рака. Ранние стратегии терапевтической вакцинации, ориентированные на собственные антигены (АГ), аномально экспрессируемые или сверхэкспрессируемые в опухолях и называемые ассоциированными с опухолью АГ (tumour-associated antigens, ТАА), были в значительной степени безуспешными в генерировании клинически эффективных противоопухолевых иммунных ответов, вероятно, из-за того, что ТАА-специфические Т-клетки подвержены центральной и/или периферической толерантности. Также ТАА могут в некоторой степени экспрессироваться в незлокачественных тканях, что повышает риск аутоиммунной токсичности, вызванной вакциной. Мутации, происходящие в опухолевых клетках, могут генерировать новые эпитопы собственных АГ, которые называются неоэпитопами или неоантигенами (НАГ). Вакцины, основанные на НАГ, а не на традиционно используемых ТАА, имеют ряд преимуществ. Во-первых, НАГ экспрессируются исключительно опухолевыми клетками и, следовательно, могут вызывать действительно специфичные для опухоли Т-клеточные ответы, тем самым предотвращая «нецелевое» повреждение здоровых тканей. Во-вторых, НАГ представляют собой эпитопы *de novo*, полученные из соматических мутаций, что дает возможность обойти центральную толерантность Т-клеток к собственным эпитопам и, таким образом, индуцировать иммунные реакции на опухоли. Соответственно, персонализированные вакцины на основе НАГ дают возможность усилить специфичные противоопухолевые иммунные реакции и добавить дополнительное средство в инструментарий иммунотерапии. Кроме того, потенциал этих усиливаемых вакциной НАГ-специфических Т-клеточных ответов сохраняется и обеспечивать иммунологическую память после лечения представляет возможность долгосрочной защиты от рецидива заболевания [1, 2].

Персонализированные неоантигенные вакцины (НАВ) включают вакцины на основе дендритных клеток (ДК), ДНК, мРНК и синтетических пептидов [3].

Неопептидные вакцины являются одними из самых исследуемых противораковых вакцин — на них приходится около 50 % клинических испытаний. Они состоят из пептида или смеси связанных либо свободных пептидов в сочетании с адъювантами, которые стабилизируют и повышают их эффективность. Конкретный пептид, наиболее подходящий для разработки противораковой вакцины, зависит от конкретного типа рака и иммунологических характеристик пациента. Несмотря на это, пептидные вакцины часто используются из-за их безопасности, стабильности и простоты в производстве в больших количествах. Кроме того, поскольку большинство противоопухолевых препаратов представляют собой макромолекулы, а проникновение макромолекул в солидные опухоли может быть затруднено, еще одним преимуществом пептидных вакцин является их структурная характеристика [4–6].

Клинические испытания персонифицированных НАВ на основе пептидов в настоящее время проводятся при множественных типах опухолей с использованием различных адъювантов. В таблице представлены характеристики некоторых пептидных вакцин, находящихся в процессе клинических исследований.

Основные компоненты неопептидных вакцин

Неопептиды происходят из белков, экспрессируемых в опухолевой клетке. Большое значение имеет качество используемого пептида. Важен не только выбор подходящего пептида, но и длина этой молекулы, которая должна быть оптимальной для индукции иммунного ответа. При использовании пептидных вакцин важно выбрать короткую иммуногенную последовательность (от 8 до 10 аминокислот) или длинную последовательность (15–30 аминокислот), последняя из которых требует дополнительной стадии обработки для их расщепления на иммуногенные пептиды. Короткие пептиды связываются

Персонализированные пептидные вакцины в клинических исследованиях

Personalized peptide vaccines in clinical trials

Наименование (шифр) вакцины Name (code) of the vaccine	Состав вакцины Composition of the vaccine			Путь введения Route of administration
	Пептиды Peptides	Адъювант Adjuvant	Вспомогательные вещества Auxiliary substances	
NeoPepVac/ EVX-01/ EVAX-01- CAF09b/ NPV-ds001- CAF09b	5–10 линейных пептидов, содержащих природные L-аминокислоты (NPV-db001). В ампуле 0,12 мл NPV-db001 5–10 linear peptides containing natural L-amino acids (NPV-db001). In an ampoule of 0.12 ml NPV-db001	CAF09b 1 мл CAF09b 1 ml	100 % ДМСО, 1,08 мл Трис-буфера 100 % DMSO, 1.08 ml Tris buffer	Первые 3 вакцины – в/в, последующие 3 – в/м The first 3 vaccines are i. v., the next 3 are i. m.
NeoVax	До 20 длинных пептидов, разделенных на 4 пула (по 3–5 пептидов на пул) с конечной дозой 0,3 мг каждого пептида на вакцину (NeoAntigen) Up to 20 long peptides divided into 4 pools (3–5 peptides per pool) with a final dose of 0.3 mg of each peptide per vaccine (NeoAntigen)	poly-ICLC 0,5 мг на каждый пул poly-ICLC 0.5 mg per pool	4 % раствор ДМСО в изотонической декстрозе 4 % DMSO solution in isotonic dextrose	в/м i. m.
				п/к s. c.
				п/к s. c.
				п/к s. c.
				п/к s. c.
iNeo-Vac-P01	5–20 пептидов различной длины от 15 до 35 аминокислот, пептиды сгруппированы в 2–4 пула с конечной дозой 0,1 или 0,3 мг каждого пептида на вакцину 5–20 peptides of various lengths from 15 to 35 amino acids, peptides are grouped into 2–4 pools with a final dose of 0.1 or 0.3 mg of each peptide per vaccine	GM-CSF 0,04 мг на каждый пул GM-CSF 0.04 mg per pool	—	п/к s. c.
			—	п/к s. c.
			—	п/к s. c.
PNeoVCA	20 пептидов 20 peptides	GM-CSF	—	п/к s. c.
HJ-N-001	Данные о составе отсутствуют. Вводят в дозе 0,2 мг каждого пептида на вакцину There is no data on the composition. Administered at a dose of 0.2 mg of each peptide per vaccine			п/к s. c.

Дополнительная терапия Additional therapy	Тип и локализация опухоли Type and localization of the tumor	Фаза и период исследования Research phase and period	Идентификатор ClinicalTrials.gov Identifier ClinicalTrials.gov
—	Распространенные солидные опухоли: неоперабельная или метастатическая меланома, немелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря Advanced solid tumors: inoperable or metastatic melanoma, small cell lung cancer, bladder cancer	I–IIa 01.2019–12.2022	NCT03715985
Пембролизумаб Pembrolizumab	Меланома III и IV стадии Stage III and IV melanoma	II 06.2022–07.2025	NCT05309421
—	Меланома Melanoma	I 01.2014–06.2018	NCT01970358
Ипилимумаб Ipilimumab	Рак почки Kidney cancer	I 03.2019–09.2024	NCT02950766
Циклофосфамид, пембролизумаб Cyclophosphamide, pembrolizumab	Лимфоцитарный лейкоз Lymphocytic leukemia	I 08.2021–03.2025	NCT03219450
Ритуксимаб, пембролизумаб Rituximab, pembrolizumab	Фолликулярная лимфома Follicular lymphoma	I 03.2022–03.2026	NCT03361852
Ниволумаб Nivolumab	Рак яичников Ovarian cancer	I 11.2020–04.2029	NCT04024878
Лучевая терапия, пембролизумаб, темозоломид Radiation therapy, pembrolizumab, temozolomide	Глиобластома Glioblastoma	I 11.2014–01.2026	NCT02287428
Ниволумаб, ипилимумаб Nivolumab, ipilimumab	Прогрессирующая меланома Progressive melanoma	Ib 11.2020–09.2028	NCT03929029
—	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	I 10.2017–04.2021 03.2021–03.2025	NCT03645148 NCT04810910
—	Рак пищевода Esophageal cancer	I 12.2021–12.2025	NCT05307835
—	Часто встречающиеся солидные опухоли Common solid tumors	I 02.2018–12.2022	NCT03662815
Циклофосфамид, пембролизумаб Cyclophosphamide, pembrolizumab	Солидные опухоли на поздних стадиях Solid tumors in the late stages	I 03.2022–02.2025	NCT05269381
—	Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	I 05.2020–12.2022	NCT04397926

Наименование (шифр) вакцины Name (code) of the vaccine	Состав вакцины Composition of the vaccine			Путь введения Route of administration
	Пептиды Peptides	Адъювант Adjuvant	Вспомогательные вещества Auxiliary substances	
PGV001	10 длинных пептидов в форме лиофилизата с дозой 0,1 мг на пептид и 1 противостолбнячный хелперный пептид с дозой 0,1 мг 10 long peptides in the form of lyophilizate with a dose of 0.1 mg per peptide and 1 tetanus helper peptide with a dose of 0.1 mg	poly-ICLC 1,4 мг poly-ICLC 1.4 mg	Физиологический раствор (0,19 мл) Saline solution (0.19 ml)	в/к i. d.
PNV21-001	Данные отсутствуют No data available	poly-ICLC	—	в/м i. m.
PANDA-VAC (США) PANDA-VAC (USA)	6 пептидов в дозе 0,3 мг на пептид 6 peptides at a dose of 0.3 mg per peptide	poly-ICLC 0,5 мг poly-ICLC 0.5 mg	<5 % ДМСО в изотонической декстрозе общим объемом до 750 мкл <5 % DMSO in isotonic dextrose, with a total volume of up to 750 µl	п/к посредством 3 инъекций по 250 мкл s. c. by means of 3 injections of 250 µl
Мутантная KRAS-на-целенная вакцина Mutant KRAS-targeted vaccine	Мутантный пептид KRAS длиной от 13 до 17 аминокислот, 1,8 мг KRAS mutant peptide with a length of 13 to 17 amino acids, 1.8 mg	poly-ICLC 0,5 мг poly-ICLC 0.5 mg	—	п/к s. c.
Neo-Vac-Mn	4 × 3 мг всех пептидов 4 × 3 mg of all peptides	rhGM-CSF 3 мкг/кг + имиквимод 5 % крем rhGM-CSF 3 mcg/kg + imiquimod 5 % cream	—	п/к s. c.
GEN-009	От 4 до 18 синтетических длинных пептидов From 4 to 18 synthetic long peptides	poly-ICLC	—	п/к s. c.
FRAME-001 (Нидерланды) FRAME-001 (Netherlands)	24 пептида, разделенные на 4 лиофилизированные смеси, каждая из которых содержит до 6 пептидов с конечной дозой 0,1 мг пептида на вакцину 24 peptides divided into 4 lyophilized mixtures, each of which contains up to 6 peptides with a final dose of 0.1 mg of peptide per vaccine	Монтанид, в соотношении пептидная смесь: адъювант 1:1 Montanide, in the ratio of peptide mixture: adjuvant 1:1	Фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS) Phosphate buffered saline solution (PBS)	п/к s. c.

Примечание. в/в — внутривенно; в/к — внутрикожно; в/м — внутримышечно; п/к — подкожно; ДМСО — диметилсульфоксид; GM-CSF — гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; rhGM-CSF — рекомбинантный гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.

Окончание таблицы
The end of table

Дополнительная терапия Additional therapy	Тип и локализация опухоли Type and localization of the tumor	Фаза и период исследования Research phase and period	Идентификатор ClinicalTrials.gov Identifier ClinicalTrials.gov
Атезолизумаб Atezolizumab	Уротелиальный рак Urothelial cancer	I 05.2019–10.2021	NCT03359239
Ниволумаб Nivolumab	Меланома, рак молочной железы Melanoma, breast cancer	I 06.2022–11.2024	NCT05098210
Пембролизумаб Pembrolizumab	Плоскоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак головы и шеи Squamous cell lung cancer, squamous cell head and neck cancer	I 10.2022–06.2033	NCT04266730
—	Рак поджелудочной железы Pancreatic cancer	I 04.2022–05.2026	NCT05013216
Торипалимаб Toripalimab	Меланома Melanoma	I 04.2020–09.2022	NCT04072900
Ниволумаб, Пембролизумаб Nivolumab, Pembrolizumab	Сóлидные опухоли Solid tumors	I–II 08.2018–02.2022	NCT03633110
Пембролизумаб Pembrolizumab	Немелкоклеточный рак легкого Non-small cell lung cancer	II 01.2022–07.2024	NCT04998474

Note. i. v. – intravenously, i. d. – intradermally, i. m. – intramuscularly, s. c. – subcutaneously; DMSO – dimethyl sulfoxide; GM-CSF – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; rhGM-CSF – recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.

непосредственно с поверхностными молекулами главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) без процессинга в антигенпрезентирующих клетках (АПК), и подавляющее большинство введенных коротких пептидов элиминируется. В отличие от коротких, длинные пептиды подвергаются интернализации, процессингу и МНС-ограниченной презентации профессиональными АПК. Кроме того, длинные пептиды могут преодолевать иммунную толерантность и успешно индуцировать ответы CD4⁺- и CD8⁺-Т-клеток. После инъекций вакцин на основе пептидов пациентам подкожным путем эти пептиды поглощаются АПК вокруг мест инъекции [3, 7, 8].

Наряду с длиной молекулы важной характеристикой пептида является растворимость, что определяет его перспективы при составлении композиции и технологические параметры получения вакцины. Например, при производстве HAV iNeo-Vac-P01 нерастворимые в воде пептиды исключают из окончательной рецептуры, что обусловлено нежелательностью использования органического растворителя, в частности диметилсульфоксида (ДМСО), в клинической практике [9].

В 2019 г. была разработана доступная через интернет база данных NeoPeptide, которая содержит большинство важных характеристик НАГ, таких как сайт мутации, последовательность субъединиц, ограничение МНС, полученных из опубликованной литературы и других иммунологических ресурсов. NeoPeptide также содержит ссылки на ресурсы для дальнейшего описания свойств НАГ и регулярно пополняется новыми идентифицированными АГ и опубликованными по ним данными. База данных позволяет исследователям идентифицировать НАГ при различных видах рака и ускоряет поиск подходящих кандидатов на противоопухолевые вакцины [10].

На сегодняшний день пептидные вакцины показали ограниченную эффективность в клинических испытаниях, поскольку внутриклеточный процессинг пептидных молекул отрицательно влияет на антигенные свойства. Кроме того, иммуносупрессивное микроокружение опухоли снижает эффективность вакцин. Решением проблемы ограниченной эффективности может быть одновременное применение нескольких видов терапии с разными целями, например сочетание пептидных вакцин с адъювантами, цитостатиками и ингибиторами иммунных контрольных точек [3].

Адъюванты. В основе действия противораковых вакцин лежит наличие активированных ДК, способных презентовать АГ. Известно, что при злокачественном заболевании иммуносупрессия приводит к угнетению функции ДК. Поэтому противоопухолевые вакцины, особенно пептидные, часто комбинируют с иммуноадъювантами, которые в основном

используются для разблокирования функции ДК. После такой стимуляции ДК экспрессируют на своей поверхности не только вакцинные АГ, но и костимулирующие молекулы, которые необходимы для активации Т-клеток, и мигрируют в лимфатические узлы. Выбор адъюванта имеет решающее значение для эффективности вакцины, и нет единого мнения об оптимальном адъюванте для терапевтической вакцины. Для усиления иммунного ответа на пептидные вакцины используют такие адъюванты, как, например, GM-CSF или агонисты toll-подобных рецепторов (TLR). TLR экспрессируются на поверхности различных клеток и могут распознавать молекулярные паттерны патогенов или чужеродных веществ. Агонисты TLR являются адъювантами, которые стимулируют ДК, как было показано в клинических испытаниях [3, 6, 11].

Poly-ICLC (Hiltonol®, Oncovir Inc.) представляет собой синтетический имитатор двухцепочечной РНК, стабилизированный поли-L-лизин и карбоксиметилцеллюлозой, состоящий из гомополимера полиинозиновой кислоты, отожденного до гомополимера полицитидиловой кислоты, что приводит к стабильной двойной спирали. Poly-ICLC связывается с эндосомальным TLR3, цитоплазматическим RIG-I (рецептором ретиноевой кислоты, индуцируемым геном I) и MDA5 (ассоциированным с дифференцировкой меланомы геном 5). Таким образом, poly-ICLC имитируют вирусную инфекцию, вызывая секрецию интерферона I типа и провоспалительных цитокинов, которые играют важную роль в индукции иммунного ответа. Он также может способствовать экспансии Т-клеток и усиливать инфильтрацию Т-клеток, что делает его мощным адъювантом для пептидных противораковых вакцин [7, 12].

GM-CSF (сарграмостим) является вторым наиболее распространенным адъювантом, используемым в клинических испытаниях HAV. GM-CSF представляет собой 127-аминокислотный гликопротеин, первоначально выделенный из среды, кондиционированной факторами, секретируемыми пневмоцитами мышей, которым вводили липополисахарид. Обозначение GM-CSF обусловлено его способностью стимулировать пролиферацию клеток костного мозга мыши *in vitro* и генерировать колонии гранулоцитов и макрофагов *ex vivo*. GM-CSF может продуцироваться макрофагами, фибробластами, активированными Т-лимфоцитами, NK-, тучными, эндотелиальными клетками и некоторыми злокачественными клетками. Модулируя функции клеток, обеспечивающих врожденный иммунный ответ, который необходим для активации адаптивного иммунного ответа, GM-CSF глобально влияет на систему иммунного надзора человека при патологических состояниях. Способность GM-CSF стимулировать выработку, созревание

и активацию нейтрофилов, макрофагов и ДК во многом способствует его противоопухолевым эффектам. GM-CSF используется в качестве адъювантной терапии для активации клеточных и гуморальных противоопухолевых иммунных ответов в клинике [13, 14].

CAF[®]09b — новый вакцинный липосомальный адъювант, разработанный в Statens Serum Institut (Дания), на основе катионного поверхностно-активного вещества диметилдиоктадециламмония в сочетании с агонистом лектина С-типа мономиколоилглицерином и агонистом TLR3 poly-ICLC. CAF[®]09b на доклинических моделях продемонстрировал превосходную способность индуцировать ответы CD8⁺-Т-клеток при внутрибрюшинном введении. В идеале адъювант CAF[®]09b способствует активации АПК и усилению поглощения ими пептидов, вызывая перекрестную презентацию АГ и провоспалительные сигналы, тем самым активируя вакциносpezifические CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки [15].

Z. Jing и соавт. [16] разработали безопасную систему доставки НАВ, основанную на частицах β-1,3-глюкана (GP-Neoantigen), полученных из *Saccharomyces cerevisiae*, которая может стимулировать организм к выработке антигенспецифического CD8⁺-Т-клеточного иммунного ответа против различных неопептидов и, таким образом, использоваться для эффективного лечения опухолей. По сравнению с другими синтетическими системами наночастиц система доставки GP-Neoantigen относительно проста в приготовлении и стабильна, имеет однородный размер частиц и высокую специфичность нацеливания на АПК, включая ДК и макрофаги. GP-Neoantigen активировала иммунный ответ на животных моделях и эффективно ингибировала рост различных сингенных опухолей у мышей, таких как лимфома EG7-OVA, меланома B16F10, рак молочной железы 4T1 и рак толстой кишки CT26. Комбинация с poly-ICLC дополнительно усиливала противоопухолевый ответ на GP-Neoantigen, приводя к полной элиминации опухоли на нескольких моделях мышей и вызывая отторжение повторно перевитых опухолей в течение долгого времени.

Одним из используемых адъювантов для противораковых вакцин является **монтанид** ISA 51 VG. Монтанид представляет собой эмульгатор, состоящий из смеси минерального масла и поверхностно-активных веществ. Для получения стабильной эмульсии, пригодной для подкожной инъекции, ее следует смешать в соотношении 1:1 с водной фазой, содержащей АГ. Исследования показывают, что комбинация вакцинных АГ в сочетании с монтанидом усиливает врожденный и адаптивный иммунный ответ, что увеличивает терапевтический потенциал вакцины. Считается, что усиленный иммунный ответ является результатом воспаления в месте инъекции, образо-

вания депо АГ, привлечения профессиональных АПК и захвата лимфоцитов [17, 18].

Имиквимод (Aldara[™], 3M Pharmaceuticals, США) — модификатор иммунного ответа, доступный в виде 5 % крема, применяемого в дерматологии, особенно при кожных злокачественных новообразованиях. По химической структуре представляет собой синтетический амин имидазохинолона — 1-(2-метилпропил)-1Н-имидазо [4,5-с] хинолин-4-амин. Имиквимод действует на врожденный и адаптивный иммунный ответ как прямо, так и опосредованно. Прямое действие заключается в связывании с TLR7 и TLR8 макрофагов, моноцитов и ДК и индукции апоптоза. Непрямое действие происходит за счет индукции высвобождения иммуномодулирующих цитокинов. Эффективность имиквимода также объясняется тем, что он действует на клетки Лангерганса, стимулируя их способность представлять АГ и усиливая их миграцию в дренирующие лимфатические узлы, где АГ представляются Т-клеткам, тем самым активируя адаптивный иммунный ответ организма. Благодаря иммуностимулирующим свойствам имиквимод и его производное резиквимод рассматриваются в качестве перспективных дополнительных вакцинных адъювантов, наносимых на место инъекции сразу после введения, при лечении меланомы кожи для передачи костимулирующих сигналов через TLR7 и активации местных АПК [19–22].

Разработка и производство неопептидных вакцин

Создание персонализированных противораковых вакцин сопряжено с рядом проблем, в отличие от других типов вакцин. Важен строгий контроль различных этапов разработки, производства и введения, чтобы обеспечить эффективность и безопасность персонализированных вакцин [23].

Хотя первоначальные клинические испытания НАВ демонстрируют многообещающие результаты, методы лечения, направленные против НАГ, имеют некоторые сложности, которые необходимо устранить для успешного применения НАВ в будущем.

- **Сроки производства.** Поскольку опухолевые мутации редко бывают общими даже для двух опухолей, а иммунная система пациентов уникальна, НАВ должны быть специфичными для пациента и производиться специально для каждого пациента. В целом исследования НАВ, опубликованные до настоящего момента, проводились с использованием протоколов и технологий вакцин со сроками производства от 12 до 24 нед. Это позволяет добавить вакцинацию только спустя долгое время после начала лечения ингибиторами иммунных контрольных точек, тогда как более раннее начало одновременного лечения ингибиторами иммунных контрольных точек

и вакциной, скорее всего, приведет к более высокой вероятности синергизма лечения. Следовательно, сроки производства должны быть сокращены [15].

- **Идентификация неоэпитопов.** В зависимости от конкретной опухоли и присущей ей скорости мутаций количество потенциальных неоэпитопов варьирует от нескольких сотен до тысяч. Такое количество идентифицированных неопептидов невозможно использовать в инъекциях пациентам, поэтому идентификация наиболее эффективных неоэпитопов имеет решающее значение для клинического эффекта [15].
- **Индукция неоэпитопспецифических CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток пациента.** Необходимо, чтобы вакцинация обеспечивала наиболее сильный ответ на идентифицированные неоэпитопы. Все типы НАВ демонстрируют индукцию неоэпитопных Т-клеток, однако не всегда сопровождающуюся клиническим эффектом [15].

Таким образом, практические аспекты производства персонализированных вакцин требуют постоянной оптимизации. Вопрос рутинной выполнимости и ускоренного темпа особенно актуален из-за метастазирования опухоли, когда время имеет существенное значение [24, 25].

В процессе производства пептидных НАВ можно выделить 3 основных технологических этапа: 1) скрининг и идентификация неоэпитопов; 2) синтез пептидов; 3) растворение пептидов, стерилизация, дозирование и маркировка продукта [1].

Разработка индивидуальной противоопухолевой вакцины начинается с идентификации опухолеспецифичных несинонимичных вариантов в генах, кодирующих белок, путем сравнения данных NGS-секвенирования (next generation sequencing) опухоли и здоровой ткани пациента. Многокомпонентные вычислительные конвейеры оценивают мутантные пептидные области на предмет связывания с аллелями человеческого лейкоцитарного антигена (human leukocyte antigen, HLA) пациента и оценивают дополнительные характеристики этой мутированной области (например, уровень экспрессии транскрипта, клональность и непохожесть на себя), которые могут индуцировать клинически значимые противоопухолевые Т-клеточные ответы. Полученные данные служат основой для выбора индивидуального набора кандидатов на НАГ для производства вакцины уникального состава для каждого пациента [26].

Скрининг и идентификация НАГ являются наиболее сложными процессами неоантигенной иммунотерапии. Для этого в настоящее время существует 3 классических метода.

Первый метод — предсказание НАГ с помощью компьютерного алгоритма. Для НАГ, индуцирован-

ных мутациями, точное предсказание требует большого количества данных и множества расчетов, которые в основном включают следующие аспекты: 1) точная идентификация всех видов сайтов мутаций из миллиардов оснований; 2) расчет частоты и уровня экспрессии мутационных сайтов; 3) точная идентификация аллелей пациентов из тысяч аллелей HLA; 4) оценка иммуногенности антигенных пептидов, продуцируемых каждым сайтом мутации, с помощью алгоритмов биоинформатики и искусственного интеллекта. Однако точный прогноз затруднен. Было разработано большое количество инструментов и алгоритмов для прогнозирования сродства между антигенными пептидами и молекулами HLA, но их точность по-прежнему является основным узким местом всех видов методов. M.S. Khodadoust и соавт. [27] с помощью этого подхода предсказали 108 пептидов-кандидатов у 8 пациентов с опухолями. После проверочных экспериментов с ответами Т-клеток тетрамера пептид-HLA на предсказанные НАГ было обнаружено, что ни одно из предсказаний не оправдалось. Поэтому необходимо повысить точность компьютерного предсказания НАГ.

Второй метод представляет собой комбинацию коиммунопреципитации и масс-спектрометрии для скрининга и идентификации НАГ. Существуют экспериментальные данные, подтверждающие эту комбинацию на уровне пептидов, и ее точность выше, чем у компьютерных алгоритмов. Комбинация может быть использована для создания базы данных высокоаффинных пептидов и наиболее часто встречаемых HLA в популяциях человека. Ограничением этого метода является сложность экспериментов с длительным периодом его проведения.

Два представленных выше метода в основном зависят от сродства между пептидами-кандидатами и молекулами HLA. Однако не все пептиды-кандидаты с высокой аффинностью могут вызывать сильный иммунный ответ. Следовательно, необходимо проводить функциональные эксперименты, в которых НАГ проверяют и идентифицируют на основе их восприимчивости к уничтожению специфическими Т-клетками.

Третий метод, таким образом, заключается в создании библиотеки и проведении цитотоксических экспериментов для скрининга и идентификации НАГ. Этот метод является лучшим в настоящее время [28].

При выборе вакцинных пептидов используют следующие инструменты:

- Vaxrank — общий инструмент выбора вакцины с логикой ранжирования;
- TruNeo — интегрированный конвейер для идентификации и ранжирования НАГ, полученных в результате точечных мутаций, вставок, делеций и слитых генов, который учитывает множество

факторов, включая каждый биологический этап презентации HLA, гетерогенность опухоли и HLA-LOH (потеря гетерозиготности);

- Pioneer™ — автоматизированная иммуноонкологическая платформа идентификации неоэпитопов, которая позволяет ранжировать потенциальные неоэпитопы на основе их вероятности вызывать выраженный противоопухолевый иммунный ответ;
- Isovar — определяет последовательность мутантного белка из соматических вариантов и опухолевой РНК;
- Varcode — предсказывает варианты эффектов для фильтрации скрытых мутаций;
- PyEnsembl — предоставляет справочные аннотации генома, которые используются Varcode для определения границ экзонов и последовательностей транскриптов;
- MHCtools — общий интерфейс для предикторов связывания пептид-МНС и др. [15, 29–33].

Ранжирование гарантирует, что выбранные неоэпитопы имеют следующие характеристики: 1) находящиеся в неопептиде эпитопы присутствуют только в опухолевых клетках; 2) состоят по крайней мере из одного эпитопа CD4⁺ или CD8⁺, предпочтительно из обоих; 3) происходят из белков, экспрессируемых в опухолевой клетке, а не в нормальных клетках. Последний критерий снижает риск аутоиммунных реакций у пациентов и, следовательно, является важной мерой безопасности [15].

Отобранные пептиды производят с использованием стандартной твердофазной синтетической пептидной химии по стандарту GMP (Good Manufacturing Practice, надлежащей производственной практики) и очищают (до 90–98 %) с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой. Синтезированные пептиды (промежуточные продукты) в процессе производства вакцины оценивают по внешнему виду, чистоте (%), идентичности (молекулярная масса, время удерживания), содержанию остаточного растворителя и растворимости в водном буфере. Также для обеспечения безопасности и переносимости неопептиды тестируют на стерильность и концентрацию эндотоксина. Однако стоит отметить, что разработка и валидация методов анализа данного продукта являются сложной задачей, поскольку производимые пептиды отличаются от партии к партии в зависимости от мутаций в опухоли пациента. Дополнительной проблемой, связанной с контролем, является отсутствие внутреннего стандарта, что делает невозможным определение аналитической ценности изготовленных смесей пептидов [15, 17, 19, 34–37].

Фракции очищенных пептидов лиофилизируют при температуре –80 °С с получением порошков с конечной степенью чистоты ≥95 % [35, 38].

Для приготовления вакцины отдельные пептиды в зависимости от их свойств растворяют в 100 % ДМСО [15, 34], ≤4 % ДМСО в изотонической декстрозе [37], фосфатно-солевом буфере или физиологическом растворе [19] либо ином растворителе. Чтобы уменьшить потенциальную конкуренцию АГ в дренирующем лимфатическом узле, на основании HLA-типирования, аффинности и частоты аллелей пептиды группируют на пулы, каждый из которых может содержать до 7 пептидов. Конечная доза каждого пептида для отдельных НАВ варьирует от 0,1 до 0,3 мг на вакцину. В то же время с точки зрения стабильности желательна разработка лиофилизированной пептидной композиции для однократного введения. Кроме того, меньшее количество инъекций более предпочтительно и удобно для самого пациента [9, 17, 36, 38].

Каждый пул вакцины стерилизуют фильтрованием с использованием мембран с диаметром пор 0,2–0,22 мкм, например путем пропускания через стерильный шприцевой фильтр с гидрофильной поливинилиденфторидовой мембраной. Полученную стерильную смесь разливают в первичный контейнер — флаконы, закрываемые бромбутиловой пробкой и алюминиевой пробкой, и ампулы из прозрачного боросиликатного стекла типа I или специальные шприц-тюбики. Готовый продукт хранят, как правило, при температуре –80 °С. Смесей пептидов, используемых в качестве препарата, контролируют по показателям: внешний вид, идентификация (молекулярная масса, соотношение пиков), pH водной смеси, осмолальность, чистота, примеси, стерильность, бактериальные эндотоксины [15, 17, 36, 37].

Перед применением пулы вакцины размораживают, смешивают с подобранным адъювантом и вводят пациенту подкожно, иногда внутривенно, внутримышечно или внутривенно [29]. В случае применения в качестве адъюванта GM-CSF его вводят отдельно перед каждой вакцинацией вблизи места инъекции пептидной смеси [39].

Возможными рисками, связанными с производственным процессом и требующими оценки, являются точность используемых мерных емкостей и инструментов; потенциальная адсорбция пептидов на фильтре, используемом на стадии стерильной фильтрации; соответствие требованиям асептики и совместимость смеси пептидов с адъювантом для получения стабильной смеси, пригодной для инъекций [17].

S.K. Mørk и соавт. [15] при создании неоантигенной пептидной вакцины EVX-01 разработали полностью интегрированный производственный процесс в соответствии с GMP, основанный на предварительном определенном оптимизированном рабочем процессе для каждого действия в производственном цикле от биопсии опухоли до упаковки конечного продукта. Мероприятия по возможности выполняются

параллельно, и введены четкая коммуникация и надзор для отслеживания, чтобы каждое действие было инициировано в нужное время с правильным вкладом. Это обеспечивает максимально быстрое время выполнения работ. Однако, поскольку невозможно создать специальную производственную площадку, охватывающую все стадии, для производства каждой отдельной партии для конкретного пациента требуется несколько партнеров. В результате авторами было показано, что можно разработать и изготовить персональную вакцину от биопсии до конечного продукта менее чем за 8 нед (48–55 дней).

Сроки для всего процесса производства другой вакцины — FRAME-001 — составляют 48 рабочих дней. На 1-й день у пациентов берут биопсию и образец крови для анализа ДНК и РНК. На 12-й день пептиды НАГ отбирают и отправляют на синтез. На 31-й день синтезированные и контролируемые по качеству персонализированные лиофилизированные пептиды отправляются в стерильную установку для дальнейшего приготовления водных смесей, которые выпускаются для клинического применения на 47-й день. На 48-й день водные пептидные смеси эмульгируют с адъювантом вакцины монтанидом в местных аптеках на базе клинических испытаний и вводят подкожно пациенту [17].

Закключение

Персонализированные противоопухолевые вакцины на основе синтетических пептидов представ-

ляют собой субъединичные вакцины, изготовленные из пептидов, имитирующих эпитопы АГ, которые вызывают иммунные противоопухолевые ответы.

Разработка и производство НАВ — сложный, трудоемкий и ресурсоемкий процесс. Для конструирования НАВ широко используются длинные пептиды или смеси длинных и коротких пептидов с целью пролонгирования перекрестной презентации АГ и преодоления потенциальной иммунологической толерантности, чтобы вызывать не только CD8⁺-, но и CD4⁺-Т-клеточные ответы. Для повышения эффективности пептидных вакцин применяют различные адъюванты, которые значительно влияют на кинетику, степень и качество реакций, вызванных вакцинацией.

Технология производства НАВ включает стадии скрининга и идентификации неоэпитопов с использованием подходов компьютерного прогнозирования, коиммунопреципитации, масс-спектрометрии и цитотоксических экспериментов; синтеза пептидов методами стандартной твердофазной синтетической пептидной химии и непосредственно получения вакцинного препарата, пригодного для хранения, транспортировки и введения пациенту. Весь процесс может занять 3–6 мес, поэтому вопрос рутинной выполнимости и ускоренного темпа особенно актуален в условиях метастазирования, когда время имеет существенное значение. Следовательно, практические аспекты производства персонализированных вакцин требуют постоянной оптимизации.

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

- Blass E., Ott P.A. Advances in the development of personalized neoantigen-based therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18(4):215–29. DOI: 10.1038/s41571-020-00460-2
- Sobhani N., Scaggiante B., Morris R. et al. Therapeutic cancer vaccines: from biological mechanisms and engineering to ongoing clinical trials. *Cancer Treat Rev* 2022;109:102429. DOI: 10.1016/j.ctrv.2022.1/02429
- Papież M.A., Krzyściak W. Biological therapies in the treatment of cancer-update and new directions. *Int J Mol Sci* 2021;22(21):11694. DOI: 10.3390/ijms222111694
- Charneau J., Suzuki T., Shimomura M. et al. Peptide-based vaccines for hepatocellular carcinoma: a review of recent advances. *J Hepatocell Carcinoma* 2021;8:1035–54. DOI: 10.2147/JHC.S291558
- Ferrall L., Lin K.Y., Roden R.B.S. et al. Cervical cancer immunotherapy: facts and hopes. *Clin Cancer Res* 2021;27(18):4953–73. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2833
- Tang M., Cai J.H., Diao H.Y. et al. The progress of peptide vaccine clinical trials in gynecologic oncology. *Hum Vaccin Immunother* 2022;18(5):2062982. DOI: 10.1080/21645515.2022.2062982
- Zhao X., Pan X., Wang Y., Zhang Y. Targeting neoantigens for cancer immunotherapy. *Biomark Res* 2021;9(1):61. DOI: 10.1186/s40364-021-00315-7
- Lee H.H., Hong S.H., Rhee J.H., Lee S.E. Optimal long peptide for flagellin-adjuvanted HPV E7 cancer vaccine to enhance tumor suppression in combination with anti-PD-1. *Transl Cancer Res* 2022;11(6):1595–602. DOI: 10.21037/tcr-21-2798
- Chen Z., Zhang S., Han N. et al. A Neoantigen-based peptide vaccine for patients with advanced pancreatic cancer refractory to standard treatment. *Front Immunol* 2021;12:691605. DOI: 10.3389/fimmu.2021.691605
- Zhou W.J., Qu Z., Song C.Y. et al. NeoPeptide: an immunoinformatic database of T-cell-defined neoantigens. *Database (Oxford)* 2019;2019:baz128. DOI: 10.1093/database/baz128
- Chen H., Li Z., Qiu L. et al. Personalized neoantigen vaccine combined with PD-1 blockade increases CD8⁺ tissue-resident memory T-cell infiltration in preclinical hepatocellular carcinoma models. *J Immunother Cancer* 2022;10(9):e004389. DOI: 10.1136/jitc-2021-004389
- De Waele J., Verhezen T., van der Heijden S. et al. A systematic review on poly(I:C) and poly-ICLC in glioblastoma: adjuvants coordinating the unlocking of immunotherapy. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40(1):213. DOI: 10.1186/s13046-021-02017-2
- Dillman R.O. An update on GM-CSF and its potential role in melanoma management. *Melanoma Manag* 2020;7(3):MMT49. DOI: 10.2217/mmt-2020-0011
- Kumar A., Taghi Khani A., Sanchez Ortiz A., Swaminathan S. GM-CSF: a double-edged sword in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2022;13:901277. DOI: 10.3389/fimmu.2022.901277
- Mørk S.K., Kadivar M., Bol K.F. et al. Personalized therapy with peptide-based neoantigen vaccine (EVX-01) including a novel adjuvant, CAF®09b, in patients with metastatic melanoma. *Oncoimmunology* 2022;11(1):2023255. DOI: 10.1080/2162402X.2021.2023255

16. Jing Z., Wang S., Xu K. et al. A potent micron neoantigen tumor vaccine GP-Neoantigen induces robust antitumor activity in multiple tumor models. *Adv Sci (Weinh)* 2022;9(24):e2201496. DOI: 10.1002/advs.202201496
17. Oosting L.T., Franke K., Martin M.V. et al. Development of a personalized tumor neoantigen based vaccine formulation (FRAME-001) for use in a phase II trial for the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Pharmaceutics* 2022;14(7):1515. DOI: 10.3390/pharmaceutics14071515
18. Sha H., Liu Q., Xie L. et al. Case report: pathological complete response in a lung metastasis of phyllodes tumor patient following treatment containing peptide neoantigen nano-vaccine. *Front Oncol* 2022;12:800484. DOI: 10.3389/fonc.2022.800484
19. Li F., Deng L., Jackson K.R. et al. Neoantigen vaccination induces clinical and immunologic responses in non-small cell lung cancer patients harboring EGFR mutations. *J Immunother Cancer* 2021;9(7):e002531. DOI: 10.1136/jitc-2021-002531
Erratum in: *J Immunother Cancer* 2021;9(9):1.
20. Buck H.W. Imiquimod (Aldara cream). *Infect Dis Obstet Gynecol* 1998;6(2):49–51. DOI: 10.1002/(SICI)1098-0997(1998)6:2<49::AID-IDOG3>3.0.CO;2-2
21. Bubna A.K. Imiquimod – its role in the treatment of cutaneous malignancies. *Indian J Pharmacol* 2015;47(4):354–9. DOI: 10.4103/0253-7613.161249
22. Tambunlertchai S., Geary S.M., Salem A.K. Topically applied resiquimod *versus* imiquimod as a potential adjuvant in melanoma treatment. *Pharmaceutics* 2022;14(10):2076. DOI: 10.3390/pharmaceutics14102076
23. Reynolds C.R., Tran S., Jain M., Narendran A. Neoantigen cancer vaccines: generation, optimization, and therapeutic targeting strategies. *Vaccines (Basel)* 2022;10(2):196. DOI: 10.3390/vaccines10020196
24. Hellmann M.D., Snyder A. Making it personal: neoantigen vaccines in metastatic melanoma. *Immunity* 2017;47(2):221–3. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.08.001
25. Li L., Goedegebuure S.P., Gillanders W.E. Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. *Ann Oncol* 2017;28(suppl_12):xii11–xii7. DOI: 10.1093/annonc/mdx681
26. Lang F., Schrörs B., Löwer M. et al. Identification of neoantigens for individualized therapeutic cancer vaccines. *Nat Rev Drug Discov* 2022;21(4):261–82. DOI: 10.1038/s41573-021-00387-y
27. Khodadoust M.S., Olsson N., Wagar L.E. et al. Antigen presentation profiling reveals recognition of lymphoma immunoglobulin neoantigens. *Nature* 2017;543(7647):723–7. DOI: 10.1038/nature21433
28. Chen P., Fang Q.X., Chen D.B., Chen H.S. Neoantigen vaccine: an emerging immunotherapy for hepatocellular carcinoma. *World J Gastrointest Oncol* 2021;13(7):673–83. DOI: 10.4251/wjgo.v13.i7.673
29. Rubinsteyn A., Kodysh J., Hodes I. et al. Computational pipeline for the PGV-001 neoantigen vaccine trial. *Front Immunol* 2018;8:1807. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01807
30. Long G.V., Ferrucci P.F., Khattak A. et al. KEYNOTE – D36: personalized immunotherapy with a neoepitope vaccine, EVX-01 and pembrolizumab in advanced melanoma. *Future Oncol* 2022. Ahead of print. DOI: 10.2217/fon-2022-0694
31. Tang Y., Wang Y., Wang J. et al. TruNeo: an integrated pipeline improves personalized true tumor neoantigen identification. *BMC Bioinformatics* 2020;21(1):532. DOI: 10.1186/s12859-020-03869-9
32. Hundal J., Kiwala S., McMichael J. et al. pVACtools: a computational toolkit to identify and visualize cancer neoantigens. *Cancer Immunol Res* 2020;8(3):409–20. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0401
33. Shao X.M., Bhattacharya R., Huang J. et al. High-throughput prediction of MHC class I and II neoantigens with MHCnuggets. *Cancer Immunol Res* 2020;8(3):396–408. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0464
34. Cai Z., Su X., Qiu L. et al. Personalized neoantigen vaccine prevents postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients with vascular invasion. *Mol Cancer* 2021;20(1):164. DOI: 10.1186/s12943-021-01467-8
35. Harari A., Sarivalasis A., de Jonge K. et al. A Personalized neoantigen vaccine in combination with platinum-based chemotherapy induces a T-Cell response coinciding with a complete response in endometrial carcinoma. *Cancers (Basel)* 2021;13(22):5801. DOI: 10.3390/cancers13225801
36. Keskin D.B., Anandappa A.J., Sun J. Neoantigen vaccine generates intratumoral T cell responses in phase Ib glioblastoma trial. *Nature* 2019;565(7738):234–9. DOI: 10.1038/s41586-018-0792-9
37. Ott P.A., Hu Z., Keskin D.B. et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017;547(7662):217–21. DOI: 10.1038/nature22991
38. Ott P.A., Hu-Lieskovan S., Chmielowski B. et al. A phase Ib trial of personalized neoantigen therapy plus anti-PD-1 in patients with advanced melanoma, non-small cell lung cancer, or bladder cancer. *Cell* 2020;183(2):347–62.e24. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.053
39. Shou J., Mo F., Zhang S. et al. Combination treatment of radiofrequency ablation and peptide neoantigen vaccination: promising modality for future cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2022;13:1000681. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1000681

ORCID авторов / ORCID of authors

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

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

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

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

Вклад авторов

M.B. Дмитриева: дизайн обзорного исследования, сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи и подготовка к публикации;

M.B. Барышникова: сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи;

O.L. Орлова, B.C. Косоруков: дизайн обзорного исследования, проверка конечной версии рукописи.

Authors contributions

M.V. Dmitrieva: design of a review study, collection and analysis of literature data, writing the text of the article and preparing for publication;

M.A. Baryshnikova: collection and analysis of literature data, article editing;

O.L. Orlova, V.S. Kosorukov: review study design, revision of the final version of the manuscript.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Минздрава России в рамках исследования № AAAA-A20-120022090056-5.

Funding. The study was carried out with the financial support of the Ministry of Health of Russia in the framework of the research No. AAA-A20-120022090056-5.

Статья поступила: 10.10.2022. **Принята к публикации:** 11.11.2022.

Article received: 10.10.2022. **Accepted for publication:** 11.11.2022.

Пептидные противоопухолевые вакцины, направленные на HER2/neu

Е.М. Трещалина¹, М.А. Барышникова¹, Е.В. Неборак², В.С. Косоруков¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6

Контакты: Елена Михайловна Трещалина treshalina@yandex.ru

Противоопухолевые вакцины направлены на коррекцию клеточного иммунитета путем преодоления иммунологической толерантности с ускользанием от надзора за счет специфической презентации опухолеассоциированных или опухольспецифичных антигенов иммунокомпетентным клеткам.

Целью настоящего обзора стало изучение современных стратегий разработки противоопухолевых вакцин, содержащих эпитопы HER2/neu-рецепторов, выполняющих роль опухолеассоциированных антигенов. Подходы к созданию таких вакцин классифицируются по направленности на Т-клеточное звено или В-клетки, по выбору и длине используемых эпитопов или по применению специфических адъювантов.

В обзоре представлены сведения по данной теме, полученные из более чем 50 публикаций за последние 20 лет, найденных в наиболее значимых источниках цитирования. Текст рубрифицирован для удобства восприятия учеными разных специальностей и завершен кратким заключением с акцентом на перспективах развития. Рассмотрены результаты клинических исследований вакцин с анализом иммунологических особенностей результатов иммунотерапии, в основном рака молочной железы с экспрессией HER2/neu. Приведены данные, отражающие эффективность (выживаемость, время до прогрессирования) и роль разных факторов, влияющих на продолжительность экспозиции антигена в органах лимфатической системы. Кроме того, описаны результаты сопутствующего применения таргетных иммунных препаратов с оценкой выбора конкретного фрагмента рецептора-антигена в качестве презентруемого эпитопа, а также его внутри- или внеклеточного расположения. Сравниваются вакцины, нацеленные на разные комплексы гистосовместимости. В обзоре прослежена эволюция вакцинных препаратов от простейших, содержащих короткие пептидные последовательности, до сложных комбинированных систем, включая вирусные векторы. Внимание уделено разным методологическим подходам, используемым при разработке такого рода лекарственных препаратов: от компьютерного дизайна до фагового дисплея в экспериментах *in vitro/in vivo*. Акцент сделан на проблеме персонализированного подхода к вакцино-терапии онкологического пациента, связанной с мутационным процессом, протекающим внутри опухолей и приводящим к появлению уникальных опухолеассоциированных антигенов. Обсуждается участие компонентов системы комплемента в антителоопосредованном лизисе опухолевых клеток, индуцированном представленными вакцинами.

Таким образом, обзор знакомит читателей с существующими направлениями создания иммунных препаратов, призванных подавить развитие опухолевого процесса за счет активации собственных иммунных сил организма, и перспективой их развития.

Ключевые слова: пептидные противоопухолевые вакцины, HER2/neu, иммунный ответ

Для цитирования: Трещалина Е.М., Барышникова М.А., Неборак Е.В., Косоруков В.С. Пептидные противоопухолевые вакцины, направленные на HER2/neu. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):22–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-22-29

Peptide antitumor vaccines targeting HER2/neu

Helen M. Treshalina¹, Maria A. Baryshnikova¹, Ekaterina V. Neborak², Vyacheslav S. Kosorukov¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115552, Russia;

²RUDN University; 6 Miklukho-Maklay St., Moscow 117198, Russia

Contacts: Helen Mikhailovna Treshalina treshalina@yandex.ru

Antitumor vaccines are aimed at correcting cellular immunity by overcoming immunological tolerance with eluding surveillance due to the specific presentation of tumor-associated or tumor-specific antigens to immunocompetent cells.

The purpose of this review was to study modern strategies for the development of antitumor vaccines containing epitopes of HER2/neu receptors acting as tumor-associated antigens. Approaches to the creation of such vaccines are classified by targeting the T-cell link or B-cells by the choice and length of the epitopes used or by the use of specific adjuvants.

The review provides information on this topic, obtained from more than 50 publications of the last 20 years, found in the most significant sources of citation. The text is categorized for the convenience of perception by scientists of different specialties and is completed with a brief conclusion with an emphasis on development prospects. The results of clinical studies of vaccines with an analysis of the immunological features of the results of immunotherapy, mainly breast cancer with HER2/neu expression, are considered. Vaccines targeting different histocompatibility complexes are compared. The review traces the evolution of vaccine preparations from the simplest containing short peptide sequences to complex combined systems, including viral vectors. Attention is paid to various methodological approaches used in the development of such drugs: from computer design and phage display in experiments *in vitro/in vivo*. The emphasis is placed on the problem of a personalized approach to vaccination of an oncological patient associated with a mutation process occurring inside tumors and leading to the appearance of unique tumor-associated antigens. The participation of complement system components in antibody-mediated lysis of tumor cells induced by the presented vaccines is discussed.

Thus, the review introduces readers to the existing directions of creating immune drugs designed to suppress the development of the tumor process by activating the body's own immune forces and the prospect of their development.

Keywords: peptide cancer vaccines, HER2/neu, immune response

For citation: Treshalina H.M., Baryshnikova M.A., Neborak E.V., Kosorukov V.S. Peptide antitumor vaccines targeting HER2/neu. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):22–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-22-29

Введение

Мнение об инфекционном процессе как о возможном предшественнике регрессии опухоли опередило современную медицину. Попытки целенаправленного ингибирования злокачественного процесса путем воздействия на иммунную систему известны давно. В XX в. в этом отношении наиболее известны антибактериальные вакцины БЦЖ (Жорж Матэ) и Коли-токсин (Уильям Коли). Некоторые впечатляющие результаты у онкологических пациентов были получены со стрептококковой вакциной, вызвавшей регрессию крысиной саркомы на фоне рожистого воспаления [1]. Детальное изучение иммунной системы онкологических пациентов позволило понять механизмы предупреждения и/или терапии рака и создать эффективные препараты для онкологической практики. Примером могут служить первые, разработанные в США (2006–2010 гг.), дендритноклеточные вакцины, профилактические вакцины Гардасил (рак шейки матки), Провенж (Дендреон) (гормонорезистентный рак предстательной железы) [2] и терапевтические иммунопрепараты, например ипилимумаб, моноклональные антитела против коингибиторного рецептора CTLA-4 (диссеминированная меланома кожи) [3]. Это послужило отправной точкой лекарственной иммунопрофилактики и терапии солидных новообразований, базой для которых стали определенные ранее отклонения в реализации местного

и системного иммунного ответа у онкологических пациентов, в частности супрессивное действие на иммунную функцию стероидов, радио- и химиотерапии [4–7]. Важными также оказались и прогностически значимые для оценки эффективности отсроченные побочные эффекты иммунотерапии даже при значительном положительном ответе [8].

Противоопухолевая вакциноterapia пептидными вакцинами предполагает введение опухолеассоциированных или опухоеспецифичных антигенов (ОСА) в провоспалительном контексте (обычно за счет применения адъюванта) в качестве праймирования иммунной системы против раковых клеток. Данная стратегия требует кросс-презентации, но в противном случае она похожа на стратегии вакцинирования, осуществляемые в большинстве случаев при инфекционных заболеваниях [9].

Первым шагом для обеспечения избирательной направленности вакцины на опухолевые клетки является идентификация целевых опухолевых антигенов. В идеале целевые антигены должны экспрессироваться только злокачественными и/или нежизнеспособными клетками и играть ключевую роль в прогрессировании опухоли. Опухолеассоциированные антигены, выбранные, например, для таргетной терапии глиобластомы (HER2, TRP-2, gp100, MAGE-1, IL-13Ra², AIM-2), экспрессируются и на других видах опухолей [10], поскольку многие из этих антигенов

также экспрессируются нормальными тканями, а направляемые против них Т-клетки подлежат отрицательной селекции в тимусе. ОСА, к которым относятся неоантигены, возникающие в злокачественной опухоли в результате мутаций, или некоторые онко-вирусные антигены ускользают от иммунного надзора и могут представлять собой более выгодную иммунологическую мишень. Общими называются неоантигены, кодируемые онкогенными драйверными мутациями, встречающимися в разных типах опухолей у отдельных пациентов. Однако большинство неоантигенов индивидуальны как для пациента, так и для опухоли, что требует персонализации такой терапии [11].

Пептидные вакцины, представляющие собой изолированный иммуногенный эпитоп ОСА, генерирующий противоопухолевый иммунный ответ, являются наиболее привлекательным вариантом противоопухолевой вакцинотерапии. Короткие аминокислотные пептиды просты и недороги в изготовлении, относительно малотоксичны и стабильны при транспортировке, что делает возможным крупномасштабное производство. В последние годы опубликовано множество клинических испытаний различных стратегий вакцинотерапии, направленной на ОСА, в том числе и пептидных вакцин [12, 13].

HER2/neu является распространенным ростовым фактором при различных злокачественных новообразованиях, наиболее заметным из которых является рак молочной железы (РМЖ). Избыточная экспрессия HER2 — неблагоприятный прогностический фактор при РМЖ, но благодаря таргетной терапии моноклональными антителами, такими как трастузумаб, достигнуты некоторые успехи в лечении этого вида рака. HER2/neu — иммуногенный белок, индуцирующий как гуморальные, так и клеточно-опосредованные иммунные реакции, — является хорошей мишенью для пептидных противоопухолевых вакцин.

Одной из наиболее распространенных стратегий, исследуемых для терапии РМЖ, является вакцина, доставляющая пептидные эпитопы к главному комплексу гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса I (МНС I) для активации иммунных реакций против специфического опухолевого антигена HER2/neu [14].

На сегодняшний день для лечения РМЖ не рекомендована ни одна из терапевтических вакцин на основе HER2/neu, но различные варианты новых вакцин, направленных на разные эпитопы, прошли ограниченные клинические испытания [15]. Такие вакцины содержат в основном пептиды E75 (p369–377), GP2 (p654–662) или AE37 (p776–790). E75 — пептид с аминокислотной последовательностью KIFGSLAFL — был клинически изучен в рамках I/II фазы ($n = 187$) и показал безопасность и определенную эффектив-

ность по увеличению безрецидивной выживаемости до 89,7 % против 80,2 % в контроле [16–18]. Пептид GP2 с последовательностью IISAVVGIL, индуцирующий выработку специфических CD8⁺-Т-клеток, согласно результатам исследования ($n = 180$) увеличивал безрецидивную выживаемость до 88 % против 80 % в контроле [19, 20]. Перспективной можно считать вакцину AE37, полученную путем добавления 4-валентного пептида II-key (LRMK) к основе AE36 (последовательность GVGSPYVSRLIGICL). Новая вакцина в отличие от последнего показала возросшую в 250 раз способность связываться с МНСII класса (МНС II) [21].

Синтетические пептидные вакцины, активирующие Т-клеточный ответ

Изначально способность вызывать цитотоксические иммунные реакции была определена у небольших синтетических CD8-Т-клеточных эпитопов, среди которых длинные гибридные пептиды, в том числе Т-хелперных (Th) и Т-цитотоксических эпитопов. Вакцинация короткими пептидами вызывала, скорее, толерантность, а не иммунный ответ, в силу связывания непосредственно с МНС I непрофессиональных антигенпредставляющих клеток [22, 23]. Этот эффект возникал без костимулирующих сигналов, скорее всего с помощью анергии, так как антигенспецифические CD8-Т-клетки памяти, которые могут временно активироваться, обладают низкой цитотоксической активностью [24]. Соответственно, к CD8-эпитопам в вакцинах были добавлены Th-пептиды для улучшения иммунного ответа путем презентации как CD8-, так и CD4-Т-клеточных эпитопов дендритными клетками. Активация Th-клеток, в свою очередь, может давать сигнал CD8-клеткам для трансформации в эффекторные клетки-киллеры. Следует отметить, что такие пептиды могут также экзогенно нагружать Т- и В-клетки, которые затем могут функционировать как толерогенные антигенпредставляющие клетки. Дальнейшим усовершенствованием стратегии стало производство длинных синтетических гибридных пептидов [25–28], обеспечивающих избирательный дендритноклеточный процессинг и презентацию пептидов. В конечном итоге это дает более сильный и эффективный иммунный ответ как со стороны CD4-, так и со стороны CD8-Т-клеток. Такой процесс может быть причиной увеличения продолжительности презентации эпитопа в дренажных лимфатических узлах и сопряженного увеличения численности клона эффекторных клеток и продукции интерферона (ИФН) γ [29].

Предложены также Т-клеточные вакцины на основе нескольких пептидов, охватывающих всю белковую последовательность и тем самым «покрывающих» несколько HLA-I и HLA-II-пептидных эпитопов

для индукции CD4- и CD8-Т-клеток, способных давать противоопухолевый ответ на все доступные эпитопы антигенов опухоли. Ограниченные клинические испытания прошли также различные пептидные вакцины, активирующие Т-клетки. Клиническому изучению были подвергнуты Th-пептиды из внеклеточного или внутриклеточного доменов рецепторов HER2/neu и пептиды из фрагментов, ограниченных МНС I(HLA-A2)-связывающими областями. В результате многократного ежемесячного применения таких вакцин 6-кратными внутрикожными курсами были получены пептидспецифические Th-, CD8- и анти-HER2-специфические клеточные иммунные ответы [25].

Кинетические исследования, проводимые до 1 года от начала иммунизации, показали, что пептидспецифические отклики индуцируются рано, примерно через 2–4 мес после начала вакцинации, а для развития HER2/neu-специфических иммунных ответов необходима полная вакцинация 6 прививками. Почти у 13 % пациентов иммунный ответ определялся вплоть до 1 года после начала иммунизации [30]. При использовании гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) в качестве адъюванта для иммунизации был описан феномен эпитопного расширения, т. е. расширения спектра Т-клеточных иммунных реакций к тем фрагментам белка HER2/neu, которые не включены в вакцину. Это может быть связано с более эффективной презентацией субдоминантных эпитопов, индуцированной GM-CSF. Однако по сравнению со значительным Th- и CD8-Т-клеточным ответом гуморальный ответ был индуцирован этой вакциной в меньшей степени [26], поскольку использование адъюванта GM-CSF вместе с HLA-рестрицированными Т-клеточными эпитопами, по-видимому, преимущественно вызывает Th1-иммунные реакции и секрецию ИФН- γ . В 2009 г. было показано, что при сочетании трипептидной вакцины с трастузумабом возникает HER2/neu-специфический Т-клеточный ответ на вакцинацию при удовлетворительной переносимости [31].

Другой подход к пептидной вакцинации, направленной на активацию Т-клеток, основан на использовании пептида из внутриклеточного домена HER2/neu, связывающегося с МНС II (AE37) и стимулирующего CD4-Т-клеточный ответ, и адъюванта. AE37 — это вакцина, направленная на HER2, состоящая из гибридного пептида AE36 (aa 776–790), который получен из внутриклеточной части белка HER2 и основной части инвариантной цепи МНС II (пептид II-Key), этот гибридный пептид вводится с иммуноадъювантом GM-CSF [32]. Первая фаза клинических исследований показала, что вакцинация этим пепти-

дом индуцировала Т-клеточный ответ без дополнительного использования адъюванта [32, 33]. Исследования HLA-A2/A3-рестрицированного пептида из области экзоцеллюлярного домена (E75), который используется для иммунизации с GM-CSF, показали, что эта пептидная вакцина иммуногенна для HLA-A2+-пациентов [34] и что она предотвращала высокий риск рецидива у этих пациентов [35, 36]. В 2021 г. опубликован анализ доклинических и клинических исследований вакцины AE37 при РМЖ и при раке предстательной железы, где показано предотвращение рецидива и сделано заключение об усилении эффективности вакцины путем сочетания с иммунотерапией [37]. Результаты рандомизированного исследования комбинации пептидной вакцины, направленной на HER2, и трастузумаба подтвердили роль таргетной терапии в лечении трижды негативного рака [38].

Пептидные вакцины, направленные на HER2-специфические В-клеточные эпитопы

Еще один подход к разработке пептидных вакцин против HER2/neu-положительного РМЖ связан с использованием HER2-специфических В-клеточных эпитопов, преимущественно индуцирующих реакции специфических моноклональных антител с участием трастузумаба [14]. Рациональное зерно этого подхода заключается в том, что антитела связываются с поверхностно-экспрессируемыми опухолевыми антигенами независимо от экспрессии МНС I. Таким образом, отрицательная регуляция молекул МНС I как механизм уклонения опухоли от иммунного надзора не влияет на доступность эпитопа для антител. Единственной возможностью для опухоли ускользнуть от них будет отбор вариантов, лишенных антигенов, которые не имеют или имеют лишь в редких случаях рецепторы HER2/neu.

Проблема HLA-рестрикции Т-клеточных эпитопов, которую пытались преодолеть с помощью мультипептидных «перекрывающихся» конструкций, не вызывает опасений в случае эпитопов В-клеток, которые можно широко применять для всех типов HLA. Выбор эпитопов В-клеток выполняется на основе технологии фагового дисплея с использованием различных анти-HER2-моноклональных антител, в том числе трастузумаба, с известными противоопухолевыми эффектами для выбора эпитопов, расположенных в сайтах связывания этих антител [39–42]. В 2011 г. с помощью моноклональных антител против HER2/neu-экспрессирующих опухолевых клеток был идентифицирован новый эпитоп антител. Этот пептид включает В-клеточный эпитоп, а также эпитопы Th- и цитотоксических Т-клеток, что указывает на возможность индукции противоопухолевых

антител и цитотоксических Т-лимфоцитов в случае использования его при злокачественной патологии [43]. Как альтернатива существуют компьютерные программы для выбора пептидов, которые вызывают описанные антипептидные и анти-HER2-гуморальные ответы. Так, HER2-В-клеточные эпитопы были сшиты со случайными эпитопами Т-клеток из фьюжн-белка вируса кори, индуцировавшего гуморальный иммунный ответ против пептидов и HER2-белка [44]. Авторы этой конструкции продемонстрировали, что комбинация пептидов более эффективна, чем иммунизация одним пептидом, и что дополнительное применение интерлейкина 12 уменьшало количество легочных метастазов в мышинной модели трансплантации сингенных HER2-гиперэкспрессирующих опухолевых клеток. Наряду с этим, недавно были определены 3 В-клеточных пептида в экзоцеллюлярном домене HER2/neu с помощью компьютерного алгоритма, 2 из которых расположены в пределах связывающей области трастузумаба, а 3-й – в пределах области димеризационной петли HER2/neu [45]. Механизмы, посредством которых трастузумаб вызывает противоопухолевый эффект, были хорошо описаны и включают в себя антителозависимую цитотоксичность (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC), активацию NK-клеток, интернализацию и деградацию HER2/neu, приводящую к нарушению димеризации рецептора и пресечению ангиогенеза [46]. Поэтому среди ученых существовало намерение вызвать поликлональный ответ аналогично Герцептину (препарат моноклональных антител против HER2/neu), выбирающему эпитопы, локализованные в пределах связывающего региона и/или димеризационной петли для ингибирования димеризации рецепторов. Из 7 выбранных предполагаемых В-клеточных пептидов три (aa 378–394, aa 545–560, aa 610–623) вызывали выработку пептидспецифических, а также HER2/neu-специфических антител при конъюгации со столбнячным токсином [45]. Противоопухолевый эффект этих антител был проверен *in vitro* и показал уменьшение пролиферации гиперэкспрессирующих HER2/neu опухолевых клеток, а также уничтожение опухоли путем комплементзависимого лизиса.

Важно отметить, что были продемонстрированы антитела, полученные после иммунизации смесью из 3 пептидов, опосредовавшей ADCC аналогичным образом с Герцептином, что указывает на превосходство такого сочетания пептидов по сравнению с одичным пептидом за счет синергизма действия на опухолевый рост. Применение этого мультипептидного подхода к иммунизации показало на модели спонтанно развивающегося HER2/neu-гиперэкспрессирующего РМЖ у трансгенных мышей продление ремиссии и задержку опухолевого роста [47]. Соответственно, было высказано предположение о том,

что поляризация иммунного ответа в отношении Th1 имеет важное значение для профилактики рецидива опухоли через ИФН- γ -индуцированное переключение изотипа на антитела с повышенными ADCC-опосредующими свойствами, активацию NK-клеток и макрофагов и ингибирование неоангиогенеза в пределах опухолевого поражения. В результате стратегия вакцинации была улучшена путем добавления интерлейкина 12. Действительно, индуцированные Th1-смещенные анти-HER2-иммунные реакции (повышение уровней IgG2a и ИФН- γ) были в значительной степени ассоциированы с длительной ремиссией, задержкой роста опухоли и прогрессирования по сравнению с пептидной иммунизацией без Th1-иммуномодуляции. Эти результаты были учтены при начале I фазы клинических испытаний у пациенток с метастатическим РМЖ [48].

С целью повышения иммунного ответа пептиды были объединены в иммуностимулирующие комплексы, активированные вирусом гриппа и используемые в качестве систем-носителей в лицензированных антиинфекционных вакцинах с известными Th1- и Th2-активирующими свойствами и высоким профилем безопасности [49]. Были выбраны 10 пациенток с метастазами РМЖ без гиперэкспрессии HER2/neu, FISH-отрицательными, положительными по рецепторам эстрогенов и прогестерона; ожидаемая продолжительность жизни >4 мес. Выбор пациенток осуществлялся по этическим соображениям таким образом, чтобы избежать поддерживающего стандартного лечения трастузумабом в случае других HER2-зависимых заболеваний. Пациенткам были сделаны 3 прививки с интервалами в месяц, в результате у большинства пациенток (8/10) вырабатывались антипептидные антитела и у всех, кроме одной, были обнаружены HER2/neu-специфические антитела. В соответствии с первичной конечной точкой безопасности были выявлены минимальные локальные побочные эффекты (4/10) при отсутствии системных нарушений у большинства пациенток [48].

Благодаря конъюгации пептидов в вирусомную систему-носитель наблюдались CD4-Т-клеточные ответы, необходимые для переключения изотипов антител и индукции В-клеток памяти в ответ на пептиды, что оценивалось по продукции интерлейкина 2, фактора некроза опухолей α и ИФН- γ при повторной стимуляции мононуклеарных клеток крови в присутствии вируса *in vitro*. Следует отметить, что гуморальный и клеточный иммунные ответы были вызваны у пациенток со всеми типами HLA, что свидетельствует о чувствительности к вакцинации почти всех пациенток (8/10). Иммунокомпетентность у этих пациенток с распространенным метастатическим РМЖ далее была продемонстрирована по характеристике субпопуляции лимфоцитов в зависимости

от возраста и пола (в сравнении с контрольной группой здоровых добровольцев). Не было обнаружено различий в распределении субпопуляций лимфоцитов между пациентками с РМЖ IV стадии и здоровыми лицами до и после иммунизации. Интересно, что у пациенток наблюдалось значительно большее количество регуляторных Т-клеток в периферической крови, чем у участников контрольной группы до вакцинации. Эти результаты подтверждаются в исследовании, показавшем увеличение числа Т-регуляторных клеток в крови у пациенток с HER2/neu-положительным РМЖ [50]. Ранее было также показано, что инфильтрация опухоли Т-регуляторными клетками ассоциирована со снижением выживаемости пациентов с РМЖ [51, 52]. Важно отметить, что после вакцинации количество Т-регуляторных клеток значительно снизилось, что может быть важно для индукции надлежащего иммунного ответа, а также для эффективности вакцинации. Подобные эффекты были описаны при лечении трастузумабом [52] и ингибиторами ароматазы [51], а также при некоторых химиотерапевтических процедурах [53]. Это является контраргументом по поводу рассмотрения стратегии ингибирования Т-регуляторных клеток в сочетании с вакцинацией с целью повышения противоопухолевого эффекта. Что касается клинических исходов, то при дизайне данного исследования внимание было сосредоточено на эффективности вакцины. В этот этап по этическим причинам не включали пациенток с HER2/neu-положительными опухолями (контроль). Таким образом, для того чтобы оценить клинический ответ после вакцинации мультипептидной вакциной, необходима рандомизация пациенток с HER2/neu-гиперэкспрессирующим РМЖ при проведении II фазы клинических испытаний. Эта же рекомендация отнесена и к HER2/neu-положительному раку желудка [54].

Таким образом, В-клеточные мультиэпитопные вакцины индуцируют несколько показателей, что позволяет считать их перспективными противоопухолевыми кандидатами для воздействия на HER2/neu-гиперэкспрессирующие опухоли. В связи с этим исследования можно ориентировать по следующим направлениям:

- индукция антител с противоопухолевой активностью и индукция иммунологической памяти;
- поликлональный гуморальный ответ (преимущества перед обработкой моноклональным антителом);
- независимость от HLA-пептидов (преимущество перед CD8- и CD4-пептидными вакцинами);
- индукция фонового Th1-иммунного ответа за счет правильного выбора системы-носителя/адьюванта;
- снижение уровней регуляторных Т-клеток (возможный механизм противодействия иммунологическому уклонению опухоли и улучшения ответа на вакцинацию).

Заключение

Существующие пептидные HER2-вакцины направлены на активацию Т- или В-клеточных эпитопов. Опубликованные результаты клинических исследований за последние 20 лет и их анализ показывают большую эффективность применения HER2-пептидных вакцин для предотвращения рецидивов у онкологических пациентов с распространенным метастатическим HER2/neu-положительным заболеванием после хирургического и химиотерапевтического лечения. Это позволяет избежать подавления иммунитета и толерантности, а также имеет перспективу развития при сочетании их с таргетными анти-HER2-препаратами, а также с другими средствами иммунотерапии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wiemann B., Starnes C.O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994;64(3):529–64. DOI: 10.1016/0163-7258(94)90023-x
2. Bot A. The landmark approval of Provenge, what it means to immunology and “in this issue”: the complex relation between vaccines and autoimmunity. *Int Rev Immunol* 2010;29(3):235–8. DOI: 10.3109/08830185.2010.490777
3. Ledford H. Melanoma drug wins US approval. *Nature* 2011;471(7340):561. DOI: 10.1038/471561a
4. Ullen H., Blom U., Blomgren H., von Holst H. Blood lymphocyte subsets in patients with primary intracranial tumours. Correlation to histological tumour type and anatomical site. *Acta Neurochir (Wien)* 1986;81(3–4):100–5. DOI: 10.1007/BF01401229
5. Bodmer S., Strommer K., Frei K. et al. Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. *J Immunol* 1989;143(10):3222–9.
6. Jackson C., Ruzevick J., Phallen J. et al. Challenges in immunotherapy presented by the glioblastoma microenvironment. *Clin Dev Immunol* 2011;2011:732413. DOI: 10.1155/2011/732413
7. Fadul C.E., Fisher J.L., Gui J. et al. Immune modulation effects of concomitant temozolomide and radiation therapy on peripheral blood mononuclear cells in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol* 2011;13(4):393–400. DOI: 10.1093/neuonc/nuq204

8. O'Regan K.N., Jagannathan J.P., Ramaiya N., Hodi F.S. Radiologic aspects of immune-related tumor response criteria and patterns of immune-related adverse events in patients undergoing ipilimumab therapy. *AJR Am J Roentgenol* 2011;197(2):W241–6. DOI: 10.2214/AJR.10.6032
9. Rock K.L., Shen L. Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 2005;207:166–83. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2005.00301.x
10. Phuphanich S., Wheeler C.J., Rudnick J.D. et al. Phase I trial of a multi-epitope-pulsed dendritic cell vaccine for patients with newly diagnosed glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2013;62(1):125–35. DOI: 10.1007/s00262-012-1319-0
11. Hollingsworth R.E., Jansen K. Turning the corner on therapeutic cancer vaccines. *NPJ Vaccines* 2019;4:7. DOI: 10.1038/s41541-019-0103-y
12. Schneble E., Clifton G.T., Hale D.F., Peoples G. Peptide-based cancer vaccine strategies and clinical results. *Methods Mol Biol* 2016;1403:797–817. DOI: 10.1007/978-1-4939-3387-7_46
13. Zhu S.-Y., Yu K.-D. Breast cancer vaccines: disappointing or promising? *Front Immunol* 2022;13:828386. DOI: 10.3389/fimmu.2022.828386
14. Ladjemi M.Z., Jacot W., Chardès T. et al. Anti-HER2 vaccines: new prospects for breast cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59(9):1295–312. DOI: 10.1007/s00262-010-0869-2
15. Costa R., Czerniecki B.J. Clinical development of immunotherapies for HER2⁺ breast cancer: a review of HER2-directed monoclonal antibodies and beyond. *NPJ Breast Cancer* 2020;6:10. DOI: 10.1038/s41523-020-0153-3
16. Clifton G.T., Hale D., Vreeland T.J. et al. Results of a randomized phase IIb trial of nelipecimut-S + trastuzumab *versus* trastuzumab to prevent recurrences in patients with high-risk HER2 low-expressing breast cancer. *Clin Cancer Res* 2020;26(11):2515–23. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2741
17. Mittendorf E.A., Lu B., Melisko M. et al. Efficacy and safety analysis of nelipecimut-S vaccine to prevent breast cancer recurrence: a randomized, multicenter, phase III clinical trial. *Clin Cancer Res* 2019;25(14):4248–54. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2867
18. Mittendorf E.A., Clifton G.T., Holmes J.P. et al. Final report of the phase I/II clinical trial of the E75 (nelipecimut-S) vaccine with booster inoculations to prevent disease recurrence in high-risk breast cancer patients. *Ann Oncol* 2014;25(9):1735–42. DOI: 10.1093/annonc/mdl211
19. Carmichael M.G., Benavides L.C., Holmes J.P. et al. Results of the first phase I clinical trial of the HER-2/neu peptide (GP2) vaccine in disease-free breast cancer patients. *Cancer* 2010;116(2):292–301. DOI: 10.1002/cncr.24756
20. Mittendorf E.A., Ardavanis A., Litton J.K. et al. Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide GP2 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence. *Oncotarget* 2016;7(40):66192–201. DOI: 10.18632/oncotarget.11751
21. Mittendorf E.A., Ardavanis A., Symanowski J. et al. Primary analysis of a prospective, randomized, single-blinded phase II trial evaluating the HER2 peptide AE37 vaccine in breast cancer patients to prevent recurrence. *Ann Oncol* 2016;27(7):1241–8. DOI: 10.1093/annonc/mdw150
22. Curiel T.J., Coukos G., Zou L. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004;10(9):942–9. DOI: 10.1038/nm1093
23. Roepman P., Schuurman A., Delahaye L.J. et al. A gene expression profile for detection of sufficient tumour cells in breast tumour tissue: microarray diagnosis eligibility. *BMC Med Genomics* 2009;2:52. DOI: 10.1186/1755-8794-2-52
24. Melief C.J., van der Burg S.H. Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 2008;8(5):351–60. DOI: 10.1038/nrc2373
25. Disis M.L., Gooley T.A., Rinn K. et al. Generation of T-cell immunity to the HER-2/neu protein after active immunization with HER-2/neu peptide-based vaccines. *J Clin Oncol* 2002;20(11):2624–32. DOI: 10.1200/JCO.2002.06.171
26. Disis M.L., Goodell V., Schiffman K., Knutson K.L. Humoral epitope-spreading following immunization with a HER-2/neu peptide based vaccine in cancer patients. *J Clin Immunol* 2004;24(5):571–8. DOI: 10.1023/B:JOCI.0000040928.67495.52
27. Mittendorf E.A., Storrer C.E., Foley R.J. et al. Evaluation of the HER2/neu-derived peptide GP2 for use in a peptide-based breast cancer vaccine trial. *Cancer* 2006;106(11):2309–17. DOI: 10.1002/cncr.21849
28. Mittendorf E.A., Clifton G.T., Holmes J.P. et al. Clinical trial results of the HER-2/neu (E75) vaccine to prevent breast cancer recurrence in high-risk patients: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer* 2012;118(10):2594–602. DOI: 10.1002/cncr.26574
29. Obst R., van Santen H.M., Melamed R. et al. Sustained antigen presentation can promote an immunogenic T cell response, like dendritic cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(39):15460–5. DOI: 10.1073/pnas.0707331104
30. Salazar L.G., Coveler A.L., Swensen R.E. et al. Kinetics of tumor-specific T-cell response development after active immunization in patients with HER-2/neu overexpressing cancers. *Clin Immunol* 2007;125(3):275–80. DOI: 10.1016/j.clim.2007.08.006
31. Disis M.L., Wallace D.R., Gooley T.A. et al. Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(28):4685–92. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.6789
32. Holmes J.P., Benavides L.C., Gates J.D. et al. Results of the first phase I clinical trial of the novel II-key hybrid preventive HER-2/neu peptide (AE37) vaccine. *J Clin Oncol* 2008;26(20):3426–33. DOI: 10.1200/JCO.2007.15.7842
33. Mittendorf E.A., Holmes J.P., Murray J.L. et al. CD4⁺ T cells in antitumor immunity: utility of an II-key HER2/neu hybrid peptide vaccine (AE37). *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(1):71–8. DOI: 10.1517/14712590802614538
34. Peoples G.E., Gurney J.M., Hueman M.T. et al. Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2005;23(30):7536–45. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.047
35. Holmes J.P., Clifton G.T., Patil R. et al. Use of booster inoculations to sustain the clinical effect of an adjuvant breast cancer vaccine: from US Military Cancer Institute Clinical Trials Group Study I-01 and I-02. *Cancer* 2011;117(3):463–71. DOI: 10.1002/cncr.25586
36. Benavides L.C., Sears A.K., Gates J.D. et al. Comparison of different HER2/neu vaccines in adjuvant breast cancer trials: implications for dosing of peptide vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(2):201–10. DOI: 10.1586/erv.10.167
37. McCarthy P.M., Clifton G.T., Vreeland T.J. et al. AE37: a HER2-targeted vaccine for the prevention of breast cancer recurrence. *Expert Opin Investig Drugs* 2021;30(1):5–11. DOI: 10.1080/13543784.2021.1849140
38. O'Shea A.E., Clifton G.T., Peoples G.E. Results from a randomized trial combining trastuzumab with a peptide vaccine suggest a role for HER2-targeted therapy in triple-negative breast cancer. *Oncotarget* 2021;12(23):2318–9. DOI: 10.18632/oncotarget.27998
39. Yip Y.L., Smith G., Koch J. et al. Identification of epitope regions recognized by tumor inhibitory and stimulatory anti-ErbB-2 monoclonal antibodies: implications for vaccine design. *J Immunol* 2001;166(8):5271–8. DOI: 10.4049/jimmunol.166.8.5271
40. Garrett J.T., Rawale S., Allen S.D. et al. Novel engineered trastuzumab conformational epitopes demonstrate *in vitro* and *in vivo* antitumor properties against HER-2/neu. *J Immunol* 2007;178(11):7120–31. DOI: 10.4049/jimmunol.178.11.7120

41. Riemer A.B., Klinger M., Wagner S. et al. Generation of peptide mimics of the epitope recognized by trastuzumab on the oncogenic protein Her-2/neu. *J Immunol* 2004;173(1):394–401. DOI: 10.4049/jimmunol.173.1.394
42. Riemer A.B., Kraml G., Scheiner O. et al. Matching of trastuzumab (Herceptin) epitope mimics onto the surface of Her-2/neu – a new method of epitope definition. *Mol Immunol* 2005;42(9):1121–4. DOI: 10.1016/j.molimm.2004.11.003
43. Miyako H., Kametani Y., Katano I. et al. Antitumor effect of new HER2 peptide vaccination based on B cell epitope. *Anticancer Res* 2011;31(10):3361–8.
44. Dakappagari N.K., Pyles J., Parihar R. et al. A chimeric multi-human epidermal growth factor receptor-2 B cell epitope peptide vaccine mediates superior antitumor responses. *J Immunol* 2003;170(8):4242–53. DOI: 10.4049/jimmunol.170.8.4242
45. Jasinska J., Wagner S., Radauer C. et al. Inhibition of tumor cell growth by antibodies induced after vaccination with peptides derived from the extracellular domain of Her-2/neu. *Int J Cancer* 2003;107(6):976–83. DOI: 10.1002/ijc.11485.
46. Nahta R., Esteva F.J. Herceptin: mechanisms of action and resistance. *Cancer Lett* 2006;232(2):123–38. DOI: 10.1016/j.canlet.2005.01.041
47. Wagner S., Jasinska J., Breiteneder H. et al. Delayed tumor onset and reduced tumor growth progression after immunization with a Her-2/neu multi-peptide vaccine and IL-12 in c-neu transgenic mice. *Breast Cancer Res Treat* 2007;106(1):29–38. DOI: 10.1007/s10549-006-9469-4
48. Wiedermann U., Wiltshcke C., Jasinska J. et al. A virosomal formulated Her-2/neu multi-peptide vaccine induces Her-2/neu-specific immune responses in patients with metastatic breast cancer: a phase I study. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(3):673–83. DOI: 10.1007/s10549-009-0666-9
49. Moser C., Amacker M., Zurbriggen R. Influenza virosomes as a vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Rev Vaccines* 2011;10(4):437–46. DOI: 10.1586/erv.11.15
50. Decker T., Fischer G., Bucke W. et al. Increased number of regulatory T cells (T-reg) in the peripheral blood of patients with Her-2/neu-positive early breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012;138(11):1945–50. DOI: 10.1007/s00432-012-1258-3
51. Generali D., Bates G., Berruti A. et al. Immunomodulation of FOXP3⁺ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009;15(3):1046–51. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1507
52. Tan A.R., Alexe G., Reiss M. Transforming growth factor-beta signaling: emerging stem cell target in metastatic breast cancer? *Breast Cancer Res Treat* 2009;115(3):453–95. DOI: 10.1007/s10549-008-0184-1
53. Maeda K., Hazama S., Tokuno K. et al. Impact of chemotherapy for colorectal cancer on regulatory T-cells and tumor immunity. *Anticancer Res* 2011;31(12):4569–74.
54. Bang Y.J., Van Cutsem E., Feyereislova A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy *versus* chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9742):687–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X

Вклад авторов

Е.М. Трешалина: разработка концепции и дизайна обзора, сбор и анализ данных литературы, написание и редактирование текста статьи;

М.А. Барышникова, Е.В. Неборак, В.С. Косоруков: сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи.

Author's contributions

H.M. Treshalina: concept and design, literature data collection and analysis, article written, editing of the article;

M.A. Baryshnikova, E.V. Neborak, V.S. Kosorukov: literature data collection and analysis, editing of the article.

ORCID авторов /ORCID of authors

Е.М. Трешалина / H.M. Treshalina: <https://orcid.org/0000-0002-3878-3958>

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

Е.В. Неборак / E.V. Neborak: <https://orcid.org/0000-0002-9336-7041>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 11.10.2022. Принята к публикации: 07.11.2022.

Article received: 11.10.2022. Accepted for publication: 07.11.2022.

Интерфероновый статус человека. Проблемы стандартизации исследования и установления референсных значений

А.В. Лобов¹, Е.А. Погодина¹, П.И. Иванова¹, Н.В. Угарова¹, Е.В. Сорокина², И.Ж. Шубина³

¹ООО «Экзактэ Лабс»; Россия, 117246 Москва, Научный проезд, 20, стр. 2;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Антон Викторович Лобов lobov-anton@list.ru

Введение. Интерфероны – важнейший компонент неспецифической (врожденной) резистентности организма, история изучения которого начинается с открытия в 1957 г. и продолжается до сих пор. Прикладным аспектом изучения интерферонов является определение индивидуального интерферонов статуса (ИС) с оценкой чувствительности лейкоцитов к иммунореактивным препаратам. ИС – совокупность показателей, отражающих состояние неспецифической (врожденной) резистентности организма.

Цель исследования – рассмотреть проблемы стандартизации проведения исследования ИС с поиском возможных путей унификации метода и рассчитать референсные значения показателей ИС на основании большого массива данных.

Материалы и методы. Проведена ретроспективная статистическая обработка базы данных исследований ИС, выполненных в клинико-диагностическом отделе лабораторного центра ООО «Экзактэ Лабс» в период с сентября 2020 г. по август 2022 г. Исследования ИС выполняли с использованием наборов для иммуноферментного анализа на коммерческих реагентах. В статье приводится описание методики исследования ИС с акцентом на наименее стандартизованные процедуры.

Результаты. Рассчитаны референсные значения показателей ИС с использованием 3 непрямых методов. Анализ полученных результатов позволил выделить возрастные группы, для которых целесообразно установление референсных значений. Показана несогласованность полученных референсных значений с ранее принятыми, что свидетельствует о необходимости их корректировки.

Заключение. Рассмотренные проблемы проведения исследования и стандартизации метода определения ИС имеют практическое значение для унификации методологии и способа проведения исследования *in vitro*. Актуализированы референсные значения показателей ИС, что позволит избежать ошибок при интерпретации результатов и повысить клиническую значимость исследования.

Ключевые слова: интерфероновый статус, индуцированный интерферон, спонтанный интерферон, интерферон γ , интерферон α

Для цитирования: Лобов А.В., Погодина Е.А., Иванова П.И. и др. Интерфероновый статус человека. Проблемы стандартизации исследования и установления референсных значений. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):30–40. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-30-40

Human interferon status. Standardization of the tests and establishing reference values

Anton V. Lobov¹, Ekaterina A. Pogodina¹, Polina I. Ivanova¹, Natalia V. Ugarova¹, Ekaterina V. Sorokina², Irina Zh. Shubina³

¹Exacte Labs, LLC; Bld. 20, 2 Nauchny Proezd, Moscow 117246, Russia;

²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115552, Russia

Contacts: Anton Viktorovich Lobov lobov-anton@list.ru

Background. Interferons are the most important component of nonspecific (congenital) resistance of the body, the history of their discovery dates back to 1957 and the study is still ongoing. Evaluation of an individual interferon status (IS) with the estimation of the sensitivity of leukocytes to immune reactive drugs has a practical aspect. IS is a set of parameters indicating the state of nonspecific resistance.

Aim. To study the problems of standardizing the IS tests with the search for possible ways of standardizing the method and calculate reference values based on a large amount of data.

Materials and methods. A retrospective statistical processing was performed using the database of the IS tests performed in the clinical diagnostic department of the laboratory center of Exacte Labs LLC from September 2020 to August 2022. Enzyme immunoassay kits based on commercial reagents were used. The paper describes the methodology for studying IS with an emphasis on the least standardized procedures.

Results. Reference values were calculated using three indirect methods. The analysis of the results obtained made it possible to identify age groups for which it is advisable to establish reference values. The study results showed the inconsistency of the obtained reference values as compared with the previous ones, which indicates the need for their correction.

Conclusion. The considered problems of performing and standardizing the method for IS analysis are of practical importance for establishing a standard methodology and an *in vitro* method. The reference values have been updated to avoid errors in the interpretation of the results and to increase the clinical significance of the study.

Keywords: interferon status, induced interferon, spontaneous interferon, interferon γ , interferon α

For citation: Lobov A.V., Pogodina E.A., Ivanova P.I. et al. Human interferon status. Standardization of the tests and establishing reference values. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022; 21(4):30–40. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-30-40

Введение

Иммунная система человека включает неспецифическое звено (врожденный иммунитет) и специфическое звено (приобретенный иммунитет). Подобное разделение, в частности, обусловлено скоростью реагирования на антигенно-чужеродные молекулы. Врожденная система, как эволюционно более древняя, отличается высокой скоростью реагирования, но при этом ограничена репертуаром узнаваемых антигенов и возможными механизмами их элиминации. Специфическая (приобретенная) система иммунного ответа уступает по скорости ответа, однако обладает возможностями обучения, памяти и многочисленными механизмами антигенного противостояния, в том числе к эволюционно новым возбудителям и молекулам.

Функционирование обеих систем тесно связано, и первоначальный врожденный иммунный ответ зачастую является неотъемлемой частью запуска механизмов специфического иммунитета, в том числе с помощью интерферонов (ИФН).

Интерфероны – важнейший компонент неспецифической (врожденной) резистентности организма, история изучения которого начинается с его открытия А. Isaacs и J. Lindenmann в 1957 г. [1]. В настоящий момент у человека открыто 3 основных типа ИФН: I (альфа/бета, α/β), II (гамма, γ), III (лямбда, λ). В России изучение ИФН связано с трудами Ф.И. Ершова и А.С. Новохатского «Интерферон и его индукторы» (1980), В.Д. Соловьева и Т.А. Бектемирова «Интерфероны в теории и практике медицины» (1981) [2, 3].

Основным продуцентом ИФН- α являются лейкоциты, в связи с чем его называют лейкоцитарными

ИФН, а ИФН- β – фибробласты; оба подтипа обладают высокой противовирусной активностью и выполняют регуляторные функции в отношении Т-хелперов 1-го типа [4]. ИФН- γ обладает иммуnoreгуляторной, противовирусной и антипролиферативной активностью и продуцируется Т-лимфоцитами и НК-клетками [5]. В ответ на проникновение вирусов в клетку происходит секреция ИФН- α , основными функциями которого являются снижение белоксинтетической функции, что препятствует вирусной репликации, и повышение устойчивости соседних клеток к проникновению вирусов. ИФН- γ , секретируемый лимфоцитами, после распознавания антигенов (прямого или в результате антигенной презентации) реализует антипролиферативное и противовирусное (менее выраженное, чем у ИФН- α/β) действие, активирует макрофаги и гранулоциты, индуцирует экспрессию МНСII или МНСI, повышает активность НК-клеток и Т-киллеров, стимулирует дифференцировку и подавляет пролиферацию В-лимфоцитов. На рис. 1 представлено схематичное изображение основных эффектов ИФН- α и ИФН- γ .

В данной работе мы приводим описание алгоритма проведения исследования интерферонового статуса (ИС) в варианте исполнения с использованием иммуноферментного анализа (ИФА), применяемого в клинико-диагностических лабораториях в настоящее время. Отсутствие стандартной методики проведения исследования ИС и использование различных подходов к регистрации результатов исследования ИС (биологическим или ИФА-методом) является актуальной проблемой, поскольку у врачей, получающих результаты анализа ИС от разных лабораторий,

возникают затруднения при их интерпретации. При этом использование разных способов регистрации результатов ограничивает возможность отслеживания изменений параметров ИС при наблюдении в динамике.

Одна из задач данной работы — показать преимущества проведения исследования ИС методом ИФА, как лучше поддающимся унификации, и описать его наименее стандартизованные этапы. Кроме того, в качестве важных задач мы определили: провести ретроспективный анализ базы данных результатов исследований ИС, определить референсные значения (РЗ) показателей ИС тремя непрямыми методами и предложить оптимальный; сравнить полученные РЗ с используемыми в настоящее время, оценить необходимость их корректировки и выделить возрастные группы, для которых целесообразно установление собственных РЗ. Унификация метода проведения исследования ИС *in vitro* в различных лабораториях и наличие актуальных РЗ, рассчитанных на основании большого массива данных, позволят избежать ошибок при интерпретации результата и повысить клиническую значимость анализа.

Цель исследования — рассмотреть проблемы стандартизации проведения исследования ИС с поиском

возможных путей унификации метода и рассчитать РЗ на основании большого массива данных.

Материалы и методы

Ретроспективная статистическая обработка базы данных исследований ИС, выполненных в клинико-диагностическом отделе лабораторного центра ООО «Экзактэ Лабс» в период с сентября 2020 г. по август 2022 г., проводилась с использованием 3 подходов для расчета РЗ: диапазон перцентиля 2,5–97,5, пределы $\pm 2SD$ и метод Bhattacharya для анализа данных. Общее количество проведенных исследований, включенных в анализ, — 4504 субъекта. Взрослые старше 18 лет составили 90 % (из них мужчины от 18 до 89 лет — 46,97 %, женщины от 18 до 94 лет — 53,03 %), дети до 18 лет — 10 % (из них мальчики — 49 %, девочки — 51 %).

Исследование ИС и определение индивидуальной чувствительности лейкоцитов (ИЧЛ) к иммуноактивным препаратам проводятся в цельной литий-гепариновой крови не позднее 30 ч после взятия. Краткий алгоритм проведения исследования представлен на рис. 2.

Базовый анализ ИС с использованием ИФА включает 5 показателей (количество ИФН- α/γ в ранее подготовленных пробах):

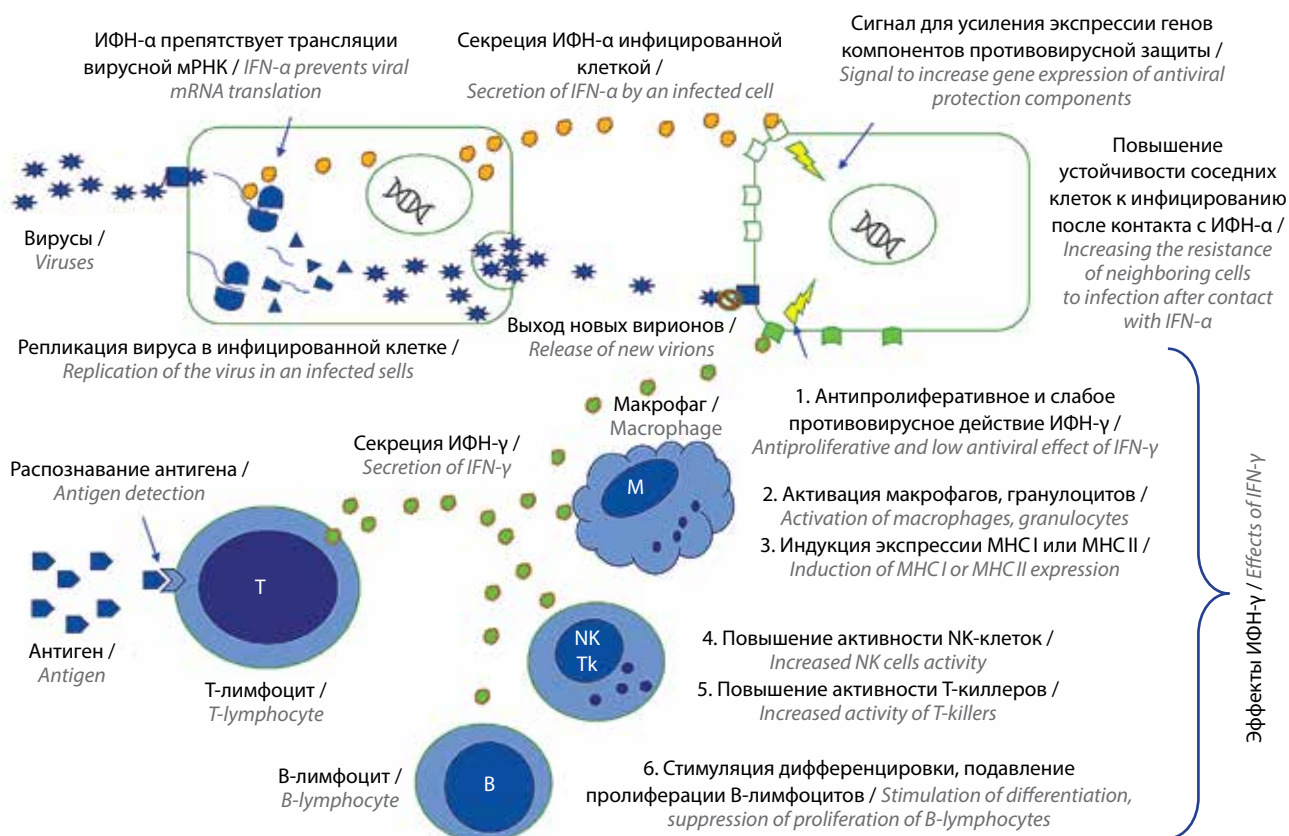


Рис. 1. Схематичное изображение основных эффектов интерферонов (ИФН) α и γ

Fig. 1. Schematic representation of the main effects of interferon (IFN) α and γ

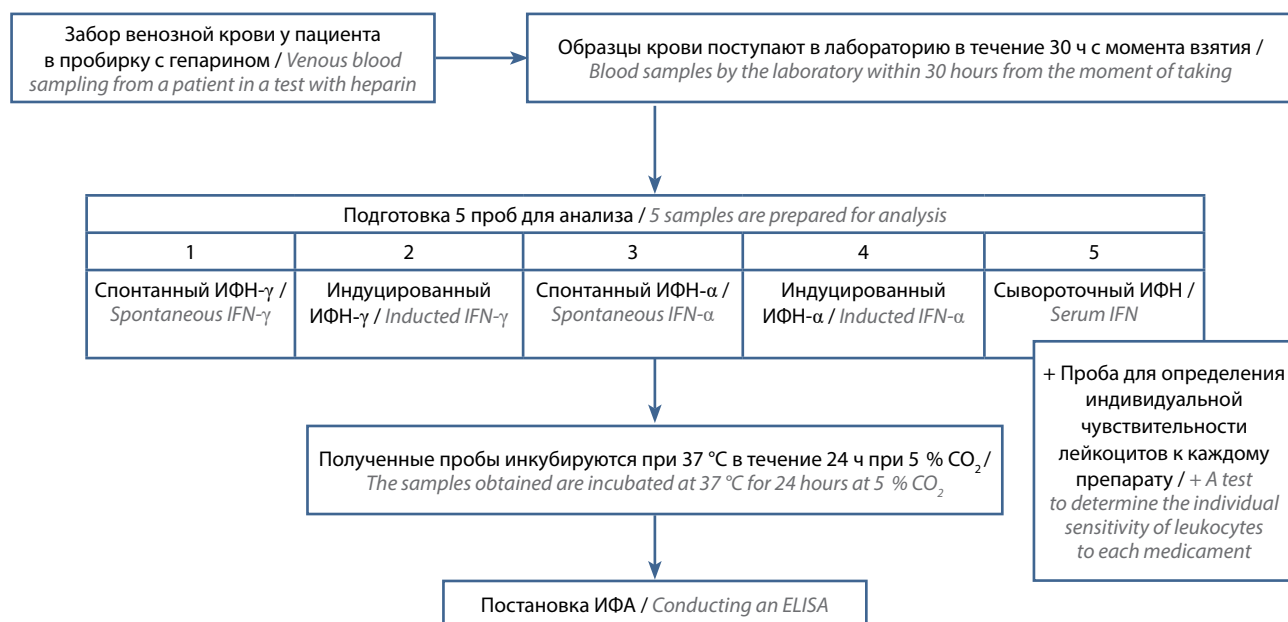


Рис. 2. Алгоритм проведения исследования интерферонового статуса и определения индивидуальной чувствительности к препаратам. ИФН – интерферон; ИФА – иммуноферментный анализ

Fig. 2. Algorithm for performing an interferon status analysis and detecting individual sensitivity to immune-active drugs. IFN – interferon; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay

- сывороточный ИФН;
- спонтанный ИФН-α;
- индуцированный ИФН-α;
- спонтанный ИФН-γ;
- индуцированный ИФН-γ.

При этом для каждого из них проводится индивидуальная пробоподготовка в 96-луночном планшете с U-образным дном и дополнительно для исследования ИЧЛ к каждому препарату.

Компоненты и способы подготовки инкубационных смесей для последующего измерения разных типов ИФН и определения ИЧЛ:

- 1) проба для определения спонтанного ИФН-γ: питательная среда RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) 225 мкл, содержащая 10 % сыворотки эмбриональной телячьей (фетальной бычьей сыворотки, ФБС) («ПанЭко», Россия), + 25 мкл цельной крови пациента;
- 2) проба для определения индуцированного ИФН-γ: питательная среда RPMI-1640 200 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл фитогемагглютинаина (ФГА) («ПанЭко», Россия) + 25 мкл цельной крови пациента;
- 3) проба для определения спонтанного ИФН-α: питательная среда RPMI-1640 225 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл цельной крови пациента;
- 4) проба для определения индуцированного ИФН-α: питательная среда RPMI-1640 200 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл стандартного индуктора ИФН-α + 25 мкл цельной крови пациента;

5) проба для определения содержания общего сывороточного ИФН: цельную кровь центрифугируют при 3000 об/мин, полученную плазму (170 мкл) отбирают в планшет и хранят при -20°C ;

6) проба для определения ИЧЛ: в стерильный планшет вносится питательная среда RPMI-1640 175 мкл, содержащая 10 % ФБС, + 25 мкл препарата (концентрация рассчитывается на основании $C_{\max}$, разовой или суточной дозы для каждого препарата) + 25 мкл цельной крови пациента.

Подготовленные пробы инкубируют при 37°C в течение 24 ч во влажной камере CO_2 -инкубатора. По окончании инкубации проводится отбор 170 мкл супернатанта опытных образцов из инкубационного планшета в пустой полипропиленовый планшет. Все пробы хранятся при -20°C до проведения анализа.

Для количественного определения ИФН использовались зарегистрированные коммерческие тест-системы на основе ИФА, такие как гамма-Интерферон-ИФА-БЕСТ (А-8752) и альфа-ИНТЕРФЕРОН-ИФА-БЕСТ (А-8758) производства АО «Вектор Бест» (Россия), согласно инструкции производителя. Измерение оптической плотности микропланшета для ИФА проводилось спектрофотометром iMark (Bio-Rad Laboratories, Inc, США). Расчет концентрации выполнялся с использованием калибровочных образцов из соответствующих наборов реагентов при помощи программного обеспечения MPM 6.3 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) с построением графика кусочно-линейной аппроксимации согласно инструкциям к наборам реагентов.

В данной работе были использованы обезличенные ретроспективные данные проведенных исследований ИС населения.

Результаты

Критерии отбора данных для непрямых методов вычисления референсных значений

В ходе работы были проанализированы ретроспективные данные, полученные в результате выгрузки базы данных из лабораторно-информационной системы по исследованиям ИС, проведенным в период с сентября 2020 г. по август 2022 г. С целью установления РЗ непрямими методами из расчета были исключены:

- 1) для показателя индуцированного ИФН- α – данные 674 субъектов, результаты которых не отвечали следующим критериям: значения концентраций сывороточного и спонтанных фракций ИФН <10 пг/мл; уровень индуцированного ИФН- γ >100 пг/мл, что соответствует нижней границе РЗ этого показателя; величина индуцированного ИФН- α >50 пг/мл, что отражает двукратное снижение ранее установленной нижней границы.
- 2) для показателя индуцированного ИФН- γ – данные 1091 субъекта, результаты которых не отвечали следующим критериям: значения концентраций сывороточного и спонтанных фракций ИФН <10 пг/мл; уровень индуцированного ИФН- α >100 пг/мл, что соответствует нижней границе РЗ этого показателя; величина индуцированного ИФН- γ >50 пг/мл, что отражает двукратное снижение ранее установленной нижней границы;

Для показателей спонтанного и сывороточного ИФН- γ/α критерии включения не применялись.

Проблемы стандартизации метода исследования интерферонового статуса

В настоящее время проведение исследования ИС предлагается многими лабораториями клинико-диагностического профиля в нашей стране, однако этот анализ выходит за рамки классических рутинных тестов, для которых есть регламентированная методология и доступные тест-системы, имеющие все необходимые реагентные компоненты в составе и утвержденную инструкцию. При этом существуют принципиально отличающиеся подходы к регистрации результатов. В одном случае это биологический метод, основанный на оценке задержки деструкции монослоя диплоидной культуры фибробластов или культуры клеток почки зеленой мартышки (Vero) после внесения тест-вируса (вирус везикулярного стоматита или вирус энцефаломиокардита мышей); во втором случае это количественное определение ИФН- α и ИФН- γ методом ИФА.

Предшествующий указанным методам «макрометод», проводившийся на выделенных лимфоцитах

и требующий большого объема крови, в настоящее время не применяется [3, 6].

Методология проведения исследования ИС и ИЧЛ базируется на патентах и трудах С.С. Григорян, Ф.И. Ершова [7–9] и описана в практических рекомендациях [10].

Выполнение исследования ИС требует участия высококвалифицированных специалистов, обладающих компетенциями преимущественно в области клеточной биологии, и наличия большого перечня оборудования и реагентной базы. При этом проведение исследования в варианте количественного определения ИФН методом ИФА с использованием коммерчески доступных тест-систем обладает рядом преимуществ, связанных с отсутствием необходимости поддержания клеточных линий (Vero, ФЛЭЧ, ЛЭЧ, ФЭЧ, М-19, М-22 и т. п.), использования тест-вируса (вирус везикулярного стоматита или вирус энцефаломиокардита мышей), и большими возможностями для стандартизации методики и объективной регистрации результатов с помощью спектрофотометра. В связи с этим в настоящее время предпочтение отдается варианту с методом ИФА.

Использование коммерческих наборов для определения ИФН стандартизует этап регистрации результатов исследования, однако перед исследователем встает ряд не описанных в доступных источниках вопросов этапа пробоподготовки. Основными из них являются количество эталонных индукторов (ЭИ) для добавления в инкубационную смесь и необходимая концентрация иммуноактивных препаратов для определения ИЧЛ.

Важность концентрации ЭИ и препаратов, используемых в инкубационных смесях, обусловлена рядом факторов. Наиболее важным из них является недопущение применения как экстремально высоких доз ЭИ и препаратов, которые могут оказать токсический эффект, так и низких концентраций, неспособных оказать достаточное стимулирующее влияние на лейкоциты или в случае с препаратами корректирующее/корригирующее действие. При этом в доступных источниках, патентах [7] отражается только объем (20 мкл) добавляемого раствора ЭИ и указание на использование разовой и/или суточной терапевтической дозы для иммуноактивных препаратов.

Унификация используемых концентраций эталонных индукторов

Важный аспект проведения исследований клинико-диагностического профиля – достижение максимально возможной меж-/внутрилабораторной воспроизводимости полученных результатов. В случае с проведением исследования ИС наиболее уязвимыми в плане стандартизации и при этом оказывающими существенное влияние на результат являются

концентрации применяемых ЭИ. Для оценки индуцированного синтеза ИФН лейкоцитами *in vitro* в качестве индуктора синтеза ИФН- α применяется вирус болезни Ньюкасла. ЭИ синтеза ИФН- γ — ФГА (митоген). Возможным решением может служить установление и использование оптимальных концентраций ЭИ. При этом надо учитывать, что в качестве ЭИ ИФН- α используется вирус болезни Ньюкасла, инфекционный титр которого может меняться в разных сериях, о чем свидетельствует наш собственный многолетний опыт. Поэтому следует проводить сравнительные испытания каждой новой серии с текущей для корректировки необходимого объема и концентрации ЭИ. Это позволяет минимизировать влияние вариативности инфекционного титра ЭИ на результат исследования и обеспечивает возможность корректной оценки изменения результатов ИС пациентов в динамике.

Важным аргументом в пользу необходимости подбора оптимальной концентрации ФГА (индуктора ИФН- γ) является использование результатов ФГА-индуцируемых проб для расчета корректирующего действия иммуноактивного препарата. Для расчета ИЧЛ к препаратам в качестве базового уровня используют значение концентрации, полученное после инкубации стандартной разведенной крови пациента с ФГА, которую сравнивают с аналогичной, но с добавлением препарата.

В зависимости от значений коэффициента корректирующего действия различают 5 вариантов индивидуальной чувствительности к иммуноактивным препаратам [7, 10]:

- <1 — иммунотоксичность (подавление продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной);
- 1 — отсутствие чувствительности (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной не определяется);
- 2 — слабая чувствительность (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 2 раза);
- 3 — умеренно выраженная (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 3 раза);
- 4 — выраженная (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной в 4 раза);
- >4 — сильно выраженная (увеличение продукции ИФН- γ лейкоцитами крови пациента в присутствии препарата относительно исходной более чем в 4 раза).

Принципиальным является подбор концентрации ФГА, способной стимулировать лейкоциты периферической крови таким образом, чтобы, с одной сто-

роны, сила активации была достаточной для синтеза значимого уровня ИФН- γ , с другой стороны, чтобы сохранить потенциал к увеличению секреции ИФН- γ иммуноактивным препаратом. При высокой концентрации ФГА в среде с лимфоцитами происходит их чрезмерная активация с массивным цитокиновым выбросом, что приводит к их истощению. К тому же высокая концентрация измеряемого ИФН- γ нивелирует возможное его повышение за счет корректирующего действия препарата. Некорректный подбор концентрации ФГА может существенно исказить результаты исследования ИС. В случае с использованием неоправданно низкой концентрации ФГА результат исследования будет ошибочно отражать недостаточность индуцированной секреции ИФН- γ . При этом на фоне низкого значения индуцированного ИФН- γ иммуноактивные препараты могут оказать выраженный псевдоэффект кратным увеличением секреции ИФН- γ , что, в свою очередь, приведет к ошибочной интерпретации результата врачами-клиницистами и неоправданному назначению препаратов для коррекции системы ИФН.

Иммуноактивные препараты для определения индивидуальной чувствительности лейкоцитов

Определение ИЧЛ к иммуноактивным препаратам является важной составляющей исследования ИС. В основе лежит потенциальная возможность иммуномодулирующих препаратов влиять на секрецию ИФН, повышая резистентность организма преимущественно к вирусным заболеваниям. Наиболее оптимальным и распространенным вариантом определения ИЧЛ в исследовании ИС является измерение ИФН- γ в образцах плазмы крови, предварительно инкубированной с ФГА и исследуемым препаратом, и сравнения полученного значения с уровнем ИФН- γ в пробе, предварительно инкубированной только с ФГА [7].

Проблема унификации метода заключается в отсутствии стандартизованных указаний оптимальных концентраций используемых препаратов. В патенте С.С. Григоряна, Р.А. Арутюняна [7] имеется лишь упоминание о целесообразности использования разовой или суточной терапевтической доз. Понимая, что для получения релевантной информации о влиянии препарата на лейкоциты крови необходимо приблизить концентрацию препарата *in vitro* к физиологически возможной, целесообразно определять оптимальную концентрацию каждого препарата путем его титрования, опираясь на данные $C_{\max}$. Проведение серий установочных экспериментов с использованием различных концентраций препаратов по обе стороны от $C_{\max}$ позволит определить оптимальную для дальнейшего использования концентрацию. Критически важным при этом является

определение токсических концентраций для недопущения использования таковых.

Определение индивидуального корректирующего действия иммуноактивных препаратов (ИФН и его индукторы, вакцины, иммуномодуляторы), способных наилучшим образом оказывать влияние на состояние пациента с профилактической и лечебной целью, является важным шагом к персонализированной медицине. Коррекция дефектов системы ИФН позволяет повысить резистентность организма, оказывать положительное влияние при различных патологических состояниях.

Клиническая значимость исследования интерферонового статуса

Исследование ИС позволяет оценивать состояние неспецифической резистентности организма, которое является значимым показателем врожденного иммунитета и служит интегральным критерием функционального состояния системы ИФН [10].

Оценка ИЧЛ пациента к различным иммуноактивным препаратам дает возможность выбрать терапевтически наиболее эффективный препарат и определить оптимальную тактику лечения с мониторингом показателей ИС в динамике.

Показания для назначения исследования ИС могут быть следующими: острые и хронические формы вирусных инфекций, рецидивирующие оппортунистические инфекции, аллергические и аутоиммунные заболевания, врожденные и приобретенные дефекты системы ИФН, мониторинг показателей ИС как критерия эффективности и контроля предложенной терапии, клинические исследования иммуноактивных препаратов.

Базовая оценка показателей ИС может выявить различные состояния организма.

- Острая фаза инфекционного заболевания сопряжена с повышением уровня сывороточного ИФН и снижением показателей индуцированной выработки ИФН. При аллергических заболеваниях (бронхиальная астма, крапивница) уровень циркулирующего ИФН коррелирует с тяжестью заболевания.
- Снижение ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов крови в сочетании с наличием продукции спонтанного ИФН- α и/или ИФН- γ и отсутствием циркулирующего в крови сывороточного ИФН может свидетельствовать о персистирующей вирусной или другой внутриклеточной инфекции.
- Снижение ИФН-продуцирующей способности лейкоцитов крови в сочетании с отсутствием циркулирующего в крови сывороточного ИФН свидетельствует о дефектности системы ИФН, что может быть и причиной, и следствием острых

и хронических вирусных заболеваний и рассматриваться как показание для ИФН-стимулирующей терапии.

- Хронические вирусные инфекции (герпес, гепатит), рассеянный склероз и др. сопровождаются подавлением всех показателей ИС.
- Аутоиммунные заболевания (системная красная волчанка, ревматоидный артрит и др.) характеризуются подавлением индуцируемой продукции ИФН- α .
- Подавленная индуцируемая продукция ИФН- γ сопровождается злокачественными образованиями (острый лимфолейкоз и др.).

Результаты исследования ИС следует рассматривать в комплексе с остальными лабораторными и клинико-анамнестическими данными. Оценка выявляемых изменений может служить ориентиром при диагностике, лечении и прогнозе заболеваний как вирусной, так и невирусной этиологии.

Определение референсных значений

Интерпретируя результаты полученного анализа, врач, помимо клинической картины, прежде всего, ориентируется на РЗ. Для недопущения ошибочной трактовки результата проведенного исследования необходимо с особой осторожностью подходить к установлению референсных интервалов. Референсный интервал – статистический показатель, двумя пределами ограничивающий центральный 95 % диапазон РЗ [11]. Несмотря на то что в действующем руководстве CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов) рекомендуется прямой метод определения референсных интервалов [12], члены комитета IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Международная федерация клинической химии и лабораторной медицины) считают оправданным в ряде случаев использование непрямого метода [13], с помощью которого проводилось уточнение РЗ для исследования ИС в данной работе. Референсные интервалы при непрямом методе рассчитываются с помощью специальных математических инструментов, в частности с использованием анализа Bhattacharya и его модификаций [12], методов Hoffman [14], F. Arzideh и соавт. [15], которые менее чувствительны к присутствию патологических результатов по сравнению с классическими параметрическим или непараметрическим методами. Упомянутые выше не прямые методы предъявляют жесткие требования к нормальному распределению данных [16, 17] и требуют предварительного исключения выпадающих, патологичных результатов методами Рида или Tukey, попытка применения которых для имеющихся данных выявила их несоответствие критериям распределения.

Поскольку базовое исследование ИС включает 5 показателей, которые характеризуют интерфероновую систему как компонент врожденного иммунитета и в меньшей степени общее состояние иммунной системы, были предложены критерии ретроспективного включения субъектов, которые опираются на все показатели, для исключения попадания в анализируемую выборку патологических результатов.

Ретроспективная статистическая обработка базы данных исследований ИС, выполненных в период с сентября 2020 г. по август 2022 г., проводилась с использованием 3 подходов для расчета РЗ: диапазон перцентиля 2,5–97,5, пределы $\pm 2SD$ и метод Bhattacharya для анализа данных. Как указано выше, в анализ были включены данные по 4504 субъектам: дети до 18 лет – 10 % (из них мальчики – 49 %, девочки – 51 %), взрослые старше 18 лет – 90 % (из них мужчины от 18 до 89 лет – 46,97 %, женщины от 18 до 94 лет – 53,03 %).

В табл. 1 представлены результаты анализа базы данных по ретроспективному уточнению РЗ отобранной группы субъектов, в табл. 2 – результаты указанного анализа с разделением на возрастные группы (до 18 лет и от 18 лет). Данные, приведенные в табл. 1, 2, отражают результаты расчетов по определению РЗ для групп, удовлетворяющих предложенным критериям включения (проведен расчет параметрическим методом двух стандартных отклонений в обе стороны от среднего значения ($\pm 2SD$); непараметрическим методом вычислен диапазон перцентиля 2,5–97,5;

показаны результаты, полученные методом Bhattacharya, только для показателя индуцированного ИФН- α , данные для расчета остальных показателей не отвечают требованиям нормального распределения).

Результаты вычислений, представленные в табл. 1 и 2, свидетельствуют о наличии расхождения с ранее принятыми РЗ и необходимости их корректировки. Расчет РЗ методом Bhattacharya удалось провести только для показателя индуцированного ИФН- α , данные для остальных показателей не отвечают требованиям нормального распределения и расчет не представляется возможным. Поэтому использование этого метода неприменимо к расчету РЗ для всего исследования. Результаты расчетов путем вычисления $\pm 2SD$ и диапазона 2,5–97,5-го перцентиля показали весьма схожие значения. Поскольку РЗ, полученные методом расчета 2,5–97,5-го перцентиля, больше приближены к ранее установленным РЗ, которые, безусловно, требуют корректировки, предлагается отдать приоритет этим значениям.

Важным выводом из проведенного исследования является необходимость разделения РЗ по возрастным группам – до и после 18 лет, что, несомненно, отражает и физиологические особенности.

Исследование ИС позволяет получить информацию о состоянии системы ИФН. Индукция выработки ИФН с использованием ЭИ показывает возможность лейкоцитов крови вырабатывать ИФН- γ/α , при этом количество секретированных типов ИФН зависит от степени индуцирующего влияния (концентрации

Таблица 1. Результаты расчета референсных значений, пг/мл

Table 1. Results of the calculation of the reference values, pg/ml

Показатель интерферонового статуса Interferon status parameters	Ранее принятые РЗ Previously accepted RV	Результаты расчета новых РЗ The results of the calculation of new RV		
		$\pm 2 SD$	2,5–97,5-й перцентиль 2,5–97,5 th percentile	Bhattacharya, $\pm 2 SD$
Сывороточный ИФН Serum IFN	0–10	0–12,8	0–14,5	N/A
Спонтанный ИФН- α Spontaneous IFN- α	0–50	0–8,5	0–14,5	N/A
Индукцированный ИФН- α Induced IFN- α	100–500	58–759	60–759	41–1349
Спонтанный ИФН- γ Spontaneous IFN- γ	0–100	0–9,6	0–9,5	N/A
Индукцированный ИФН- γ Induced IFN- γ	100–2000	135–4467	123–3715	N/A

Примечание. Здесь и в табл. 2: РЗ – референсные значения; ИФН – интерферон; SD – стандартное отклонение; N/A – метод статистической обработки неприменим, поскольку полученные значения для расчета не отвечают требованиям нормального распределения.

Note. Here and in table 2: RV – reference values; IFN – interferon; SD – standard deviation; N/A – the method of statistical processing is not applicable, because the obtained values for calculation do not satisfy the requirements of a normal distribution.

Таблица 2. Результаты расчета референсных значений для групп, удовлетворяющих предложенным критериям включения, с разделением на группы по возрасту, пг/мл

Table 2. The results of the calculation of the reference values for groups meeting the proposed inclusion criteria, divided into groups according to the age, pg/ml

Показатель интерферонов Interferon status parameters	Ранее принятые РЗ Previously accepted RV	Результаты расчета новых РЗ The results of the calculation of new RV					
		До 18 лет Up to 18 y. o.			От 18 лет Over 18 y. o.		
		±2 SD	2,5–97,5-й перцентиль 2,5–97,5 th percentile	Bhattacharya, ±2 SD	±2 SD	2,5–97,5-й перцентиль 2,5–97,5 th percentile	Bhattacharya, ±2 SD
Сывороточный ИФН Serum IFN	0–10	0–13,3	0–14	N/A	0–12,7	0–14,5	N/A
Спонтанный ИФН-α Spontaneous IFN-α	0–50	0–9,3	0–13	N/A	0–8,4	0–9,3	N/A
Индукцированный ИФН-α Induced INF-α	100–500	59–1122	59–1023	79–794	59–708	60–708	36–1445
Спонтанный ИФН-γ Spontaneous INF-γ	0–100	0–7	0–7,8	N/A	0–10	0–9,7	N/A
Индукцированный ИФН-γ Induced INF-γ	100–2000	69–2291	78–2570	N/A	155–4677	151–3802	N/A

ЭИ). Однако целесообразно оценивать степень силы секреции, соотнося ее с количеством лимфоцитов в реакционной смеси (их количество физиологически значительно различается в популяции), или, по крайней мере, если количество лейкоцитов находится в диапазоне установленных РЗ, — по результатам общего анализа крови. Широкий диапазон физиологического колебания количества лейкоцитов в популяции не позволит интерпретировать результат и делать заключение в отрыве от клинической картины и данных как минимум общего анализа крови.

Спорным остается наличие верхней границы РЗ для индуцированных типов ИФН, поскольку важным диагностическим критерием является оценка функциональной полноценности и потенциальной возможности секреции ИФН лимфоцитами, и превышение верхней границы РЗ может ввести в заблуждение, показывая сомнительную клиническую значимость.

Закключение

Стандартизация проведения исследований клинико-диагностического профиля наиболее сложно реализуема для методов, которые не имеют утвержденного алгоритма с описанием всех этапов проводимого анализа, а основываются на патентах, практических рекомендациях и пр. В случае с исследованием

ИС в варианте исполнения с использованием коммерческих ИФА-наборов стандартизован 2-й этап исследования, который подразумевает количественное определение ИФН в образцах, подготовленных на 1-м этапе. На этапе пробоподготовки перед исследователем встает ряд не описанных в доступных источниках вопросов. Основными из них являются количество ЭИ для добавления в инкубационную смесь и необходимая концентрация иммуоактивных препаратов в реакционной смеси для определения ИЧЛ. Подбор оптимальных концентраций ЭИ и препаратов с их стандартизацией является краеугольным камнем для качественного проведения исследования ИС и ИЧЛ и возможности его межлабораторной воспроизводимости.

Многообразие методов расчета РЗ результатов лабораторных анализов свидетельствует об отсутствии универсального подхода, который отвечал бы всем требованиям. Предпочтение отдается прямым методам, когда исследуется популяция условно здоровых субъектов с заранее установленными критериями включения. Однако и такой подход не лишен недостатков, обусловленных экономическими соображениями, ограничивающими, в первую очередь, количество субъектов для исследования, и критериями, определяющими состояние здоровья участников, применение которых не исключает попадания патологических результатов в выборку. Непрямые

методы позволяют использовать и обрабатывать большие массивы информации, ежедневно генерируемые клинико-диагностическими лабораториями. Преимуществом такого подхода является анализ данных большого количества субъектов без проведения целенаправленных мероприятий по предварительному отбору, при этом базы данных, содержащие информацию по тысячам субъектов, нивелируют влияние патологических значений за счет большой выборки и позволяют формировать референс-зависимые возрастные группы. Основная проблема при ретроспективном расчете РЗ с использованием накопленной

базы данных — необходимость поиска и исключения выпадающих патологических значений субъектов, но методы статистического анализа и наличие дополнительных данных для установления критериев ретроспективного включения в значительной степени решают эту задачу.

Предложенные в данной работе уточнения РЗ с распределением на возрастные группы могут значительно повысить диагностическую значимость проводимого исследования, исключая некорректную интерпретацию полученных результатов, и в большей степени коррелировать с клинической картиной.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kopitar-Jerala N. The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. *Front Immunol* 2017;8:873. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00873
- Ершов Ф.И., Новохватский А.С. Интерферон и его индукторы. М.: Медицина, 1980. 173 с.
Ershov F.I., Novokhvatkiy A.S. Interferon and its inducers. Moscow: Meditsina, 1980. 173 p. (In Russ.).
- Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. М.: Медицина, 1981. 400 с.
Solovyov V.D., Bektemirov T.A. Interferon in the theory and practice of medicine. Moscow: Meditsina, 1981. 400 p. (In Russ.).
- Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005. 368 с.
Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and their inducers (from molecules to drugs). Moscow: GEOTAR-Media, 2005. 368 p. (In Russ.).
- Плейфайер Ж., Чейн Б.М. Наглядная иммунология. 20-е изд. перераб. и дополн. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 120 с.
Pleyfeyer G., Cheyne B.M. Transparent immunology. 20th edn. revised and enlarged. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. 120 p. (In Russ.).
- Doldi K., Leroux M., Augustin R. et al. Proliferation and interferon production in whole blood samples and isolated lymphocyte preparations. *J Interferon Res* 1985;5(1):55–64. DOI: 10.1089/jir.1985.5.55
- Григорян С.С., Арутюнян Р.А. Способ определения индивидуальной чувствительности лейкоцитов крови людей к лекарственному препарату. Патент РФ № 2324705, 15.06.2009.
Grigoryan S.S., Arutyunyan R.A. The method for determining the sensitivity of the individual human blood leukocytes to the drug. Patent RU No. 2324705 dated 15.06.2009. (In Russ.).
- Григорян С.С., Майоров И.А., Иванова А.М. и др. Оценка интерферонов статуса людей по пробам цельной крови. Вопросы вирусологии 1988;3(4):433–6.
Grigoryan S.S., Maiorov I.A., Ivanova A.M. et al. Evaluation of the interferon status of people on samples of whole blood. *Voprosy virusologii = Questions of Virology* 1988;3(4):433–6. (In Russ.).
- Ершов Ф.И., Готовцева Е.П., Носик Н.Н. Интерфероновый статус в норме. *Иммунология* 1986;3:52–4.
Ershov F.I., Gotovtseva E.P., Nosik N.N. Interferon status is normal. *Immunology* 1986;3:52–4.
- Оспельникова Т.П., Колодяжная Л.В., Табаков В.Ю. Определение интерферонов статуса как показателя неспецифической резистентности организма человека. Практические рекомендации. М., 2018. 26 с.
Ospelnikova T.P., Kolodyazhnaya L.V., Tabakov V.Yu. Determination of interferon status as an indicator of nonspecific resistance of the human body. Practical recommendations. Moscow, 2018. 26 p. (In Russ.).
- Евгина С.А., Савельев Л.И. Современные теория и практика референтных интервалов. Лабораторная служба 2019;8(2):36–44. DOI: 10.17116/labs2019802136
Evkina S.A., Saveliev L.I. Modern theory and practice of reference intervals. *Laboratornaya sluzhba = Laboratory service* 2019;8(2):36–44. (In Russ.). DOI: 10.17116/labs2019802136
- CLSI Document C28-A3c. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Approved guideline – third edition. Wayne, Pa., USA: CLSI, 2010.
- Jones G., Haeckel R., Loh T. et al. Indirect methods for reference interval determination – review and recommendations. *Clin Chem Lab Med* 2019;57(1):20–9. DOI: 10.1515/cclm-2018-0073
- Hoffmann R.G. Statistics in the practice of medicine. *JAMA* 1963;185:864–73. DOI: 10.1001/jama.1963.03060110068020
- Arzideh F., Wosniok W., Gurr E. et al. A plea for intra-laboratory reference limits. Part 2. A bimodal retrospective concept for determining reference limits from intra-laboratory databases demonstrated by catalytic activity concentrations of enzymes. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(8):1043–57. DOI: 10.1515/CCLM.2007.250
- Concordet D., Geffré A., Braun J.P. et al. A new approach for the determination of reference intervals from hospital-based data. *Clin Chim Acta* 2009;405(1–2):43–8. DOI: 10.1016/j.cca.2009.03.057
- Mining your routine data for reference intervals: Hoffmann, Bhattacharya and maximum likelihood. The Lab-R-torian. Available at: <https://labrtorian.com/2017/09/05/mining-your-routine-data-for-reference-intervals-hoffman-bhattacharya-and-maximum-likelihood> (accessed 05.10.2022).

Вклад авторов

А.В. Лобов, Е.А. Погодина, П.И. Иванова, Н.В. Угарова: получение данных для анализа, анализ полученных данных, сбор и анализ данных литературы, написание текста статьи;

И.Ж. Шубина, Е.В. Сорокина: разработка дизайна статьи, подготовка текста, анализ источников литературы.

Author's contributions

A.V. Lobov, E.A. Pogodina, P.I. Ivanova, N.V. Ugarova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, collection and analysis of literature data, writing the article;

I.Zh. Shubina, E.V. Sorokina: review design development, text preparation, analysis of literary sources.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.В. Лобов / A.V. Lobov: <https://orcid.org/0000-0002-4703-5863>

Е.А. Погодина / E.A. Pogodina: <https://orcid.org/0000-0002-0421-3287>

П.И. Иванова / P.I. Ivanova: <https://orcid.org/0000-0002-3481-2854>

Н.В. Угарова / N.V. Ugarova: <https://orcid.org/0000-0001-5588-5596>

Е.В. Сорокина / E.V. Sorokina: <https://orcid.org/0000-0002-1188-6578>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 14.10.2022. Принята к публикации: 11.11.2022.

Article submitted: 14.10.2022. Accepted for publication: 11.11.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49>

Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки

Д.С. Кутилин, М.А. Гусарева, Н.Г. Кошелева

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

Контакты: Денис Сергеевич Кутилин k.denees@yandex.ru

Введение. Предоперационная лучевая терапия злокачественных опухолей прямой кишки не всегда эффективна, что связано с формированием радиорезистентности опухолевых клеток. Последняя может быть опосредована aberrантной копийностью генетических локусов.

Цель исследования – поиск молекулярно-генетических маркеров для малоинвазивной оценки эффективности лучевой терапии злокачественных опухолей прямой кишки.

Материалы и методы. Исследование проводили в 4 этапа: 1) биоинформационный анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) с использованием алгоритма GISTIC; 2) валидация данных биоинформационного анализа в модельном эксперименте на клеточной культуре; 3) исследование особенностей копийности генов, валидированных в модельном эксперименте, у пациентов с разным ответом на лучевую терапию; 4) определение показателя копийности генов во внеклеточной ДНК у пациентов с разным ответом на лучевую терапию. В исследовании добровольно участвовали 100 пациентов с аденокарциномой (G₁₋₂) прямой кишки, а также 30 условно здоровых индивидуумов. Радиотерапию осуществляли по стандартному протоколу (разовая очаговая доза 2,4 Гр, суммарная очаговая доза 54 Гр) на линейном ускорителе Novalis TX. Показатель относительной копийности генетических локусов оценивали методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Результаты. Биоинформационный анализ выявил 32 локуса-кандидата. Валидация этих маркеров на клетках HT-29, подвергнутых облучению, показала, что уровень копийности *CASP9*, *BRCA2*, *H2AX* и *RBBP8* был повышен, а копийности *BCL2* снижен относительно клеток, не подвергнутых облучению. У 74 пациентов с частичным ответом на лучевую терапию было обнаружено повышение копийности *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* и *BCL2*, что положительно коррелировало с показателем копийности этих генов во внеклеточной ДНК плазмы крови.

Заключение. Применение комплексного подхода, основанного на биоинформационном анализе базы данных TCGA, моделировании лучевой терапии на культуре клеток и валидации выявленных маркеров на образцах тканей и крови больных аденокарциномой прямой кишки, позволило выявить ассоциацию количества копий генов *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* и *BCL2* с эффективностью предоперационной лучевой терапии.

Ключевые слова: рак прямой кишки, радиорезистентность, копийность генов, клеточные линии, апоптоз, репарация ДНК

Для цитирования: Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. Уровень копийности генетических локусов и малоинвазивная оценка эффективности лучевой терапии у больных раком прямой кишки. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):41–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49

Genetic locus copy number variation level and minimally invasive assessment of radiation therapy efficiency in rectal cancer patients

Denis S. Kutilin, Marina A. Gusareva, Natalia G. Kosheleva

National Medical Research Center for Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14 Liniya St., Rostov-on-Don 344037, Russia

Contacts: Denis Sergeevich Kutilin k.denees@yandex.ru

Background. Preoperative radiation therapy of rectum malignant tumors is not always effective, which is associated with tumor cells radioresistance formation. The latter may be mediated by the aberrant copy number of genetic loci.

Aim. The screening of molecular genetic markers for a minimally invasive assessment of the radiation therapy effectiveness for rectum malignant tumors.

Materials and methods. The study was carried out in 4 stages: 1) bioinformatic analysis of TCGA (The Cancer Genome Atlas) databases using the GISTIC algorithm; 2) validation of bioinformatics analysis data in a model experiment on cell culture; 3) study of genes copy number features validated in a model experiment in patients with different responses to radiation therapy; 4) determination of the gene copy number in cell-free DNA in patients with different responses to radiation therapy. 100 patients with rectum adenocarcinoma (G_{1-2}), as well as 30 apparently healthy individuals, took part in the work. Radiotherapy was carried out according to the standard protocol (single focal dose 2.4 Gy, total focal dose 54 Gy) on a Novalis TX linear accelerator. The relative copy number of genetic loci was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction.

Results. Bioinformatic analysis revealed 32 candidate genetic loci. Validation of these markers on irradiated HT-29 cells showed that the copy number of *BRCA2*, *H2AX*, *CASP9* and *RBBP8* genes was increased, while the copy number of *BCL2* gene was reduced relative to intact cells. In 74 patients with a partial response to radiation therapy, an increase in the copy number of *BRCA2*, *H2AX*, *RBBP8* and *BCL2* was found, which positively correlated with the copy number of these genes in blood plasma cell-free DNA.

Conclusion. The application of an integrated approach based on TCGA database bioinformatic analysis, radiation therapy modeling in cell culture and validation of the identified markers on tissue and blood samples of patients with rectal adenocarcinoma revealed *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* and *BCL2* genes copy number association with the preoperative radiation therapy effectiveness.

Keywords: rectal cancer, radioresistance, gene copy number variation, cell lines, apoptosis, DNA repair

For citation: Kutilin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. Genetic locus copy number variation level and minimally invasive assessment of radiation therapy efficiency in rectal cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):41–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-41-49

Введение

Злокачественные опухоли прямой кишки относятся к широко распространенным заболеваниям. Каждый год в мире обнаруживают около 1 млн новых случаев рака прямой кишки (РПК), который занимает 3-е место в структуре онкологической заболеваемости и 4-е место в структуре смертности от злокачественных новообразований [1]. В последние десятилетия в лечении этой патологии применяются комбинированные подходы, в большинстве из которых лучевая терапия (ЛТ) зарекомендовала себя как неотъемлемая их часть наравне с химиотерапией и хирургическим вмешательством. В настоящее время ЛТ может быть представлена как неoadъювантная методика в самостоятельном виде (короткий курс) или в сочетании с химиотерапией (длинный курс). При стандартном протоколе ЛТ проводится с разовой очаговой дозой (РОД) 2,4 Гр до суммарной очаговой дозы (СОД) 54 Гр [2, 3]. Однако достигнуть полного патоморфологического ответа при такой схеме, к сожалению, удается далеко не всегда. Так, в метаанализе N. Hearn и соавт. [4], обобщающем опыт лечения 1817 пациентов, было показано, что частота полного патологического ответа может достигать лишь 25 % при СОД 54 Гр. Отсутствие у пациентов ответа на предоперационную ЛТ связано, как правило, с радиорезистентностью определенной группы опухолевых клеток [5]. Последняя может быть опосредована, в частности, аномальной копийностью генов (copy number variation, CNV), представляющей собой особый тип вариабельности генетической информации,

отражающий дозу гена (число его копий) и опосредованно влияющий на его транскрипционную активность [6, 7]. Уровень CNV можно определять во внеклеточной ДНК (внДНК), циркулирующей в плазме крови [8].

Целью исследования стал поиск молекулярно-генетических маркеров для малоинвазивной оценки эффективности ЛТ злокачественных опухолей прямой кишки.

Материалы и методы

Для достижения поставленной цели исследование проводили в 4 этапа. На 1-м этапе был выполнен биоинформационный анализ базы данных TCGA (The Cancer Genome Atlas) для выявления аномального показателя CNV генов, ассоциированных с чувствительностью к ЛТ. На 2-м этапе была проведена валидация данных биоинформационного анализа в модельном эксперименте на клеточной культуре. На 3-м этапе были исследованы особенности CNV генов, валидированных в модельном эксперименте у пациентов, чувствительных и резистентных к проводимой ЛТ. На 4-м этапе проведено определение показателя CNV генов во внДНК пациентов, чувствительных и резистентных к проводимой ЛТ.

В исследование были включены 100 пациентов в возрасте 45–65 лет с аденокарциномой (G_{1-2}) прямой кишки, которые проходили лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России в 2019–2021 гг., а также 30 условно здоровых доноров (без онкологических

заболеваний). ЛТ проводили по стандартному протоколу (РОД 2,4 Гр, СОД 54 Гр) на линейном ускорителе Novalis TX (Varian, США). Пациенты, проходившие лечение, были распределены на группы в зависимости от ответа на ЛТ (подробнее см. в разделе «Результаты и обсуждение») (см. таблицу).

Распределение пациентов по группам в зависимости от ответа на лучевую терапию, n

Distribution of patients into groups depending on radiation therapy response, n

Ответ на лучевую терапию Radiation therapy response	2019 г. 2019	2020 г. 2020	2021 г. 2021
Полный ответ (TRG ₁₋₂) Full response (TRG ₁₋₂)	11	6	9
Частичный ответ/отсутствие ответа (TRG ₃₋₅) Partial response/no response (TRG ₃₋₅)	30	28	16
Всего пациентов Total number of patients	41	34	25

Модельный эксперимент был выполнен на культуре клеток человеческой аденокарциномы кишечника НТ-29. Для выращивания клеток использовали стандартные условия культивирования: питательная среда RPMI-1640 с 10 % эмбриональной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гарамицина, инкубация в стерильных плоскодонных флаконах при 5 % CO₂, 95 % влажности и 37 °C [9].

Для моделирования ЛТ использовали 2 схемы облучения — обе по 5 фракций через 24 ч: 1) РОД 5 Гр, изоэффективная СОД 37,5 Гр; 2) РОД 7 Гр, изоэффективная СОД 49,6 Гр. Радиотерапию проводили на линейном ускорителе Novalis TX (Varian, США) [8]. Ежедневно через 60 мин после ЛТ во всех флаконах меняли питательную среду и определяли общее количество клеток, а также количество мертвых клеток (в заменяемой среде) с помощью камеры Горяева. После 5 фракций ЛТ и проведения визуализации под микроскопом клетки НТ-29 удаляли с подложки плоскодонного флакона раствором Трипсина/Версена [10].

Для выделения ДНК из ткани или суспензии клеток использовали набор «ДНК-сорб В» (ООО «ИнтерЛабСервис, Россия»). Для экстракции вДНК из плазмы крови применяли набор реагентов «ДНК-Плазма-М» (ООО «ТестГен», Россия). Перед экстракцией вДНК образцы крови смешивали с 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,5), содержащим 150 мМ NaCl и 50 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, в соотношении 3:1, и далее отделяли плазму от клеточной фракции путем центрифугирования (1/3 ч, 400 g, 15 °C) [11].

Уровень относительной CNV генов определяли методом количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Дизайн последовательностей синтетических олигонуклеотидов (праймеров) для целевых локусов *ATM*, *AKT*, *BRIP*, *BRCA1/2*, *CDK1*, *CDKN1B*, *CCND1/3*, *HIST1*, *H2AX*, *KU70*, *EXO1*, *FGFR2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAP80*, *RNF168*, *RIF1*, *TOPB1*, *TP53*, *XRCC4*, *BAX*, *CASP8/3/9*, *MDM2*, *BCL2*, *RBBP8*, *EP-300*, *CFLIP*, *LIG4* и референсных локусов *ACTB*, *B2M*, *GAPDH* был осуществлен с помощью онлайн-сервиса Primer-Blast и базы данных GenBank NCBI (National Center for Biotechnological Information, Национальный центр биотехнологической информации США). Относительную CNV генов вычисляли по формуле [9]:

$$rCN = rCN_o / rCN_n = 1,92^{-\Delta Ct \text{ (опыт)}} / 1,92^{-\Delta Ct \text{ (контроль)}},$$

где rCN — CNV генов в опухолевой ткани относительно нормальной (или в облученных клетках относительно интактных); rCN_o — CNV генов в опухолевой ткани относительно референсного гена (или в облученных клетках относительно референсного гена); rCN_n — CNV генов в нормальной ткани относительно референсного гена (или в интактных клетках относительно референсного гена); Ct — значение порогового цикла амплификации гена в режиме реального времени; ΔCt — разница среднего геометрического Ct исследуемого гена и среднего геометрического Ct референсного гена; 1,92 — значение эффективности амплификации в режиме реального времени, рассчитанное как 10^{-1/k}, где k = (Ct + b)/logP₀ (b — коэффициент уравнения аппроксимации экспериментальных данных, P₀ — относительная концентрация) [9].

Статистический анализ выполняли с помощью прикладных пакетов программ Microsoft Excel 2013, IBM SPSS Statistics 23.0, языка программирования Python (библиотека SciPy) и языка R. Для построения тепловых карт и диаграмм Венна использовали собственные скрипты на языке R. Для идентификации областей генома, размер которых значительно увеличивался или уменьшался в ряде образцов опухолей, использовали данные TCGA и применяли алгоритм GISTIC [7].

Результаты и обсуждение

На 1-м этапе с использованием алгоритма GISTIC и открытой базы данных был проведен анализ областей генома, размер которых значительно изменялся (увеличивался или уменьшался) в ряде образцов опухолей. Анализ позволил выявить 32 локуса-кандидата (представлены на рис. 1). Выявленные гены-кандидаты вовлечены в регуляцию систем репарации ДНК, клеточного цикла и апоптоза.

Портал общих данных по геномным данным /
Genomic data common data portal

Пакет TGGABiolinks (Rstudio) /
Package TGGABiolinks (Rstudio)

GISTIC

AKT, ATM, BRIP, BRCA1, BRCA2, CDK1,
CDKN1B, CCND1, CCND3, EXO1, FGFR2,
HIST1, H2AX, KU70, PTEN, RAD50, RAP80,
RIF1, RNF168, TOPB1, TP53, XRCC4, BAX,
CASP8, CASP3, CASP9, MDM2, BCL2,
RBBP8, EP300, LIG4, C-FLIP

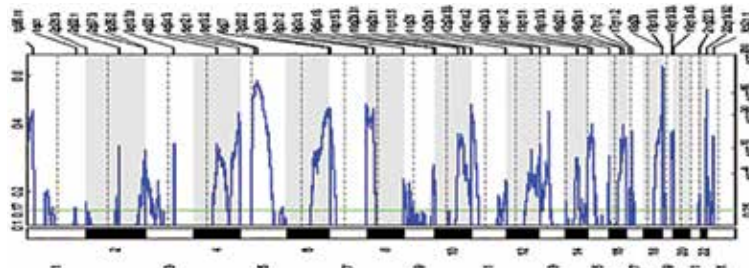
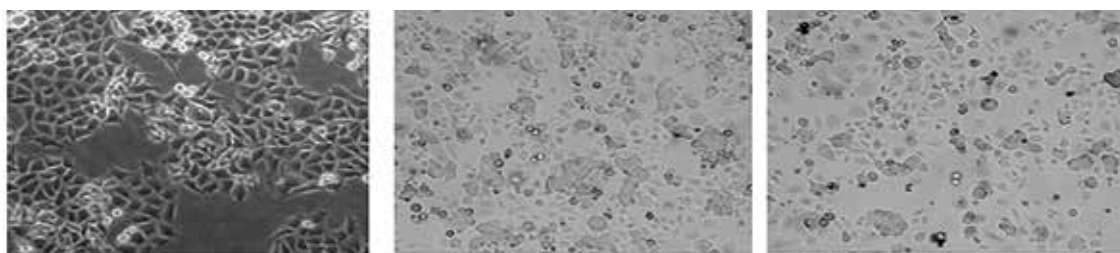


Рис. 1. Биоинформационный скрининг маркеров

Fig. 1. Bioinformatic screening of markers

a



б

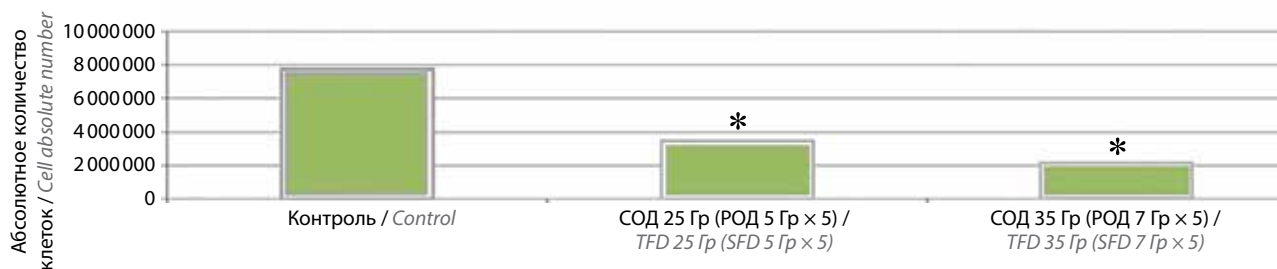


Рис. 2. Монослой клеток HT-29, интактных и после 5 фракций лучевой терапии (слева направо — контроль; СОД 25 Гр; СОД 35 Гр) (a); общее количество клеток в контроле и после облучения (б). СОД — суммарная очаговая доза; РОД — разовая очаговая доза. * $p < 0,05$

Fig. 2. Monolayer of HT-29 cells, intact and after 5 fractions of radiation therapy (from left to right — control; TFD 25 Gy; TFD 35 Gy) (a); cells total number in control and after radiation therapy (b). TFD — total focal dose; SFD — single focal dose. * $p < 0,05$

На 2-м этапе была проведена валидация кандидатов в предикторы радиорезистентности/радиочувствительности на образцах клеточной линии, интактных и подвергнутых облучению.

После 5 фракций ЛТ в дозе 5 Гр (СОД 25 Гр) выявлено значительное снижение общего количества клеток — на 56 % ($p < 0,05$), после 5 фракций ЛТ в дозе 7 Гр (СОД 35 Гр) — значительное снижение общего количества клеток — на 72 % ($p < 0,05$) (рис. 2). Соответственно, СОД 35 Гр оказалась более губительна для опухолевых клеток, чем СОД 25 Гр (элиминирующий эффект последней был на 16 % менее выражен, $p < 0,05$).

Молекулярно-генетическое исследование интактных клеток и подвергнутых ЛТ клеток позволило получить данные о дифференциальном показателе уровня относительной CNV 32 генов.

По уровню CNV в подвергнутых облучению и интактных клетках было выделено 4 кластера генов (рис. 3). На разных уровнях кластеризации обнаружено сходство по уровню CNV ряда генов в подвергнутых облучению и интактных клетках. Подобный эффект наша исследовательская группа наблюдала и ранее, объяснив его изначальной гетерогенностью клеточной линии HT-29 по CNV определенных генетических локусов, т. е. наличием клонов клеток с разным уровнем данного показателя по исследуемым локусам [6]. Внутриопухолевая гетерогенность при РПК до лечения очевидна. Так, в работе L.M. Frydrych и соавт. было показано, что ректальные опухоли состоят из множества генетически различных субклонов, которые могут содержать мутации или aberrантное количество копий генов, что может способствовать вариациям выживаемости в ответ на неоадьювантную

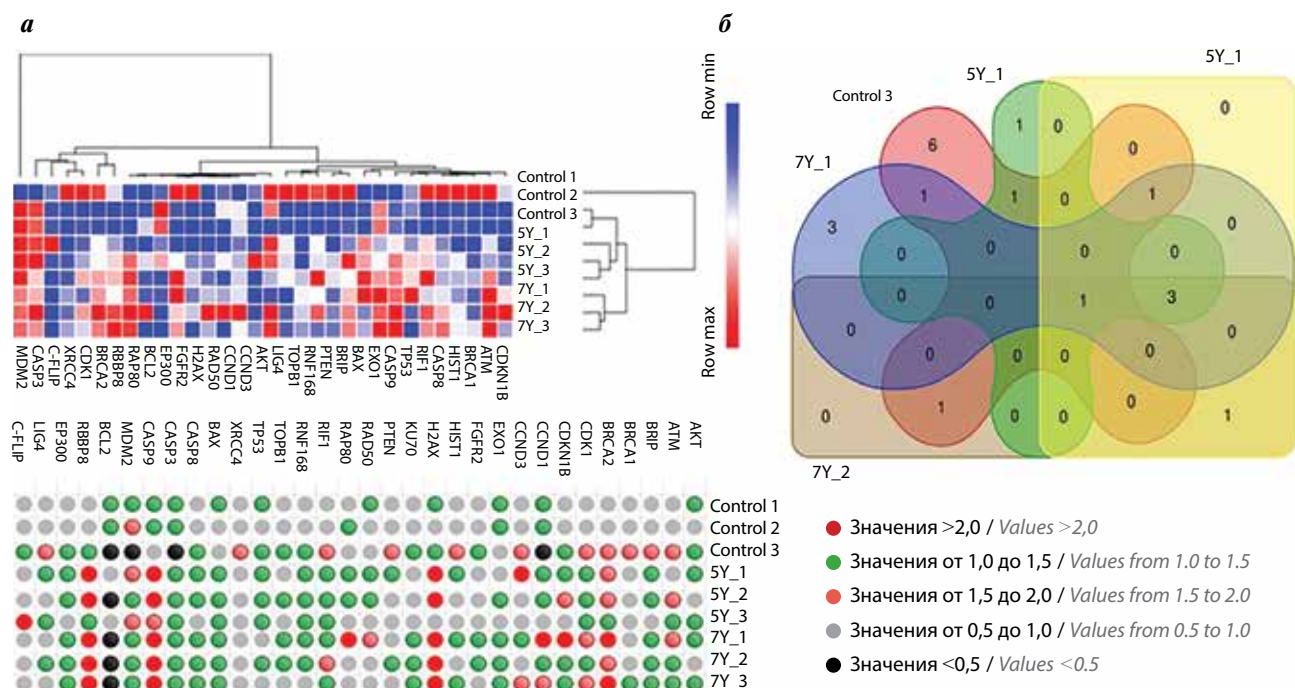


Рис. 3. Дифференциальный уровень копийности генов в подвергнутых облучению и интактных клетках HT-29 (9 групп: 3 контрольных (control 1–3), 3 облученных в дозе 5 Гр (5Y_1–3) и 3 в дозе 7 Гр (7Y_1–3)): а – тепловая карта и кластерный анализ данных копийности генов; б – диаграмма Эдвардса–Венна

Fig. 3. Copy number variation differential level in irradiated and intact HT-29 cells (9 groups: 3 controls (control 1–3), 3 irradiated at a dose of 5 Gy (5Y_1–3) and 3 at a dose of 7 Gy (7Y_1–3)): a) heat map and cluster analysis of copy number variation data; b) Edwards–Venn diagram

химиолучевую терапию. По данным авторов, устойчивые к ЛТ субклоны содержат мутации в генах *TP53*, *APC*, *ABCA13*, *MUC16* и *THSD4*, а также изменения количества копий этих генов [12]. Соответственно, проводимая ЛТ создает условия для выживания только клеток с определенным (абберантным) уровнем CNV генов [6] и определенным набором полиморфизмов.

В клетках HT-29, выживших после ЛТ при СОД 25 Гр, показатель CNV генов *RBBP8* и *CASP9* был увеличен статистически значимо ($p < 0,005$) по сравнению с интактными клетками – в 1,6 и 1,5 раза соответственно. В клетках, выживших после облучения при СОД 35 Гр, были увеличены показатели CNV генов *BRCA2* в 2,5 раза ($p < 0,05$), *H2AX* в 3,2 раза ($p < 0,005$), *CASP9* в 1,6 раза ($p < 0,05$), *RBBP8* в 1,6 раза ($p < 0,05$) и снижен показатель CNV *BCL2* в 3,6 раза ($p < 0,005$) относительно интактных клеток (рис. 4).

Вероятно, что выжившие после ЛТ клетки HT-29 изначально имели более стабильную систему восстановления повреждений ДНК благодаря большому числу копий локусов *RBBP8*, *BRCA2* и *H2AX*, а также более чувствительную систему инициации апоптоза благодаря большому числу копий проапоптозного гена *CASP9* и меньшему числу копий антиапоптозного гена *BCL2*.

Поиску молекулярных маркеров радиорезистентности РПК на клеточных линиях посвящено не очень

большое число работ. Так, в работе S. C. Kim и соавт. (2018) показано, что экспрессия мРНК 5 генов – *NDRG1*, *ERRFI1*, *H19*, *MPZL3* и *UCA1* – сильно повышена в клеточных линиях радиорезистентного РПК. Перечень генетических локусов отличается от выявленного нами паттерна, что, вероятно, обусловлено использованием разных клеточных линий (SNU-61R80Gy, SNU-283R80Gy, SNU-503R80Gy вместо HT-29) и разных показателей (экспрессия вместо копийности) [13].

Следующим этапом работы стало исследование с участием пациентов. По эффективности ЛТ 100 больных РПК были разделены на 2 группы: 1-я группа – с полным ответом на ЛТ (26 пациентов), 2-я группа – с частичным ответом на ЛТ либо его отсутствием (74 пациента). Наиболее широко распространенными системами оценки ответа на ЛТ являются степени регрессии опухоли (tumor regression grade, TRG) в соответствии с критериями А. М. Mandard или О. Dworak. Однако до сих пор нет единого мнения относительно того, какой из них является наиболее точным и наиболее клинически значимым для прогноза [14]. В нашем исследовании мы приняли систему TRG, предложенную А. М. Mandard и соавт. [15], сгруппировав пациентов с TRG_{1–2} в группу с полным ответом, а с TRG_{3–5} в группу с частичным ответом/отсутствием ответа. В этих группах пациентов

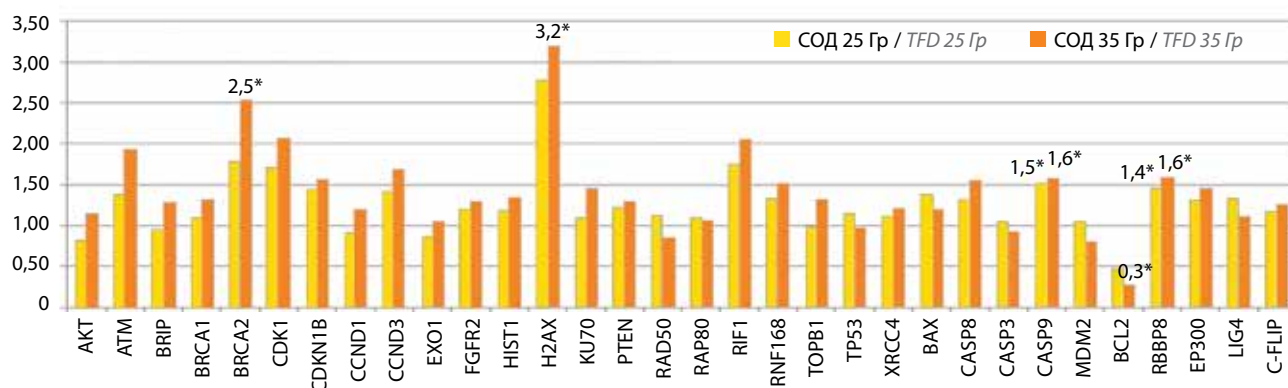


Рис. 4. Уровень копийности генетических локусов в клетках HT-29 с повышенной устойчивостью к радиотерапии (после облучения в дозах 5 и 7 Гр в течение 5 дней). *Статистически значимые различия с интактными (контрольными) клетками, $p < 0,05$

Fig. 4. The level of copy number variation genetic loci in HT-29 cells with increased radiotherapy resistance (after irradiation at doses of 5 and 7 Gy for 5 days). *Statistically significant differences relative to intact (control) cells, $p < 0,05$

определяли уровень CNV только для локусов, показавших статистически значимые изменения в модельном эксперименте.

Так, у пациентов 1-й группы ($n = 26$) в опухолевом биопсийном материале был понижен уровень CNV по локусам *H2AX* и *RBBP8* в 5,0 ($p < 0,005$) и 2,0 ($p < 0,05$) раза соответственно, а уровень CNV по локусу *CASP9* был повышен в 4,0 раза ($p < 0,005$) относительно показателей в нормальной ткани пациентов (рис. 5).

У пациентов 2-й группы ($n = 74$) был повышен уровень CNV локусов *BRCA2* в 2,9 раза ($p < 0,005$), *H2AX* в 2,1 раза ($p < 0,05$), *RBBP8* в 3,0 раза ($p < 0,005$) и *BCL2* в 3,2 раза ($p < 0,005$) относительно показателей в нормальной ткани. При этом был увеличен уровень относительной CNV *BRCA2* в 2,9 раза ($p < 0,05$), *H2AX* в 10,5 раза ($p < 0,005$), *RBBP8* в 6,0 раза ($p < 0,05$) и *BCL2* в 2,7 раза ($p < 0,05$) и снижен уровень относительной CNV гена *CASP9* в 5,7 раза ($p < 0,05$) по сравнению с 1-й группой пациентов (см. рис. 5).

Количество исследований, подобных нашему (этап, выполненный с участием пациентов), невелико. Большинство исследований посвящено колоректальному раку (причем с помощью метода aCGH) [16], и лишь немногие сосредоточены на РПК, особенно немногочисленны работы, анализирующие геномный дисбаланс при РПК во взаимосвязи с ответом на ЛТ [17].

По данным литературы [17, 18], наиболее частыми молекулярными изменениями, характерными для этих опухолей, являются амплификации в областях хромосомных плеч 7p и 7q, 8q, 13q, 20p и 20q и делеции в участках 1p, 8p, 17p, 18p, 18q и 22q. В работе С. Molinari и соавт. 38 % опухолей продемонстрировали амплификацию на плече хромосомы 20q, где картировано несколько онкогенов-кандидатов, связанных с повышенной пролиферативной активностью, снижением выживаемости и прогрессированием при раке (например, *ZNF217*, *CYP24* и *AURKA*)

[19]. По данным этих же авторов, разница в геномной нестабильности между чувствительными и резистентными клетками может быть связана с тем, что гены, участвующие в репарации ДНК, митотических контрольных точках и детоксикации канцерогенов, часто также участвуют в ответе на ЛТ, которая воздействует на пролиферирующие клетки и повреждает ДНК. Так, обнаруженные изменения в области 7q36.1–7q36.3 (у невосприимчивых к терапии пациентов) кажутся интересными, поскольку там картируется ряд важных генов, участвующих в транскрипции, межклеточной передаче сигналов, обеспечении стабильности хромосом и репарации ДНК, росте клеток, дифференцировке и онкогенной трансформации, например *MLL3* и *XRCC2* [20]. Также амплификация областей 13q у нечувствительных к ЛТ представляет особый интерес из-за релевантности ряда генов, расположенных в этих областях: 1) *Wave3* (способствует инвазии опухолевых клеток и метастазированию); 2) *XPO4* (экспортин, играет основную роль в ядерно-цитоплазматическом перемещении Smad3); 3) *APC6/CDC16* (субъединица комплекса, способствующего прохождению анафазы) [19]. Более того, гены *GPC5*, *GPC6*, *HS6ST3*, располагающиеся в этих хромосомных участках, играют роль в контроле клеточного деления и регуляции роста, миграции и хромосомной нестабильности. Еще 2 гена, *CLDN10* и *ABCC4*, локализованные в 13q31–34, могут быть вовлечены в развитие резистентности к терапии [19].

Известно, что часто существует корреляция между числом копий гена и уровнем его экспрессии, поскольку дисбаланс ДНК, по-видимому, оказывает прямое влияние на нарушение регуляции транскрипционного профиля опухолевых клеток. Исследования сигнатур экспрессии генов у пациентов с РПК, подвергнутых неoadъювантной терапии, показали, что разные подходы дают разные наборы генов, которые могут предсказывать ответ. Были идентифицированы

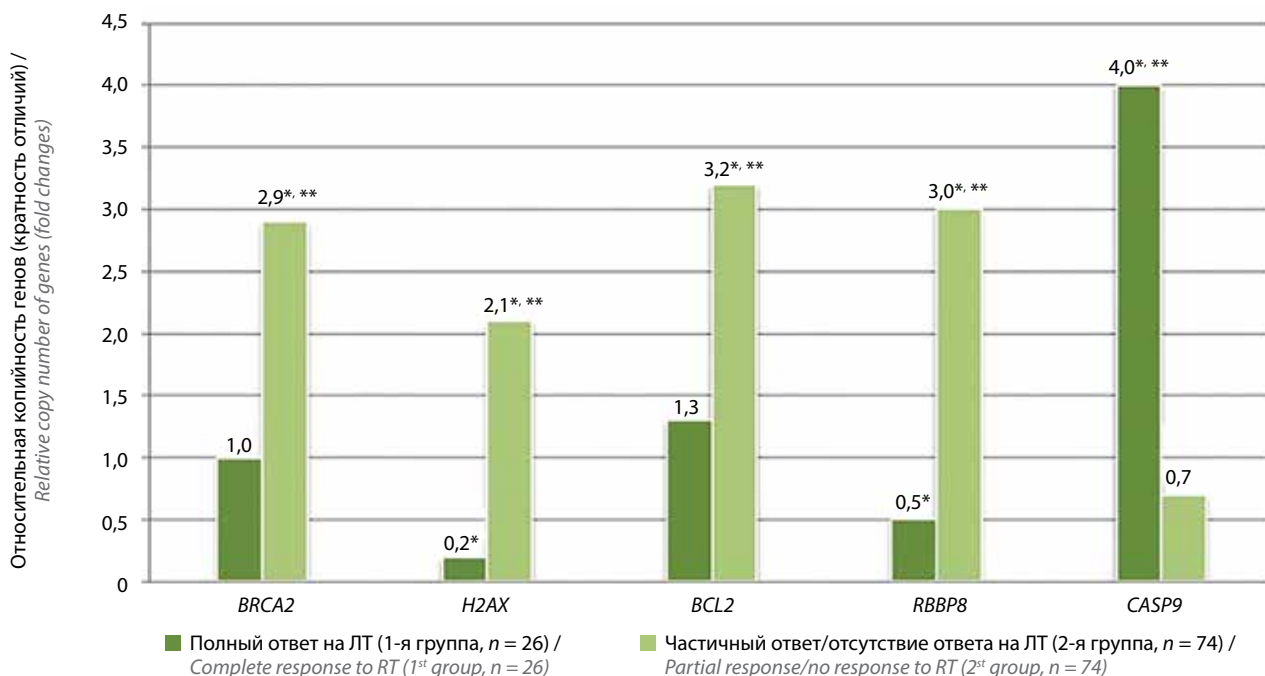


Рис. 5. Уровень относительной копийности генетических локусов у больных раком прямой кишки с полным ответом и частичным ответом/отсутствием ответа на лучевую терапию (ЛТ). *Статистически значимые различия при сравнении с неопухолевой тканью, $p < 0,005$; **статистически значимые отличия 1-й группы от 2-й группы, $p < 0,005$

Fig. 5. The level of genetic loci relative copy number in rectal cancer patients with a complete response and partial response/no response to radiation therapy (RT). *Statistically significant differences relative to non-tumor tissue, $p < 0.005$; **statistically significant differences of the 1st group from the 2nd group, $p < 0.005$

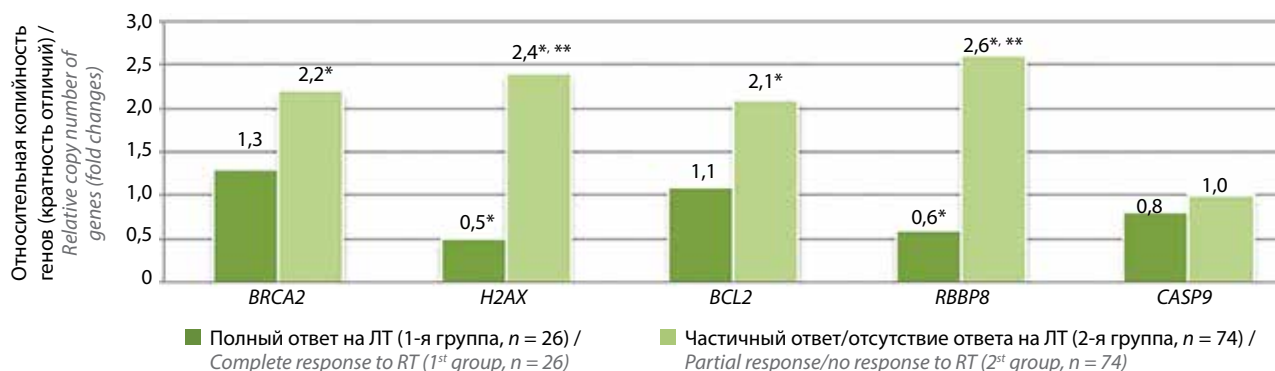


Рис. 6. Особенности вариации числа копий 5 генов во внеклеточной ДНК плазмы крови у пациентов с разной чувствительностью к радиотерапии. *Статистически значимые различия с показателями условно здоровых доноров, $p < 0,05$; **статистически значимые различия с 1-й группой пациентов, $p < 0,005$

Fig. 6. Features of 5 genes copy number variation in blood plasma cell-free DNA in patients with different sensitivity to radiotherapy. *Statistically significant differences relative to conditionally healthy donors, $p < 0.05$; **statistically significant differences relative to the 1st group of patients, $p < 0.005$

гены, участвующие в общих молекулярных путях и клеточных процессах, в том числе участвующие в репарации повреждений ДНК, организации микротрубочек, апоптозе, транскрипции, росте клеток, метаболизме лекарств и транспортных функциях. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы: между реагирующими и не реагирующими на ЛТ пациентами имеются различия в количестве копий генов, участвующих в реакции на повреждение ДНК, транскрипции, регуляции клеточного цикла и апоптоза [19].

J.K. Douglas и соавт. сравнивали генетические вариации у пациентов с РПК с полным и частичным ответом на химиолучевую терапию с помощью высокопроизводительного секвенирования. Были идентифицированы 195 вариантов в 83 генах. У пациентов с частичным ответом были обнаружены мутации в 4 генах, не мутировавших у пациентов с полным ответом: *KDM6A*, *ABL1*, *DAXX-ZBTB22* и *KRAS* [21].

Заключительной частью нашего исследования стало изучение возможности применения выявленных

генетических локусов в малоинвазивной диагностике с использованием вДНК из плазмы крови (венопункция у больных перед ЛТ). Источниками вДНК в организме позвоночных животных и человека являются клеточная и митохондриальная ДНК из соматических и опухолевых клеток, подвергшихся процессам апоптоза/некроза, ДНК из эритробластов и лимфоцитов, а также ДНК микроорганизмов [22].

На данном этапе исследования мы использовали препараты вДНК из плазмы крови, полученной до ЛТ у 100 больных РПК, а также препараты вДНК из плазмы крови 30 условно здоровых доноров. Во вДНК групп пациентов и условно здоровых доноров проводилось определение CNV локусов *CASP9*, *BRCA2*, *H2AX*, *BCL2* и *RBBP8*.

Во вДНК пациентов 1-й группы ($n = 26$) выявленный уровень CNV *H2AX* был в 2,0 раза ($p < 0,05$) ниже и *RBBP8* в 1,7 раза ($p < 0,05$) ниже, чем во вДНК группы условно здоровых доноров. По уровню CNV генов *BRCA2*, *BCL2* и *CASP9* значимых отличий между условно здоровыми донорами и пациентами 1-й группы выявлено не было. Во вДНК пациентов 2-й группы ($n = 74$) показатель CNV *BRCA2* был в 2,2 раза ($p < 0,05$) выше, *H2AX* в 2,4 раза ($p < 0,05$), *RBBP8* в 2,6 раза ($p < 0,05$) и *BCL2* в 2,1 раза ($p < 0,05$) выше, чем во вДНК группы условно здоровых доноров. При этом во вДНК показатель CNV только для 2 локусов статистически значимо ($p < 0,005$) от-

личался между группами пациентов: CNV гена *H2AX* ниже в 4,9 раза, а гена *RBBP8* в 4,2 раза в 1-й группе относительно 2-й (рис. 6).

Корреляционный анализ показал, что между уровнем CNV во вДНК и уровнем CNV в опухолевой ткани у больных РПК обеих групп наблюдалась сильная положительная корреляция ($r > 0,84$). Соответственно, повышенный уровень CNV генов, регулирующих репарацию ДНК и пролиферацию во вДНК плазмы крови у больных РПК с частичным ответом/отсутствием ответа на ЛТ, и пониженный уровень CNV этих генов у больных РПК с полным ответом на ЛТ отражают уровень их CNV в тканях опухоли, где обеспечивается соответствующий уровень транскрипционной активности исследованных генетических локусов, что и приводит в итоге к дифференциальной эффективности проводимой ЛТ в двух группах больных РПК.

Заключение

Таким образом, применение комплексного подхода, основанного на биоинформационном анализе базы данных TCGA, моделировании ЛТ на культуре клеток и валидации выявленных маркеров на образцах тканей и крови больных аденокарциномой прямой кишки, позволило выявить ассоциацию количества копий генов *RBBP8*, *BRCA2*, *H2AX* и *BCL2* с эффективностью предоперационной ЛТ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Кутилин Д.С., Гусарева М.А., Кошелева Н.Г. и др. Генетические и эпигенетические предикторы эффективности лучевой терапии опухолей прямой кишки. Современные проблемы науки и образования 2021;4. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30963>. DOI: 10.17513/spno.30963
Kutulin D.S., Gusareva M.A., Kosheleva N.G. et al. Genetic and epigenetic predictors of rectal tumors radiotherapy effectiveness. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education 2021;4. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30963> (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.30963
2. Romano G.M., Bianco F., De Franciscis S., Belli A. The management of recurrent rectal cancer: a European perspective. In: Comprehensive Rectal Cancer Care. Ed. by M. Kwaan, A. Zbar. Springer, Cham: 2019. P. 521–536. DOI: 10.1007/978-3-319-98902-0_27
3. Cammà C., Giunta M., Fiorica F. et al. Preoperative radiotherapy for resectable rectal cancer: a meta-analysis. JAMA 2000;284(8):1008–15. DOI: 10.1001/jama.284.8.1008
4. Hearn N., Atwell D., Cahill K. et al. Neoadjuvant radiotherapy dose escalation in locally advanced rectal cancer: a systematic review and meta-analysis of modern treatment approaches and outcomes. Clin Oncol (R Coll Radiol) 2021;33(1):e1–e14. DOI: 10.1016/j.clon.2020.06.008
5. Sun W., Li G., Wan J. et al. Circulating tumor cells: a promising marker of predicting tumor response in rectal cancer patients receiving neoadjuvant chemo-radiation therapy. Oncotarget 2016;7(43):69507–17. DOI: 10.18632/oncotarget.10875
6. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Гусарева М.А. и др. Копийность генов как фактор радиорезистентности клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29. Современные проблемы науки и образования 2019;5. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29224>. DOI: 10.17513/spno.29224
Kutulin D.S., Kosheleva N.G., Gusareva M.A. et al. Gene copy number variation as a factor of radioresistance of colon adenocarcinoma cells of the line HT-29. Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education 2019;5. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=29224>. (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.29224
7. Kutulin D.S., Tsandekova M.R., Porkhanova N.V. Features of the copy number variation of certain genes in tumor cells in patients with serous ovarian adenocarcinoma. Bull Exp Biol Med 2021;170(3):332–9. DOI: 10.1007/s10517-021-05062-1
8. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кит О.И., Кутилин Д.С. Малоинвазивная молекулярная диагностика серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности. Онкогинекология 2021;4(40):35–49. DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35
Tsandekova M.R., Porkhanova N.V., Kit O.I., Kutulin D.S. Minimally invasive molecular diagnostics of serous ovarian adenocarcinoma of high and low malignancy. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2021;4(40):35–49. (In Russ.). DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35

9. Kutilin D. Genetic and epigenetic bases of prostate tumor cell radioresistance. *Klin Onkol* 2021;34(3):220–34. DOI: 10.48095/ccko2021220
10. Кутилин Д.С., Кошелева Н.Г., Максимов А.Ю. и др. Влияние различных доз лучевой терапии на выживаемость клеток аденокарциномы толстой кишки линии HT-29. *Современные проблемы науки и образования* 2019;3. Доступно по: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28918>. DOI: 10.17513/spno.28918
Kutilin D.S., Kosheleva N.G., Maksimov A.Yu. et al. Effects of various radiotherapy doses on survival of colon adenocarcinoma cells line HT-29. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* = Modern problems of science and education 2019;3. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=28918> (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.28918
11. Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е. Циркулирующие НК в крови больных раком желудка и толстой кишки. *Клинические исследования* 2005;51(3):321–8.
Tamkovich S.N., Bryzgunova O.E. Circulating NK in the blood of patients with stomach and colon cancer. *Klinicheskoe issledovaniya* = Clinical studies 2005;51(3):321–8. (In Russ.).
12. Frydrych L.M., Ulintz P., Bankhead A. et al. Rectal cancer sub-clones respond differentially to neoadjuvant therapy. *Neoplasia* 2019;21(10):1051–62. DOI: 10.1016/j.neo.2019.08.004
13. Kim S.C., Shin Y.K., Kim Y.A. et al. Identification of genes inducing resistance to ionizing radiation in human rectal cancer cell lines: re-sensitization of radio-resistant rectal cancer cells through down regulating NDRG1. *BMC Cancer* 2018;18(1):594. DOI: 10.1186/s12885-018-4514-3
14. Ghadimi B.M., Grade M., Difilippantonio M.J. et al. Effectiveness of gene expression profiling for response prediction of rectal adenocarcinomas to preoperative chemoradiotherapy. *J Clin Oncol* 2005;23(9):1826–38. DOI: 10.1200/JCO.2005.00.406
15. Mandard A.M., Dalibard F., Mandard J.C. et al. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. *Cancer* 1994;73(11):2680–6. DOI: 10.1002/1097-0142(19940601)73:11<2680::aid-cncr2820731105>3.0.co;2-c
16. Camps J., Grade M., Nguyen Q.T. et al. Chromosomal breakpoints in primary colon cancer cluster at sites of structural variants in the genome. *Cancer Res* 2008;68(5):1284–95. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2864
17. Grade M., Gaedcke J., Wangsa D. et al. Chromosomal copy number changes of locally advanced rectal cancers treated with preoperative chemoradiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2009;193(1):19–28. DOI: 10.1016/j.cancergencyto.2009.03.016
18. Diep C.B., Kleivi K., Ribeiro F.R. et al. The order of genetic events associated with colorectal cancer progression inferred from meta-analysis of copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 2006;45(1):31–41. DOI: 10.1002/gcc.20261
19. Molinari C., Ballardini M., Teodorani N. et al. Genomic alterations in rectal tumors and response to neoadjuvant chemoradiotherapy: an exploratory study. *Radiat Oncol* 2011;6:161. DOI: 10.1186/1748-717X-6-161
20. Ashktorab H., Schäffer A.A., Darempouran M. et al. Distinct genetic alterations in colorectal cancer. *PLoS One* 2010;5(1):e8879. DOI: 10.1371/journal.pone.0008879
21. Douglas J.K., Callahan R.E., Hothem Z.A. et al. Genomic variation as a marker of response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *Mol Cell Oncol* 2020;7(3):1716618. DOI: 10.1080/23723556.2020.1716618
22. Козлов В.А. Свободная внеклеточная ДНК в норме и при патологии. *Медицинская иммунология* 2013;15(5):399–412. DOI: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412
Kozlov V.A. Free extracellular DNA is normal and pathological. *Meditsinskaya immunologiya* = Medical Immunology 2013;15(5):399–412. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2013-5-399-412

Вклад авторов

Д.С. Кутилин: разработка дизайна исследования, проведение молекулярных исследований и биоинформационного анализа, написание текста рукописи;

М.А. Гусарева: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Н.Г. Кошелева: написание текста рукописи.

Authors' contribution:

D.S. Kutilin: development of study design, conducting molecular studies and bioinformatic analysis, writing the text of the manuscript;

M.A. Gusareva: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;

N.G. Kosheleva: writing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Кутилин / D.S. Kutilin: <https://orcid.org/0000-0002-8942-3733>

М.А. Гусарева / M.A. Gusareva: <https://orcid.org/0000-0002-9426-9662>

Н.Г. Кошелева / N.G. Kosheleva: <https://orcid.org/0000-0001-7630-1502>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «Поиск предикторов радиорезистентности рака прямой кишки и разработка персонализированных неoadъювантных терапевтических подходов».

Funding. The study was carried out within the framework of the state task “Search for radioresistance predictors of rectal cancer and personalized neoadjuvant therapeutic approaches development”.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. На проведение исследования получено разрешение этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России (протокол № 14).

Compliance with patient rights and principles of bioethics. Permission for the study was obtained from the ethical committee of the National Medical Research Center for Oncology of the Ministry of Health of Russia (protocol No. 14).

Статья поступила: 01.09.2022. **Принята к публикации:** 28.10.2022.

Article received: 01.09.2022. **Accepted for publication:** 28.10.2022.

Экспрессия мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) при молекулярных подтипах рака молочной железы

С.В. Чулкова^{1,2}, Е.Н. Шолохова¹, И.В. Поддубная³, И.С. Стилиди^{1,2}, Н.Н. Тупицын¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

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

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1

Контакты: Светлана Васильевна Чулкова chulkova@mail.ru

Введение. В современной стратегии лечения рака широко используются иммуотропные препараты. Важное значение придается иммунологическим маркерам опухоли, которые определяют прогноз заболевания, эффективность лечения. Поэтому изучение их экспрессии является одним из ведущих научных направлений. Особый интерес представляет изучение мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) в зависимости от биологического подтипа рака молочной железы.

Цель исследования – оценить экспрессию молекул HLA I, II классов, TfR1 клетками рака молочной железы и определить их взаимосвязь с молекулярно-биологическим подтипом опухоли.

Материалы и методы. В данную работу включены 120 больных раком молочной железы, которые получали лечение в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Преобладали больные со II и III стадиями опухоли: 56,7 % и 33,4 % соответственно. Чаще отмечалась умеренная степень дифференцировки (G₂). Люминальный подтип составил 47,5 % (n = 57), нелюминальный – 52,5 % (n = 50). Иммунофенотипирование первичной опухоли выполнено методом иммунофлуоресценции на криостатных срезах. Оценка реакции проводилась с помощью люминесцентного микроскопа ZEISS Axioscope 5 (Zeiss AG, Германия). Изучена частота экспрессии молекул HLA I класса, HLA-DR, TfR1, инфильтрация опухоли CD45⁺, CD38⁺-клетками в зависимости от молекулярного подтипа рака молочной железы.

Результаты. Установлено, что частота экспрессии мономорфных детерминант HLA I класса при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы была сопоставима; HLA-DR-антиген экспрессировался достоверно чаще при люминальном подтипе рака молочной железы: 37,3 % и 18,0 % соответственно, p = 0,022. Частота экспрессии TfR1 была достоверно выше при люминальном подтипе рака по сравнению с нелюминальным, p = 0,014. Преимущественно отмечался мономорфный тип реакции – в 76,5 % случаев (n = 39). Мозаичный тип реакции TfR1 отмечен в 7,8 % образцов. При нелюминальном раке мономорфная экспрессия TfR1 выявлена в 50,0 % случаев (n = 30), а мозаичная экспрессия – в 20,0 % (n = 12). Установлена выраженная степень лимфоидной инфильтрации, в частности плазмочитарной, при нелюминальном подтипе рака молочной железы: 70,7 % (n = 29) и 35,0 % (n = 14) при нелюминальном и люминальном подтипах соответственно, p = 0,001. Отмечена ассоциация экспрессии молекул HLA I класса с выраженностью общеилекоцитарной инфильтрации, p = 0,007.

Заключение. Частота экспрессии мономорфных детерминант HLA I класса не различалась при молекулярных подтипах рака молочной железы. Экспрессия молекул HLA II класса достоверно чаще наблюдалась при люминальном подтипе рака молочной железы. Экспрессия мономорфных детерминант HLA I класса связана со степенью лимфоидной инфильтрации опухоли. При нелюминальном подтипе плазмочитарная инфильтрация более выражена. Экспрессия трансферриновых рецепторов достоверно более выражена при люминальном подтипе.

Ключевые слова: рак молочной железы, иммунофенотипирование, иммунофлуоресценция, HLA I класса, HLA-DR, TfR1, CD45, CD38, криостатные срезы

Для цитирования: Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. Экспрессия мономорфных HLA-детерминант, трансферринового рецептора 1 (TfR1) при молекулярных подтипах рака молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):50–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-50-61

Expression of monomorphic HLA-determinants, transferrin receptor 1 (TfR1) in molecular subtypes of breast cancer

Svetlana V. Chulkova^{1,2}, Elena N. Sholokhova¹, Irina V. Poddubnaya³, Ivan S. Styldi^{1,2}, Nikolay N. Tupitsyn¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1a Ostrovityanova St., 117997 Moscow, Russia;

³Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barrikadnaya St., 125993 Moscow, Russia

Contacts: Svetlana Vasilievna Chulkova chulkova@mail.ru

Background. Immunotropic drugs are widely used in the modern strategy of cancer treatment. Importance is given to immunological markers of the tumor, which determine the prognosis of the disease, the effectiveness of treatment. Therefore, the study of their expression is one of the leading scientific directions. Of particular interest is the study of monomorphic HLA determinants, transferrin receptor 1 (TfR1), depending on its biological subtype of breast cancer.

Aim. To evaluate the frequency of expression of HLA class I, II, TfR1 molecules by breast cancer cells and determine their relationship with the molecular biological subtype of the tumor.

Materials and methods. This study included 120 patients with breast cancer who received treatment at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. Tumor stages II and III prevailed: 56.7 % and 33.4 %, respectively. A moderate degree of differentiation (G₂) was more often noted. The luminal subtype was 58.3 % (n = 70), non-luminal – in 41.7 % (n = 50). Immunophenotyping of the primary tumor was performed by immunofluorescence on cryostat sections. The reaction was evaluated using a ZEISS AxioScope 5 luminescent microscope (Zeiss AG, Germany). The frequency of expression of HLA class I and II molecules were studied depending on the clinical and morphological characteristics of breast cancer. The frequency of expression of HLA class I, HLA-DR, TfR1, molecules, tumor infiltration of CD45⁺, CD38⁺, depending on the molecular subtype of breast cancer was studied.

Results. It was found that the frequency of expression of monomorphic determinants of the HLA class I in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer was comparable; HLA-DR was expressed significantly more often in the luminal subtype of breast cancer: 37.3 % and 18.0 %, respectively, $p = 0.022$. The frequency of TfR1 expression was significantly higher in the luminal subtype of cancer compared to non-luminal, $p = 0.014$. Predominantly monomorphic type of reaction was observed: in 76.5 % (n = 39) of cases. The mosaic type of the TfR1 reaction was noted in 7.8 % of the samples. TfR1 monomorphic expression was detected in 50.0 % (n = 30) of cases in non-luminal cancer, the mosaic expression – in 20.0 % (n = 12) of cases. A pronounced degree of lymphoid infiltration, in particular plasmacytic, was established in non-luminal subtype of breast cancer: 70.7 % (n = 29) and 35.0 % (n = 14), respectively, $p = 0.001$. An association was noted between the expression of HLA I class molecules and the severity of general leukocyte infiltration, $p = 0.007$.

Conclusion. The frequency of expression of HLA class I monomorphic determinants did not differ in molecular subtypes of breast cancer. The expression of the HLA class II molecule was significantly more frequently observed in the luminal subtype of breast cancer. The expression of HLA class I monomorphic determinants is associated with the degree of lymphoid infiltration of the tumor. In the non-luminal subtype, plasmacytic infiltration is more pronounced. The expression of transferrin receptors is significantly more pronounced in the luminal subtype.

Keywords: breast cancer, immunophenotyping, HLA class I, HLA-DR, TfR1, CD45, CD38 immunofluorescence, cryostat sections

For citation: Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. Expression of monomorphic HLA-determinants, transferrin receptor 1 (TfR1) in molecular subtypes of breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):50–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-50-61

Введение

В структуре онкологической заболеваемости женщин в России рак молочной железы (РМЖ) является самым распространенным. Ежегодно в мире выявляется не менее 1,5 млн новых случаев РМЖ [1]. Согласно статистическим данным, от этой болезни в мире погибает почти 700 тыс. женщин ежегодно [2].

Рак молочной железы — весьма гетерогенная опухоль, имеющая разные биологические подтипы

в зависимости от экспрессии на клеточной поверхности тех или иных молекул и отличающаяся разнообразными течением и ответом на лекарственную терапию [3, 4]. Вместе с тем немаловажное значение имеют иммунофенотипические характеристики опухоли. Исследования последних лет позволили раскрыть некоторые иммунологические особенности РМЖ, провести параллели с клиническим течением данного заболевания, объяснить

неудачи в лекарственной терапии, определить новые маркеры прогноза.

При РМЖ широко и детально изучаются мономорфные HLA-детерминанты. Они являются, пожалуй, ключевыми в реализации противоопухолевого иммунного ответа при раке, специализируясь на распознавании и представлении собственных и чужеродных пептидов, обеспечивая Т-клеточный ответ [5]. Лабораторией иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России за годы исследований накоплен довольно обширный материал по изучению их значимости при РМЖ. Установлено наличие взаимосвязи экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости I и II классов клетками РМЖ между собой [6]. Сформулирована концепция, объясняющая механизм влияния мономорфных HLA-детерминант на прогноз заболевания. Реализация влияния HLA-фенотипа происходит опосредованно, через действие иммунной системы в иммунокомпетентном организме [6]. В последующих исследованиях лаборатории дополнительно изучались такие аспекты, как связь экспрессии молекул гистосовместимости с эффективностью лекарственного лечения, их взаимоотношение с местными иммунными реакциями [7, 8].

Трансферриновые рецепторы 1 (TfR1), известные как кластер дифференцировки 71 (CD71), обеспечивают транспорт железа через клеточную мембрану, способствуя пролиферативной активности клеток [6]. Гиперэкспрессия TfR1 выявлена при многих видах солидных опухолей, таких как рак почки, пищевода, холангиокарцинома, рак молочной железы, глиобластома [9–13]. Их клиническое значение широко изучается. Показано, что гиперэкспрессия TfR1 клетками РМЖ связана с ухудшением показателей выживаемости [6]. Экспрессирующие TfR1 клетки обнаружены среди радиорезистентной популяции при некоторых видах злокачественных опухолей (глиома, рак шейки матки) [14, 15]. Вместе с тем некоторые исследования указывают на существование слабо экспрессирующих TfR1 клеток рака, которые могут обладать потенциалом к инвазии и миграции [16].

Таким образом, изучение экспрессии мономорфных HLA-детерминант, TfR1 клетками РМЖ является необходимым этапом для понимания клинического поведения опухоли, для совершенствования стратегий лекарственного лечения. Особый интерес представляет изучение их экспрессии в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ, этому вопросу и посвящено данное исследование.

Цель исследования — оценить экспрессию молекул HLA I, II классов, TfR1 клетками рака молочной железы и определить их взаимосвязь с молекулярно-биологическим подтипом опухоли.

Материалы и методы

Дизайн исследования. Проведено ретроспективное когортное исследование. Критерии включения: первично-операбельный РМЖ, отсутствие лекарственного лечения в анамнезе, стадии заболевания I–IIIС.

Участники (объекты) исследования. Материалом данного исследования послужили образцы опухолевой ткани больных РМЖ. Всего включены в работу 120 больных РМЖ, которые были обследованы и получили лечение в условиях ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Возраст больных варьировал от 27 до 77 лет, средний возраст составил $54,5 \pm 0,9$ года. Диагноз РМЖ был установлен на основании клинических, рентгенологических и морфологических данных. Всем пациенткам выполнено хирургическое лечение: в объеме мастэктомии — 61,7 % ($n = 74$), резекции молочной железы — 38,3 % ($n = 46$). Лекарственную терапию в адъювантном режиме получили 69,2 % пациенток ($n = 83$), в неоадъювантном — 25,8 % ($n = 31$). Лучевая терапия проведена в 44,2 % случаев ($n = 53$), гормонотерапия — в 56,6 % ($n = 68$).

Методы оценки целевых показателей. Распространенность опухолевого процесса оценивалась в соответствии с клинической классификацией и международной системой TNM (7-е издание). По стадиям больные распределились следующим образом: I стадия — 10,0 % случаев, IIА стадия — 14,2 %, IIВ — 42,5 %, IIIА — 12,5 %, IIIВ — 14,2 %, IIIС — 6,7 % (табл. 1).

Таблица 1. Распределение больных в зависимости от стадии рака молочной железы

Table 1. Distribution of patients depending on the stage of breast cancer

Стадия Stage	<i>n</i>	%
I	12	10,0
IIА	17	14,2
II В	51	42,5
III А	15	12,5
III В	17	14,2
III С	8	6,7
Всего Total	120	100,0

В большинстве случаев размер первичной опухоли соответствовал категории Т2 (63,3 %, $n = 76$), реже отмечались стадии Т1 (18,3 %, $n = 22$) и Т4 (15,0 %, $n = 18$), стадия Т3 выявлена у меньшего числа больных (3,3 %, $n = 4$). Метастатическое поражение лимфоузлов (N+) наблюдалось почти у всех больных — в 80 % случаев ($n = 96$): N1 — 55,0 % ($n = 66$), N2 — 18,3 %

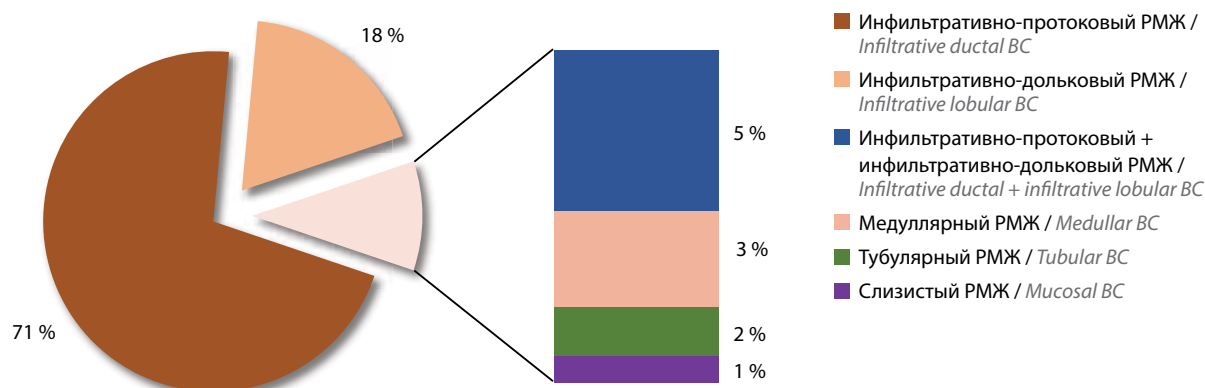


Рис. 1. Распределение больных в зависимости от гистологического типа рака молочной железы (РМЖ)

Fig. 1. Distribution of patients depending on the histological type of breast cancer (BC)

($n = 22$), N3 – 6,7 % ($n = 8$). Чаще всего степень дифференцировки опухоли соответствовала G₂ (67,5 %, $n = 81$).

В соответствии с данными патоморфологического исследования в большинстве случаев диагностирован инфильтративно-протоковый РМЖ – 71 % больных ($n = 85$); инфильтративно-дольковый рак отмечен в 18 % случаев ($n = 22$), другие виды – в 11 % ($n = 13$) (рис. 1).

Экспрессия опухолевыми клетками рецепторов к эстрогенам наблюдалась в 47 % образцов ($n = 57$), рецепторов к прогестерону – в 45 % образцов ($n = 54$). Ввиду ретроспективного характера анализа разделение на молекулярно-биологические подтипы РМЖ нами выполнено на основании экспрессии рецепторов к эстрогенам. Опухоли, экспрессирующие рецепторы к эстрогену, классифицировались как люминальный подтип РМЖ. При отсутствии экспрессии таковых опухолей, соответственно, относились к нелюминальному подтипу. Таким образом, РМЖ в 47,5 % случаев ($n = 57$) классифицирован как люминальный, а в 52,5 % случаев ($n = 63$) – как нелюминальный подтип.

Иммунофенотипирование опухоли выполнено на криостатных срезах в лаборатории иммунологии гемопоэза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» методом иммунофлуоресценции. Криостатные срезы фиксировали ацетоном на предметных стеклах в течение 10 мин при температуре 4 °С. После фиксации срезы отмывали в среде 199 (pH 7,2–7,4), наносили моноклональные антитела и инкубировали в течение 30 мин. После отмывания наносили FITC-меченные F (ab) 2-фрагменты антивидовых IgG1. По окончании инкубации препараты отмывали и консервировали 50 % раствором глицерина. Учет реакции выполняли на люминесцентном микроскопе ZEISS Axioscope 5 (Zeiss AG, Германия).

Изучена экспрессия опухолевыми клетками пан-цитокератина (KL-1), молекул главного комплекса

гистосовместимости HLA I класса, HLA-DR, Tfr1; оценены общелейкоцитарная инфильтрация (CD45), плазмоцитарная инфильтрация (CD38) (табл. 2). Положительными считали клетки, имеющие мембранное свечение разной степени интенсивности (от слабой до выраженной), а также клетки с цитоплазматическим свечением. Оценка реакции на опухолевых клетках проводилась полуколичественным методом, предложенным Hammerling и соавт. (1987): 1) отрицательная

Таблица 2. Моноклональные антитела, использованные в работе

Table 2. Monoclonal antibodies used in the work

Антитело Antibody	Клон Clone	Производитель Manufacturer
HLA-DR	LN3	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
HLA I класса HLA class I	W6/32	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
CD71	Mouse BALB/c IgG2a	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
KL-1	—	Immunotech, Marseille (Франция) Immunotech, Marseille (France)
CD45	H130	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
CD38	HIT2	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)
F (ab) 2-фрагменты, меченные FITC FF (ab) 2-fragments, labeled FITC	M1-14D12	Becton Dickinson (США) Becton Dickinson (USA)

Таблица 3. Экспрессия опухолевыми клетками молекул HLA I класса, HLA-DR

Table 3. HLA class I, HLA-DR expression by tumor cells

Экспрессия HLA I класса HLA I class expression		Экспрессия HLA-DR HLA-DR expression			Всего Total
		отсутствует absent	мозаичная mosaic	мономорфная monomorphic	
Отсутствует Absent	n	43	5	0	48
	%	89,6	10,4	0,0	100,0
Мозаичная Mosaic	n	11	2	2	15
	%	73,3	13,3	13,3	100,0
Мономорфная Monomorphic	n	26	10	11	47
	%	55,3	21,3	23,4	100,0
Всего Total	n	80	17	13	110
	%	72,7	15,5	11,8	100,0

реакция — менее 10 % антигенположительных клеток; 2) мозаичная реакция — антиген экспрессируется частью опухолевых клеток (10–80 %); 3) мономорфная реакция — экспрессия анализируемого антигена наблюдается более чем в 80 % опухолевых клеток.

Оценка экспрессии антигенов на гемопоэтических клетках выполнена также полуколичественным методом. При наличии единичных антигенположительных клеток в поле зрения изучаемого препарата реакция оценивалась как слабая инфильтрация, при наличии в препарате антигенположительных клеток в виде отдельных групп — как умеренная инфильтрация. Если наблюдались скопления (очаги) антигенположительных клеток в срезе, крупные группы и инфильтраты из этих клеток, то реакция оценивалась как выраженная инфильтрация.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием пакета IBM-SPSS Statistics v. 21. Осуществляли анализ корреляций по Пирсону или Спирмену, подсчет распределения частот по категориям с непрерывными и дискретными переменными (критерий Фишера и χ^2 по Пирсону). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты анализа экспрессии молекул HLA I класса, HLA-DR клетками РМЖ представлены в табл. 3. В целом по группе в 40 % образцов ($n = 48$) HLA I класса не экспрессировались. В аналогичном числе (%) случаев выявлена мономорфная экспрессия анализируемого антигена. В отношении молекулы HLA-DR наблюдалась несколько иная картина. Мономорфная экспрессия HLA-DR отмечена в 13 % образцов ($n = 13$). Преимущественно опухоли

были антигенотрицательными — 68,3 % ($n = 82$). Мозаичная экспрессия данного антигена опухолевыми клетками установлена в 12,0 % образцов ($n = 9$). Как видим, частота экспрессии молекул HLA I и II классов различалась.

При анализе взаимосвязи экспрессии обеих HLA-детерминант отмечено следующее. Мономорфная экспрессия обеих детерминант выявлена в 23,4 % случаев. Значительно чаще наблюдалось отсутствие экспрессии обеих молекул главного комплекса гистосовместимости I и II класса: 89,6 % образцов. HLA I-отрицательные опухоли в небольшом числе случаев (10,4 %) мозаично экспрессировали молекулы HLA II класса. Мозаичная экспрессия антигена HLA I класса зачастую сопровождалась отсутствием экспрессии молекул HLA II класса. Среди опухолей с мономорфной экспрессией HLA I класса 23,4 % характеризовались мономорфной, а 21,3 % — мозаичной экспрессией молекул HLA II класса. Полученные результаты в отношении экспрессии мономорфных детерминант I и II класса согласуются с данными литературы [6, 7, 17, 18]. Пример экспрессии HLA-мономорфных детерминант представлен на рис. 2.

Далее нами была изучена экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости при 2 подтипах РМЖ — люминальном и нелюминальном. Данные анализа представлены в табл. 4. Как видно из таблицы, при люминальном и нелюминальном подтипах РМЖ частота экспрессии HLA I класса была сопоставима. В отношении молекулы HLA-DR получены несколько иные данные. При люминальном подтипе данный антиген экспрессировался чаще, чем при нелюминальном: мозаичный тип реакции отмечен

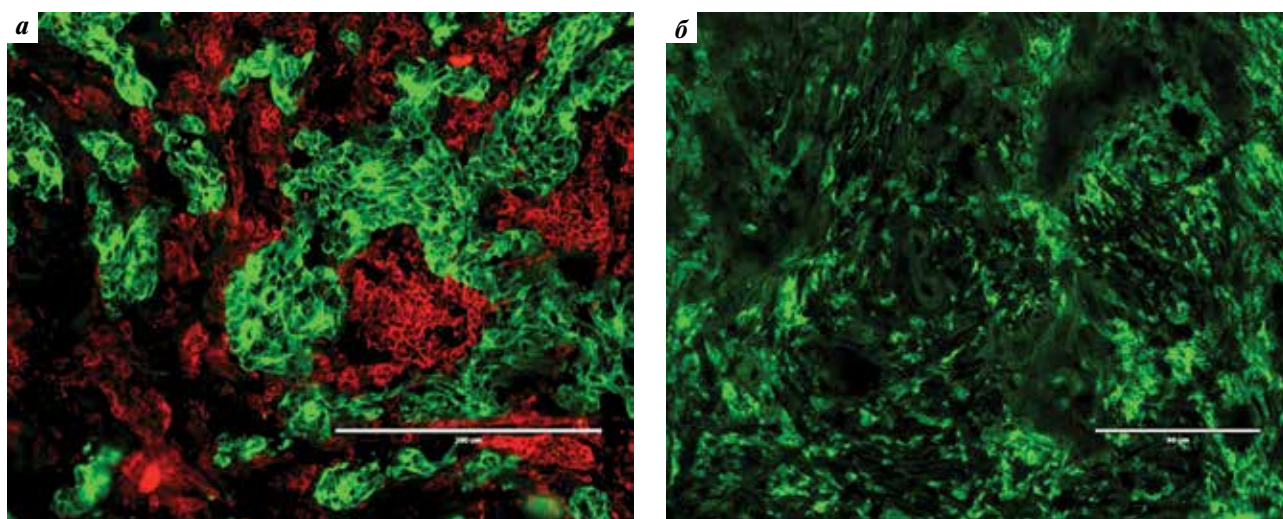


Рис. 2. Типы экспрессии молекул HLA клетками рака молочной железы ($\times 400$): а – мономорфная реакция (более 80 % опухолевых клеток экспрессируют антиген); б – мозаичная реакция (10–80 % опухолевых клеток экспрессируют антиген)

Fig. 2. Types of HLA expression by breast cancer cells ($\times 400$): а – monomorphic reaction (more than 80 % of tumor cells express antigen); б – mosaic reaction (10–80 % of tumor cells express antigen)

Таблица 4. Типы экспрессии опухолевыми клетками молекул HLA I класса, HLA-DR в зависимости подтипа рака молочной железы

Table 4. Types of expression of HLA class I, HLA-DR molecules by tumor cells depending on the subtype of breast cancer

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtype		Экспрессия HLA HLA expression			Всего Total
		отсутствует absent	мозаичная mosaic	мономорфная monomorphic	
HLA I класса HLA class I					
Люминальный Luminal	n	21	9	22	52
	%	40,4	17,3	42,3	100,0
Нелюминальный Non-luminal	n	27	6	26	59
	%	45,8	10,2	44,1	100,0
HLA-DR*					
Люминальный Luminal	n	32	12	7	51
	%	62,7	23,5	13,7	100,0
Нелюминальный Non-luminal	n	50	5	6	61
	%	82,0	8,2	9,8	100,0

* $p = 0,047$.

в 23,5 % случаев, а в 13,7 % случаев – мономорфный тип. При нелюминальном подтипе клетки РМЖ слабо экспрессировали молекулы HLA II класса.

Распределение HLA-DR-антигенотрицательных и антигенположительных опухолей в зависимости от молекулярного подтипа РМЖ представлено на рис. 3.

Как видим, существует разница в экспрессии молекул HLA-DR: при люминальном подтипе антиген экспрессировался в 37,3 %, а при нелюминальном – в 18,0 % наблюдений, $p = 0,022$. Возможно, такое различие обусловлено преобладанием при нелюминальном подтипе менее дифференцированных опухолей.

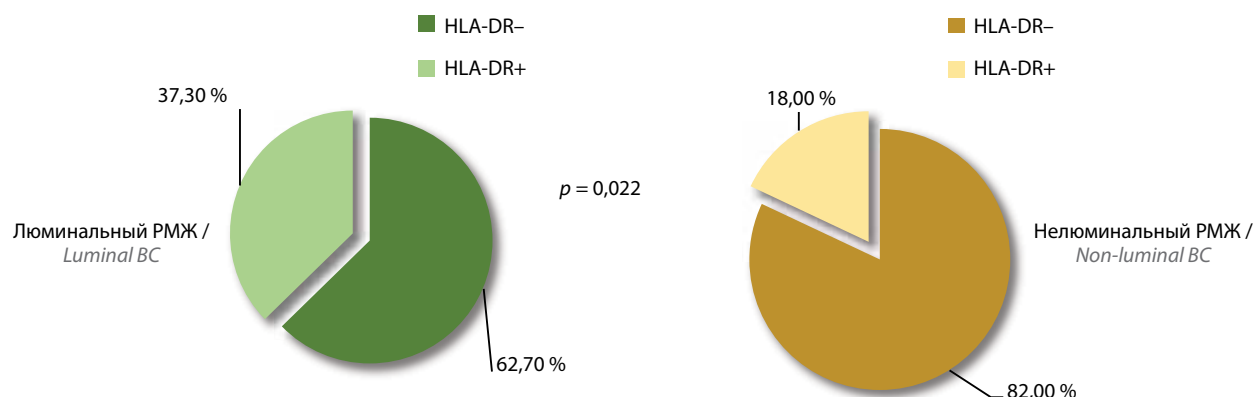


Рис. 3. Частота экспрессии молекулы HLA-DR при люминальном и нелюминальном раке молочной железы (РМЖ)

Fig. 3. Frequency of expression of the HLA-DR molecule in luminal and non-luminal breast cancer (BC)

Известно, что при нарастании степени злокачественности РМЖ экспрессия молекул HLA-DR наблюдается реже [7, 8, 17].

По данным литературы, при разных биологических подтипах РМЖ могут наблюдаться различия в экспрессии молекул HLA I класса [17, 18]. В своей работе B.V. Sinn и соавт. отмечают, что у больных с трижды негативным раком по сравнению с другими подтипами выше частота экспрессии молекул HLA I класса. Кроме того, экспрессия данного антигена чаще наблюдалась у пациентов с поражением лимфатических узлов и при опухолях с низкой дифференцировкой (G_3) [17]. Авторы указывают, что экспрессия молекул HLA I класса связана с лучшим ответом на химиотерапию гормоноположительного РМЖ [17]. На основании этих данных мы предполагаем, что в нашей выборке доля трижды негативного рака среди группы нелюминальных опухолей была небольшой. Это обстоятельство может объяснить результаты схожей частоты экспрессии молекул HLA I класса.

Следующим этапом работы стал анализ экспрессии Tfr1 (CD71). В целом по группе экспрессия Tfr1 наблюдалась в подавляющем числе анализируемых образцов, что составило 76,6 % ($n = 85$). При этом в 62,2 % случаев ($n = 69$) опухоли характеризовались мономорфной экспрессией. Мозаичная экспрессия Tfr1 установлена в 14,4 % образцов ($n = 16$).

Результаты изучения экспрессии Tfr1 (CD71) в зависимости от подтипа РМЖ представлены в табл. 5. Как можно видеть из таблицы, при люминальном подтипе частота экспрессии изучаемого антигена достоверно выше, чем при нелюминальном. Выраженность экспрессии антигена Tfr1 при каждом из подтипов варьировала. Оказалось, что клетки люминального РМЖ экспрессируют Tfr1 преимущественно мономорфно, что отмечено в 76,5 % случаев ($n = 39$). Мозаичный тип реакции антигена Tfr1 от-

мечен в 7,8 % образцов. При нелюминальном раке мономорфная экспрессия Tfr1 выявлена в 50,0 % случаев ($n = 30$), а мозаично экспрессировался данный антиген в 20,0 % случаев ($n = 12$). Признаки достоверно взаимосвязаны, $p = 0,014$.

Известно, что рецепторы трансферрина обеспечивают транспорт железа через клеточную мембрану [19]. Железо необходимо для многих клеточных процессов, в том числе для синтеза ДНК и, соответственно, для клеточной пролиферации. Из-за высокой пролиферативной активности клеток злокачественной опухоли отмечается повышенная экспрессия Tfr1 [19–22]. Полученные нами результаты в отношении рецептора Tfr1 хорошо согласуются с данными литературы: гиперэкспрессия Tfr1 отмечается в большинстве образцов РМЖ. При этом следует обратить внимание, что люминальный РМЖ экспрессирует Tfr1 преимущественно мономорфно. По данным исследований, гиперэкспрессия Tfr1 при люминальном раке ассоциируется с выраженной пролиферативной активностью опухоли, более низкой экспрессией рецепторов к стероидным гормонам, экспрессией белка HER2/neu, а также с плохим прогнозом [6, 10]. Опираясь на эти данные, можно заключить, что в анализируемой нами выборке немалую долю, вероятно, составляет люминальный В подтип РМЖ, течение которого, как известно, схоже с течением трижды негативного подтипа.

Далее мы провели оценку выраженности общей лимфоидной инфильтрации на основании количества CD45⁺-лимфоцитов в опухолевых срезах. Мы не обнаружили достоверной разницы в степени инфильтрации опухоли CD45⁺-клетками в зависимости от подтипа РМЖ. Однако считаем важным отметить, что при нелюминальном подтипе выраженная степень CD45-инфильтрации наблюдалась чаще, чем при люминальном подтипе: 49,2 % против 32,7 % (табл. 6).

Таблица 5. Экспрессия трансферринового рецептора (CD71) при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы ($p = 0,014$)
Table 5. Transferrin receptor (CD71) expression in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer ($p = 0,014$)

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtype		Экспрессия CD71 CD71 expression			Всего Total
		отсутствует absent	мозаичная mosaic	мономорфная monomorphic	
Люминальный Luminal	<i>n</i>	8	4	39	51
	%	15,7	7,8	76,5	100,0
Нелюминальный Non-luminal	<i>n</i>	18	12	30	60
	%	30,0	20,0	50,0	100,0
Всего Total	<i>n</i>	26	16	69	111
	%	23,4	14,4	62,2	100,0

Таблица 6. Инфильтрация CD45⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы ($p = 0,205$)
Table 6. CD45⁺ infiltration in luminal and non-luminal breast cancer subtypes ($p = 0,205$)

Подтип рака молочной железы Breast cancer subtype		Инфильтрация CD45 CD45 infiltration			Всего Total
		слабая weak	умеренная moderate	выраженная expressed	
Люминальный Luminal	<i>n</i>	18	17	17	52
	%	34,6	32,7	32,7	100,0
Нелюминальный Non-luminal	<i>n</i>	16	15	30	61
	%	26,2	24,6	49,2	100,0
Всего Total	<i>n</i>	34	32	47	113
	%	30,1	28,3	41,6	100,0

Кроме того, изучая плазмощитарную инфильтрацию, мы установили, что инфильтрация CD38⁺-клетками в зависимости от подтипа РМЖ различалась. При нелюминальном подтипе РМЖ плазмощитарная инфильтрация была более выражена, что наблюдалось в виде мозаичной реакции в 70,7 % случаев ($n = 29$), тогда как при люминальном подтипе — только в 35,0 % случаев ($n = 14$). Признаки были достоверно взаимосвязаны, $p = 0,001$ (рис. 4).

Известно, что выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами наблюдается при трижды негативном РМЖ, который, по последним научным данным, характеризуется более частыми экспрессией PD-L1 и ответом на иммунотерапию [23]. На рис. 5 представлен пример выраженной лимфоидной инфильтрации.

Иной характер иммунных реакций отмечен при люминальном РМЖ, который по сравнению с другими подтипами характеризуется более слабой

лимфоидной инфильтрацией и, кроме того, низкой экспрессией PD-L1, что ассоциируется с резистентностью к иммунотерапии [24, 25].

В рамках обсуждения полученных результатов, считаем уместным обратить внимание на то, что, по данным литературы, имеется связь лимфоидной инфильтрации с экспрессией молекул HLA I класса. В частности, об этом сообщают B.V. Sinn и соавт.: в проведенном ими исследовании выраженная экспрессия молекул HLA I класса была ассоциирована с лимфоидной инфильтрацией опухоли [17]. Такая взаимосвязь установлена также в отношении гормонально-положительного HER2-отрицательного РМЖ [17]. A.F. De Groot и соавт. указывают, что преимущество лимфоидной инфильтрации проявляется именно в случаях экспрессии клетками рака молекул HLA I класса: при неoadъювантной химиотерапии в таких опухолях чаще наблюдался полный патоморфологический ответ [26].

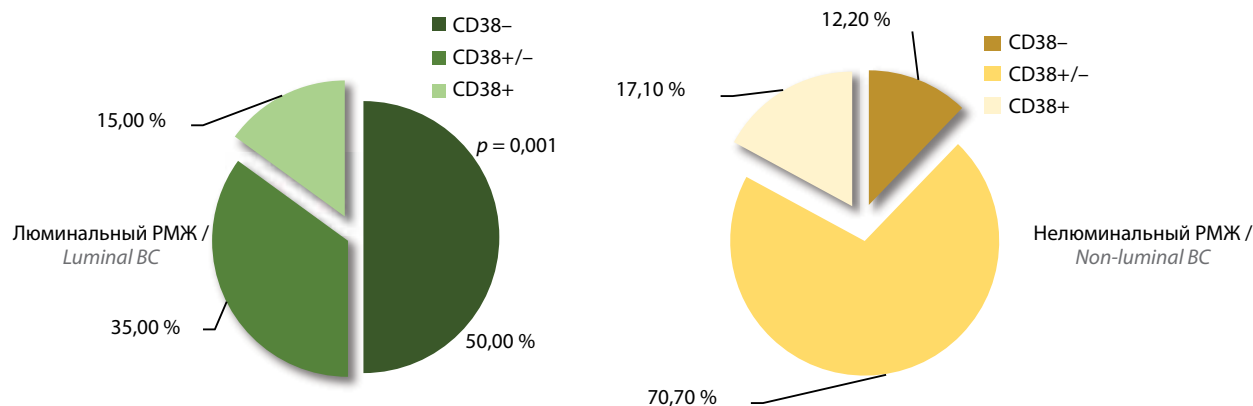


Рис. 4. Инфильтрация CD38⁺-клетками при люминальном и нелюминальном подтипах рака молочной железы (РМЖ)

Fig. 4. Infiltration of CD38⁺ cells in luminal and non-luminal subtypes of breast cancer (BC)

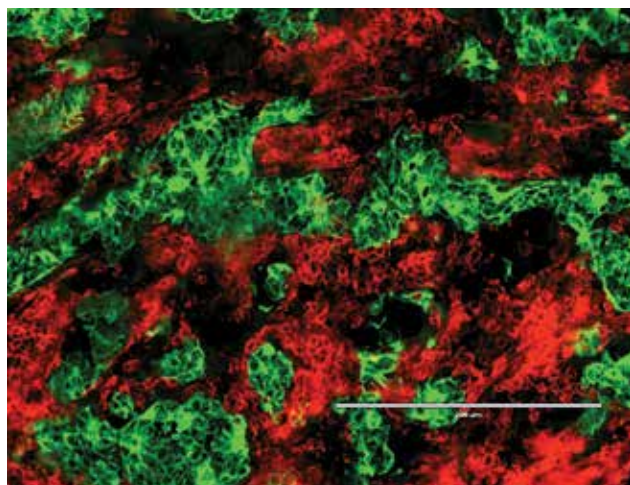


Рис. 5. Инфильтрация опухоли CD45⁺-клетками ($\times 400$): экспрессия KL-1 клетками рака молочной железы — зеленый цвет; лимфоидная инфильтрация (CD45) опухоли — красный цвет

Fig. 5. CD45⁺ infiltration of tumor ($\times 400$): KL-1 expression by breast cancer cells — in green; lymphoid infiltration (CD45) of tumor — in red

В своей работе мы также оценили взаимоотношение лимфоидной инфильтрации с экспрессией молекул HLA I класса. Анализ выполнен в пределах всей когорты больных. Установлена ассоциация экспрессии данного антигена с выраженностью общей лейкоцитарной инфильтрации. В 70,2 % антиген-положительных опухолей отмечена выраженная инфильтрация CD45⁺-клетками (табл. 7). В антиген-отрицательных опухолях такая степень инфильтрации отмечена в меньшем числе наблюдений — 30,0 %. Признаки достоверно взаимосвязаны, $p = 0,007$. При детальном анализе обнаружено, что при мономорфной экспрессии антигенов HLA I класса уровень CD45⁺-инфильтрации выше, чем при мозаичной: 53,3 % (26/47) против 14,9 % (7/47), $p = 0,029$. Результаты проведенного анализа убедительно подтверждают данные литературы и полученные в более ранних работах нашей лаборатории данные [6, 17, 27].

Таким образом, в ходе работы установлено, что частота экспрессии мономорфных детерминант

Таблица 7. CD45-инфильтрация и экспрессия HLA класса I

Table 7. CD45 infiltration and HLA class I expression

CD 45-инфильтрация CD45 infiltration		Экспрессия HLA I класса HLA class I expression		Всего Total
		HLA I–	HLA I+	
Слабая Weak	n	22	12	34
	%	64,7	35,3	100,0
Умеренная Moderate	n	12	18	30
	%	40,0	60,0	100,0
Выраженная Expressed	n	14	33	47
	%	29,8	70,2	100,0

HLA I класса при люминальном и нелюминальном подтипах РМЖ была сопоставима. Как отмечено выше, по данным ряда источников, при разных биологических подтипах РМЖ возможны различия в экспрессии молекул HLA I класса [17, 18]. Например, как сообщают B.V. Sinn и соавт., более высокая частота экспрессии молекул HLA I класса наблюдается у больных с трижды негативным раком. Кроме того, экспрессия данного антигена чаще наблюдалась у пациентов с поражением лимфатических узлов и в опухолях с низкой дифференцировкой (G3) [17].

Это позволило нам предположить, что доля трижды негативного рака среди группы нелюминальных опухолей в нашем исследовании была невелика, что вполне объясняет результаты схожей частоты экспрессии молекул HLA I класса.

Иная картина наблюдалась в отношении молекулы HLA-DR: антиген экспрессировался достоверно чаще при люминальном подтипе РМЖ. Нельзя исключить, что причиной тому может быть преобладание в группе нелюминального рака менее дифференцированных опухолей. Показано, что молекулы HLA-DR экспрессируются реже при нарастании степени злокачественности рака молочной железы [7, 8, 17].

Результаты анализа экспрессии Tfr1 показали, что ее частота достоверно выше при люминальном подтипе рака по сравнению с нелюминальным. Преимущественно отмечался мономорфный тип реакции. Полученные нами результаты убедительно свидетельствуют о высокой пролиферативной активности клеток данного подтипа РМЖ. Исходя из имеющихся в литературе сведений о том, что гиперэкспрессия Tfr1 при люминальном раке ассоциирована с выраженной пролиферативной активностью опухоли, более низкой экспрессией рецепторов к стероидным гормонам и гиперэкспрессией HER2/neu [9, 10], полагаем, можно заключить, что в когорте больных нашего исследования немалую долю составляет люминальный В подтип РМЖ, течение которого схоже с течением трижды негативного подтипа. Дополнительно следует сообщить, что Н.О. Nabashy и соавт., проведя многофакторный анализ, установили, что экспрессия Tfr1 являлась независимым прогностическим фактором при люминальном РМЖ, характеризующимся резистентностью к тамоксифену [10]. Принимая во внимание эти данные, Tfr1, по-видимому, могут рассматриваться как маркер высокопролиферативного пула клеток гормонорезистентного РМЖ. И в этом плане правомерно предположить возможное существование подгруппы люминального В подтипа РМЖ с вышеуказанными характеристиками [10].

Дополнительно, необходимо отметить, что некоторые экспериментальные и клинические исследования продемонстрировали выраженное противоопухолевое действие нацеленных на Tfr1 антител [28, 29]. Вероятно, Tfr1 может рассматриваться как потенциальная молекулярная мишень не только для диагностики, но и для иммунотерапии рака, поскольку экспрессия Tfr1 может быть связана с иммунным микроокружением и посредством регуляции экспрессии PD-L1 влиять на противоопухолевый иммунный ответ [30].

В нашем исследовании установлена выраженная степень лимфоидной инфильтрации, в частности плазмочитарной, при нелюминальном подтипе РМЖ. Выявлена ассоциация экспрессии молекул HLA I класса с выраженностью общелейкоцитарной инфильтрации, что вполне согласуется с данными литературы [17, 26]. Как отмечено выше, выраженная инфильтрация опухоли лимфоцитами наблюдается при трижды негативном РМЖ. Это, вероятно, может объяснить полученные при нелюминальном подтипе результаты.

Об инфильтрации опухоли мононуклеарными клетками (лимфоциты, макрофаги) известно давно, хорошо изучены многие аспекты. Хотелось бы обратить внимание на то, что иммунофенотип опухоли может быть связан с характером интратуморальных иммунных реакций. Так, показано, что HLA-DR-отрицательный РМЖ характеризовался сниженным содержанием активированных интратуморальных Т-лимфоцитов, имел хуже прогноз и ответ на лечение [7, 31]. Опухоли с таким иммунофенотипом в нашем исследовании чаще наблюдались при нелюминальном подтипе РМЖ. В этом отношении определение иммунофенотипических характеристик РМЖ может дополнять картину молекулярного подтипа. Это могло бы позволить стратифицировать больных на группы с целью изучения иммунотерапии: высокую вероятность ответа на анти-PD-1/анти-PD-L1-терапию может предсказывать экспрессия молекул HLA-DR клетками рака [32–34].

Заключение

Частота экспрессии мономорфных детерминант HLA I класса не различалась при молекулярных подтипах РМЖ. Экспрессия молекулы HLA II класса достоверно чаще наблюдалась при люминальном подтипе РМЖ. Экспрессия мономорфных детерминант HLA I класса связана со степенью лимфоидной инфильтрации опухоли. При нелюминальном подтипе плазмочитарная инфильтрация более выражена. Экспрессия Tfr1 достоверно более выражена при люминальном подтипе РМЖ.

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

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71(3):209–49. DOI: 10.3322/caac.21660
- McCormack V., McKenzie F., Foerster M. et al. Breast cancer survival and survival gap apportionment in sub-Saharan Africa (ABC-DO): a prospective cohort study. *Lancet Glob Health* 2020;8(9):e1203–12. DOI: 10.1016/S2214-109X(20)30261-8
- Пак Д.Д., Рассказова Е.А., Данилова Г.В. Подтипы рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2012;(3–4):13–8.
Pak D.D., Rasskazova E.A., Danilova G.V. Subtypes of breast cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = Tumors of female reproductive system 2012;(3–4):13–8. (In Russ.).
- Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(1):53–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
- Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013;31:443–73. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095910
- Артамонова Е.В. Роль иммунофенотипирования в диагностике и прогнозе рака молочной железы. Иммунология гемопоэза 2009;1(9):8–52.
Artamonova E.V. The role of immunophenotyping in the diagnosis and prognosis of breast cancer. *Immunologiya gemopoza* = Immunology of hematopoiesis 2009;1(9):8–52. (In Russ.).
- Буров Д.А., Безнос О.А., Воротников И.К. и др. Клиническое значение экспрессии молекул гистосовместимости на клетках рака молочной железы. Иммунология гемопоэза 2016;2(14):33–53.
Burov D.A., Beznos O.A., Vorotnikov I.K. et al. Clinical significance of expression of histocompatibility molecules on breast cancer cells. *Immunologiya gemopoza* = Immunology of hematopoiesis 2016;2(14):33–53 (In Russ.).
- Беришвили А.И., Тупицын Н.Н., Лактионов К.П. Иммунофенотипическая характеристика отечно-инфильтративной формы рака молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2009;(3–4):15–19.
Berishvili A.I., Tupitsyn N.N., Laktionov K.P. Immunophenotypic characteristics of edematous infiltrative form of breast cancer. *Opukholi zhenskoy reproduktivnoy systemy* = Tumors of female reproductive system 2009;(3–4):15–19. (In Russ.).
- Habashy H.O., Powe D.G., Staka C.M. et al. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat* 2010;119(2):283–93. DOI: 10.1007/s10549-009-0345-x
- Greene C.J., Attwood K., Sharma N.J. et al. Transferrin receptor 1 upregulation in primary tumor and downregulation in benign kidney is associated with progression and mortality in renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* 2017;8(63):107052–75. DOI: 10.18632/oncotarget.22323
- Jamnonngkan W., Thanan R., Techasen A. et al. Upregulation of transferrin receptor-1 induces cholangiocarcinoma progression via induction of labile iron pool. *Tumour Biol* 2017;39(7):1010428317717655. DOI: 10.1177/1010428317717655
- Chan K.T., Choi M.Y., Lai K.K. et al. Overexpression of transferrin receptor CD71 and its tumorigenic properties in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2014;31(3):1296–304. DOI: 10.3892/and.2014.2981
- Rosager A.M., Sørensen M.D., Dahlrot R.H. et al. Transferrin receptor-1 and ferritin heavy and light chains in astrocytic brain tumors: expression and prognostic value. *PLoS One* 2017;12(8):e0182954. DOI: 10.1371/journal.pone.0182954
- Leung T.H., Tang H.W., Siu M.K. et al. CD71⁺ population enriched by HPV-E6 protein promotes cancer aggressiveness and radioresistance in cervical cancer cells. *Mol Cancer Res* 2019;17(9):1867–80. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-19-0068
- Kang M.K., Hur B.I., Ko M.H. et al. Potential identity of multi-potential cancer stem-like subpopulation after radiation of cultured brain glioma. *BMC Neurosci* 2008;9:15. DOI: 10.1186/1471-2202-9-15
- Ohkuma M., Haraguchi N., Ishii H. et al. Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells. *Ann Surg Oncol* 2012;19(4):1357–64. DOI: 10.1245/s10434-011-1739-7
- Sinn B.V., Weber K.E., Schmitt W.D. et al. Human leucocyte antigen class I in hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer: association with response and survival after neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res* 2019;21(1):142. DOI: 10.1186/s13058-019-1231-z
- Pedersen M.H., Hood B.L., Beck H.C. et al. Downregulation of antigen presentation-associated pathway proteins is linked to poor outcome in triple-negative breast cancer patient tumors. *Oncoimmunology* 2017;6(5):e1305531. DOI: 10.1080/2162402X.2017.1305531
- Daniels T.R., Delgado T., Rodriguez J.A. et al. The transferrin receptor part I: biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 2006;121(2):144–58. DOI: 10.1016/j.clim.2006.06.010
- Shen Y., Li X., Dong D. et al. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res* 2018;8(6):916–31.
- Basuli D., Tesfay L., Deng Z. et al. Iron addiction: a novel therapeutic target in ovarian cancer. *Oncogene* 2017;36(29):4089–99. DOI: 10.1038/ncr.2017.11
- Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. Анализ взаимосвязи трансферринового рецептора 1 (TfR1) с клинико-морфологическими и иммунофенотипическими характеристиками рака молочной железы. Современная Онкология 2022;24(3):355–60. DOI: 10.26442/18151434.2022.3.201821
Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. The analysis of the relationship between transferrin receptor 1 (TfR1) and clinical, morphological and immunophenotypic characteristics of breast cancer: retrospective cohort study. *Sovremennaya Onkologiya* = Journal of Modern Oncology 2022;24(3):355–60. (In Russ.). DOI: 10.26442/18151434.2022.3.201821
- Sobral-Leite M., Van de Vijver K., Michaut M. et al. Assessment of PD-L1 expression across breast cancer molecular subtypes, in relation to mutation rate, *BRCA1*-like status, tumor-infiltrating immune cells and survival. *Oncoimmunology* 2018;7(12):e1509820. DOI: 10.1080/2162402X.2018.1509820
- Denkert C., von Minckwitz G., Darb-Esfahani S. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;19(1):40–50. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
- De Groot A.F., Blok E.J., Charehbili A. et al. Strong CD8⁺ lymphocyte infiltration in combination with expression of HLA class I is associated with better tumor control in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer*

- Res Treat 2019;175(3):605–15. DOI: 10.1007/s10549-019-05195-y
26. Енгай Д.А., Поддубная И.В., Тупицын Н.Н., Мечетнер Е.Б. Клинико-иммунологическое значение MDR1/PGP 170 при раке молочной железы. Опухоли женской репродуктивной системы 2008;3:41–3.
Engai D.A., Poddubnaya I.V., Tupitsyn N.N., Mechetner E.B. Clinical and immunological significance of MDR1/PGP 170 in breast cancer. Oukholi zhenskoy reproduktivnoy sistemy = Tumors of female reproductive system 2008;3:41–3. (In Russ.).
 27. Abuzaid H., Abdelrazig S., Ferreira L. et al. Apoferritin-encapsulated Jerantinine A for transferrin receptor targeting and enhanced selectivity in breast cancer therapy. ACS Omega 2022;7(25):21473–82. DOI: 10.1021/acsomega.2c00997
 28. Candelaria P.V., Leoh L.S., Penichet M.L., Daniels-Wells T.R. Antibodies targeting the transferrin receptor 1 (TfR1) as direct anti-cancer agents. Front Immunol 2021;12:607692. DOI: 10.3389/fimmu.2021.607692
 29. Cao J., Hu C., Xu J. et al. Aberrant expression TFR1/CD71 in gastric cancer identifies a novel potential prognostic marker and therapeutic target. Evid Based Complement Alternat Med 2022;2022:4257342. DOI: 10.1155/2022/4257342.
 30. Axelrod M.L., Cook R.S., Johnson D.B., Balko J.M. Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. Clin Cancer Res 2019;25(8):2392–402. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3200
 31. Webb E.S., Liu P., Baleeiro R. et al. Immune checkpoint inhibitors in cancer therapy. J Biomed Res 2018;32(5):317–26. DOI: 10.7555/JBR.31.20160168
 32. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Поддубная И.В. и др. HLA-мономорфные детерминанты первичной опухоли у больных раком молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(2):56–66. DOI:10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66
Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Poddubnaya I.V. et al. HLA-monomorphic determinants of the primary tumor in breast cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(2):56–66. (In Russ.). DOI:10.17650/1726-9784-2022-21-2-56-66
 33. Ashizawa T., Iizuka A., Nonomura C. et al. Antitumor effect of programmed death-1 (PD-1) blockade in humanized the NOG-MHC double knockout mouse. Clin Cancer Res 2017;23(1):149–58. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-0122
 34. Rodig S.J., Gusenleitner D., Jackson D.G. et al. MHC proteins confer differential sensitivity to CTLA-4 and PD-1 blockade in untreated metastatic melanoma. Sci Transl Med 2018;10(450):eaar3342. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar3342

Вклад авторов

С.В. Чулкова: анализ данных, написание текста рукописи, перевод на английский язык, оформление статьи;

Е.Н. Шолохова: получение и анализ данных;

И.В. Поддубная, И.С. Стилиди: анализ статьи;

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, анализ данных, анализ статьи.

Authors' contributions

S.V. Chulkova: data analysis, manuscript writing, translation into English, translation of English-language scientific sources, design of the manuscript;

E.N. Sholokhova: data acquisition and analysis;

I.V. Poddubnaya, I.S. Stilidi: analysis of the manuscript;

N.N. Tupitsyn: research design development, data analysis, manuscript analysis.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>

Е.Н. Шолохова / E.N. Sholokhova: <https://orcid.org/0000-0002-1456-1904>

И.В. Поддубная / I.V. Poddubnaya: <https://orcid.org/0000-0002-0995-1801>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-0493-1166>

Н.Н. Тупицын / N.N. Tupitsyn: <https://orcid.org/0000-0003-3966-128X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без финансовой поддержки.

Funding. The work was done without financial support.

Статья поступила: 10.06.2022. Принята к публикации: 28.10.2022.

Article submitted: 10.06.2022. Accepted for publication: 28.10.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70>

Цитотоксические и противоопухолевые свойства конъюгата метионин γ -лиаза-дайдзеин в комбинации с сульфоксидами S-алк(ен)ил-L-цистеина

Л. Або Кура¹, Е.А. Морозова², В.С. Коваль², В.В. Куликова², Т.С. Спирина³, Е.А. Демидова³, Т.В. Демидкина², В.С. Покровский^{1,3,4}

¹НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

²ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» Российской академии наук; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴Научный центр трансляционной медицины АНО ВО «Научно-технологический университет «Сириус»; Россия; 354340 Сочи, Олимпийский пр-т, 1

Контакты: Вадим Сергеевич Покровский v.pokrovsky@ronc.ru

Введение. Ферментная пролекарственная терапия является новой перспективной стратегией в лечении солидных злокачественных новообразований. Использование двухкомпонентных систем, содержащих фермент и нетоксичный субстрат (пролекарство), позволяет вырабатывать цитотоксические вещества непосредственно у поверхности опухолевой клетки, тем самым снижая общую токсическую нагрузку на организм.

Цель исследования – оценка противоопухолевой активности фармакологических пар C115H метионин γ -лиазы (C115H МГЛ), конъюгированной с дайдзеином (C115H МГЛ-Dz), и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина в отношении солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы. Для определения цитотоксичности фармакологических пар *in vitro* на клеточных линиях рака толстой кишки (SW620), поджелудочной железы (Panc1) и предстательной железы (22Rv1) использовали МТТ-тест. Индукцию апоптоза и изменение клеточного цикла клеток линий 22Rv1, SW620 и SKBR3 исследовали с помощью набора реагентов Muse® Caspase-3/7 и Muse® Cell Cycle Assay kit. Противоопухолевую активность *in vivo* оценивали на ксенографтах SW620, Panc1 и 22Rv1 у мышей Balb/c nude.

Результаты. Показано, что конъюгат C115H МГЛ-Dz обладает максимальной цитотоксичностью в присутствии сульфоксида S-пропил-L-цистеина (пропиина) с IC_{50} равными 3,88 и 5,4 для Panc1 и 22Rv1 соответственно. Дипропилтиосульфид, образующийся в результате реакции β -элиминирования пропиина, катализируемой C115H МГЛ-Dz, индуцирует апоптоз как посредством активации каспаз, так и через альтернативные пути, а также угнетает клеточное деление, способствуя снижению концентрации клеток в фазе G_2/M . Исследование противоопухолевой активности фармакологической пары *in vivo* показало уменьшение объема опухоли у ксенографтов Panc1 (торможение роста опухоли (ТРО) 67,5 %, $p = 0,004$), SW620 (ТРО 22,07 %, $p = 0,12$) и 22Rv1 (ТРО 70 %, $p = 0,043$).

Выводы. Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz/пропиин значительно уменьшает рост злокачественных солидных опухолей и может рассматриваться в качестве возможного терапевтического агента в ферментной пролекарственной терапии злокачественных новообразований.

Ключевые слова: метионин γ -лиаза, ферментная пролекарственная терапия, направленная доставка, субстраты-пролекарства, тиосульфиды

Для цитирования: Або Кура Л., Морозова Е.А., Коваль В.С. и др. Цитотоксические и противоопухолевые свойства конъюгата метионин γ -лиаза-дайдзеин в комбинации с сульфоксидами S-алк(ен)ил-L-цистеина. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):62–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70

Cytotoxic and antitumor properties of methionine γ -lyase conjugate in combination with S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides

Louay Abo Qoura¹, Elena A. Morozova², Vasily S. Koval², Vitalia V. Kulikova², Tatiana S. Spirina³, Elena A. Demidova³, Tatyana V. Demidkina², Vadim S. Pokrovsky^{1,3,4}

¹Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, RUDN University; 6 Miklukho-Maklaya St., 117198 Moscow, Russia;

²V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., 119991 Moscow, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, 115522 Moscow, Russia;

⁴Scientific Center for Translational Medicine, Sirius University of Science and Technology; 1 Olympiyskiy Ave., 354340 Sochi, Russia

Contacts: Vadim Sergeevich Pokrovsky v.pokrovsky@rnc.ru

Background. Enzyme prodrug therapy is a promising strategy to treat solid malignancies. The utilization of two-component systems, including an enzyme and a non-toxic prodrug, to generate cytotoxic compounds directly at the surface of the tumor cell can be successful strategy in reducing the overall toxic load on the body.

Aim. To determine antitumor activity of the pharmacological pair C115H methionine γ -lyase (C115H MGL) conjugated with daidzein (C115H MGL-Dz) and of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides against various types of solid tumors *in vitro* and *in vivo*.

Materials. MTT-test was used to determine the cytotoxicity of C115H MGL-Dz in the presence of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides *in vitro* against SW620 (colon cancer), Panc1 (pancreatic cancer), and 22Rv1 (prostate cancer). Apoptosis induction and cell cycle alteration in 22Rv1, SW620, and SKBR3 cell lines were studied using the Muse® Caspase-3/7 и Muse® Cell Cycle Assay kits. *In vivo* anticancer activity was studied on SW620, Panc1, and 22Rv1 subcutaneous xenografts in Balb/c nude mice.

Results. The C115H MGL-Dz had the maximum cytotoxic activity in the presence of S-propyl-L-cysteine sulfoxide (propiin) with IC_{50} values: 3.88 and 5.4 for Panc1 and 22Rv1, respectively. Dipropyl thiosulfinate formed by the β -elimination of propiin catalyzed by C115H MGL-Dz, induces apoptosis through both the activation of caspases and alternative pathways, and also it inhibits cell division, contributing to a decrease in the concentration of cells in the G_2/M phase. The anticancer efficacy of the pharmacological pair C115H-Dz/propiin *in vivo* indicated a significant decrease in Panc1 tumor volume (tumor growth inhibition (TGI) 67.5 %, $p = 0.004$), SW620 (TGI 22.07 %, $p = 0.12$) and 22Rv1 (TGI 70 %, $p = 0.043$).

Conclusion. Pharmacological pair C115H MGL-Dz/propiin was capable of suppressing tumor development in malignant solid tumors and might be considered as a potential anticancer approach in cancer prodrug therapy.

Keywords: methionine γ -lyase, enzyme prodrug therapy, drug targeting, substrate-prodrug, thiosulfates

For citation: Abo Qoura L., Morozova E.A., Koval V.S. et al. Cytotoxic and antitumor properties of methionine γ -lyase conjugate in combination with S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21 (4):62–70. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-62-70

Введение

В последние годы в разработке новых противоопухолевых препаратов и схем комбинированной лекарственной терапии достигнут значительный прогресс. Некоторые опухоли гормонально зависимы, их рост и метастазирование стимулируются эстрогенами и прогестероном [1]. Рецепторы к гормонам, как и другие мембранные белки, могут использоваться в ферментной пролекарственной терапии рака как мишени для направленной доставки ферментов к солидным новообразованиям.

Метионин γ -лиаза (МГЛ) (КФ 4.4.1.11) — пиримидин-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакции γ -элиминирования L-метионина и его аналогов и β -элиминирования S-замещенных аналогов L-цистеина [2]. МГЛ и ее мутантная форма с заменой цистеина 115 на гистидин эффективно расщепляют сульфоксиды S-алк(en)ил-L-цистеина

с образованием тиосульфатов, обладающих противоопухолевой активностью [3].

Наиболее известным тиосульфатом является аллицин, обладающий противоопухолевыми, противомикробными и противовирусными свойствами [4, 5].

До настоящего времени все *in vivo* исследования МГЛ в терапии рака сводились к использованию непосредственно самого фермента в качестве противоопухолевого агента для метионинзависимых новообразований [6, 7]. Способность МГЛ катализировать реакцию β -элиминирования сульфоксидов S-алк(en)ил-L-цистеина с образованием цитотоксических тиосульфатов открывает возможность использования фермента в пролекарственной терапии рака в качестве ферментной составляющей фармакологической пары C115H МГЛ/сульфоксиды S-алк(en)ил-L-цистеина.

Ассоциированный с G-белком рецептор эстрогена 1 (GPER1), также известный как GPR30, — недавно

описанный мембранный рецептор эстрогена, который обеспечивает реализацию негеномных эффектов эстрогенов, приводит к мобилизации внутриклеточного кальция и синтезу фосфатидилинозитол-3,4,5-трисфосфата [8]. Высокая экспрессия GPER характерна для клеток рака поджелудочной железы [9], молочной железы [10], толстой кишки [11] и предстательной железы [12]. Дайдзеин является структурным аналогом природных эстрогенов и может связываться с высоким сродством с GPER [13].

В настоящей работе для направленной доставки ферментного компонента фармакологической пары к поверхности эстрогензависимых опухолей нами был получен конъюгат C115H МГЛ с дайдеином (C115H МГЛ-Dz). Цитотоксическое действие C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина было оценено на клеточных линиях рака толстой кишки SW620, рака поджелудочной железы Panc1 и рака предстательной железы 22Rv1. Противоопухолевая эффективность фармакологической пары C115H МГЛ-Dz/сульфоксид S-пропил-L-цистеина была показана на ксенографтах SW620, Panc1 и 22Rv1 у мышей Balb/c nude.

Цель исследования — оценка противоопухолевой активности фармакологических пар C115H МГЛ-Dz и сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина в отношении солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

Реактивы. Плазмида с геном C115H МГЛ из *Clostridium novyi* была создана компанией «Евроген» (Россия). S-метил-L-цистеин, никотинамидадениндинуклеотид восстановленный и бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) были получены от Sigma-Aldrich (Германия). L-глутамин, пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ) и D, L-дитиотреитол (ДТТ) были приобретены у компании Serva (Германия). Сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина (S-метил-L-цистеин сульфоксид (метиин), S-этил-L-цистеин сульфоксид (этиин), S-пропил-L-цистеин сульфоксид (пропиин), S-аллил-L-цистеин сульфоксид (аллиин)) были получены, как описано ранее [14, 15]. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) была приобретена у фирмы GE Healthcare (США). Использована фетальная бычья сыворотка (FBS) (HyClone, США). Muse® Cell Cycle Assay kit (MCH100106) был получен от Merck (Германия), Muse® Caspase-3/7 kit (MCH100108) — от Luminex (США).

Выделение C115H МГЛ. Клетки *E. coli* BL21 (DE3), содержащие плазмиду с геном мутантной формы МГЛ, выращивали, и фермент очищали, как описано ранее [16]. Концентрация C115H МГЛ была рассчитана с использованием коэффициента поглощения $A_{1\%}^{278} = 0,8$ при 278 нм [17]. Активность фермента определяли в реакции β -элиминирования S-метил-L-

цистеина. За единицу ферментативной активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкМ/мин кетокислоты.

Синтез C115H МГЛ-Dz конъюгата. N-гидроксисукцинимидный эфир 7-(O)-карбоксиметила (дайдеин-NHS) был синтезирован по методике [18]. К раствору 400 мг C115H МГЛ в 50 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 7,0), содержащего 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ПЛФ и 10 % глицерина, добавляли 400 мкл дайдеин-NHS в диметилформамиде, и реакционную смесь перемешивали 4 ч при 4 °С. Далее препарат диализовали против калий-фосфатного буфера (pH 8,0), содержащего 1 мМ ЭДТА, 0,1 мМ ПЛФ, 1 мМ ДТТ.

Оценка цитотоксичности конъюгатов C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов. Штаммы клеточных линий аденокарциномы толстой кишки человека SW620, рака поджелудочной железы человека Panc1 и рака предстательной железы человека 22Rv1 были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточные культуры культивировали в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂ и 95 % влажности) в питательной среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 % FBS и 100 мкг/мл пенициллина. Пересев клеточных монослойных линий осуществляли 3 раза в неделю, для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор Версена. Для оценки цитотоксичности C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина клетки, достигшие логарифмической фазы роста, пересекали в 96-луночные планшеты в количестве 6–8 × 10³ клеток на лунку и преинкубировали в указанных выше условиях в течение 24 ч перед добавлением тестируемых препаратов. К преинкубированным клеткам добавляли C115H МГЛ-Dz до конечной концентрации 1–64 мМ (2-кратное серийное разведение) и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 мин. Несвязавшиеся конъюгаты удаляли 3-кратным промыванием клеток культуральной средой DMEM, затем добавляли сульфоксиды S-алк(ен)ил-L-цистеина до конечной концентрации 1 мг/мл. Уровень клеточного метаболизма в конце инкубационного периода (24 ч) определяли колориметрическим методом МТТ [19]. Оптическую плотность полученного раствора формазана в диметилсульфоксиде измеряли на планшетном спектрофотометре MultiSkan MS (LabSystems, Финляндия) при длине волны 540 нм. Ингибирующую концентрацию (IC₅₀) рассчитывали методом нелинейной регрессии.

Оценка апоптоза. Клетки линии 22Rv1 пересекали в 6-луночные планшеты в количестве 6 × 10⁴ клеток на лунку в 3 мл культуральной среды на основе RPMI-1640 (Sigma, США), содержащей 2 мМ L-глутамин, 10 % FBS и 100 мкг/мл пенициллина,

преинкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 24 ч перед добавлением тестируемых препаратов C115H МГЛ-Dz в концентрациях 0,1; 0,4 и 0,5 μM и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂. Несвязавшиеся конъюгаты удаляли 3-кратным промыванием клеток средой RPMI-1640, затем добавляли пропиин в концентрации 1 мг/мл на 24 ч. После инкубации собирали взвешенные клетки. Для снятия клеток с пластиковой поверхности использовали стандартный раствор трипсин-ЭДТА 0,05 % («ПанЭко», Россия) и осаждали при 1000 об/мин в течение 5 мин. Исследования проводили в дуплетах с использованием набора реагентов Muse® Caspase-3/7 kit согласно инструкции производителя. Для учета результатов использовали клеточный анализатор Muse® Cell Analyzer (Millipore, Германия).

Анализ клеточного цикла. Влияние C115H МГЛ-Dz/пропиина на деление клеток линий 22Rv1, SW620 и SKBR3 оценивали по изменению клеточного цикла. Клетки инкубировали с пропином, как указано выше, в течение 24 ч. Исследования проводили в дуплетах с использованием набора реагентов Muse® Cell Cycle Assay Kit согласно инструкции производителя. Для учета результатов использовали Muse® Cell Analyzer, анализируя не менее 2000 клеток в каждой пробе.

Оценка противоопухолевой активности *in vivo*. Оценку противоопухолевой активности C115H МГЛ-Dz/пропиин *in vivo* проводили на перевиваемых ксенографтах человека у мышей Balb/c nude. В исследовании использовали мышей Balb/c nude в возрасте 6–10 нед с массой тела 23 ± 2 г. Мышей содержали в конвенциональном виварии при естественном освещении, регулируемой температуре воздуха (25 °C), с постоянным доступом к воде и корму. Все эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на биологических моделях и экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Иммунизационные материалы (матригель) использовали для повышения туморогенности и приживаемости клеток. После того как опухоли достигли размера ~100 мм³, мышей рандомизировали в 4 группы по 5 животных: 1-я группа (контроль) — введение фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) внутрибрюшинно в объеме 200 мкл, через 1,5 ч введение 100 мкл PBS внутрь опухоли; 2-я группа — введение внутрибрюшинно 30 ед C115H МГЛ-Dz в 200 мкл PBS, через 1,5 ч введение внутрь опухоли 3 мг пропиина в 100 мкл PBS; 3-я группа — схема, как во 2-й группе, но вместо пропиина вводили PBS; 4-я группа — введение неконъюгированной C115H МГЛ (30 ед в 200 мкл PBS) с последующей инъекцией пропиина (3 мг в 100 мкл PBS). Введение препаратов продолжали в течение 10 дней с интервалом

24 ч. Объем опухоли и массу тела измеряли 2 раза в неделю с помощью электронного штангенциркуля. Критериями оценки противоопухолевой активности являлось торможение роста опухоли (ТРО, %) у экспериментальных животных по сравнению с контролем, рассчитываемое по формуле:

$$\text{ТРО} = \frac{V_c - V_e}{V_c} \times 100,$$

где V_c — средний объем опухолей в контрольной группе (мм³), V_e — средний объем опухолей в опытной группе (мм³).

Минимальные критерии активности — ТРО ≥ 50 %.

Статистический анализ. Результаты были представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения. Сравнительный анализ результатов опытных групп и контрольной проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Цитотоксический эффект C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина. Направленная доставка МГЛ C115H в составе фармакологических пар (C115H МГЛ-Dz/сульфоксид) для образования тиосульфидов непосредственно на поверхности опухолевых клеток может снизить токсическое действие тиосульфидов на организм в целом. Для того чтобы выявить линии опухолей, наиболее чувствительных к C115H-Dz в присутствии метиина, этиина, пропиина или аллиина, фармакологическую пару тестировали на культурах опухолевых клеток человека: рак толстой кишки (SW620), рак поджелудочной железы (Panc1) и рак предстательной железы человека (22Rv1). Как видно из табл. 1, C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина оказывает более выраженное антипролиферативное действие на различные линии опухолевых клеток. Клетки Panc1 проявляли максимальную чувствительность к C115H МГЛ-Dz/сульфоксидам, и для них наблюдалось самое низкое значение IC₅₀ (3,8 μM). Клетки 22Rv1 проявляли бо́льшую чувствительность к C115H-Dz/сульфоксидам, чем клетки SW620, со значениями IC₅₀, равными 5,4 μM.

Индукция апоптоза и изменения клеточного цикла под влиянием C115H МГЛ-Dz/пропиина. Используемый метод учета позволял детально оценить индукцию апоптоза в культуре клеток под воздействием изучаемого препарата. В частности, отдельно учитывали концентрацию клеток, содержащих в цитоплазме активные каспазы 3/7, с неповрежденной и поврежденной мембраной (ранняя и поздняя фазы апоптоза соответственно), а также погибших клеток без

Таблица 1. Цитотоксичность C115H МГЛ-Dz в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина*

Table 1. Cytotoxicity of C115H MGL-Dz in the presence of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides*

Субстрат Substrate	IC ₅₀ C115H МГЛ-Dz, μM IC ₅₀ C115H MGL-Dz, μM		
	Линии опухолевых клеток Tumor cell lines		
	SW620	Panc1	22Rv1
Без субстратов Without substrates	Не обнаружено Not detected	Не обнаружено Not detected	Не обнаружено Not detected
Аллиин Alliin	Не обнаружено Not detected	4,5	8,6
Метиин Methiin	Не обнаружено Not detected	5,7	9,8
Этиин Ethiin	Не обнаружено Not detected	5,3	9,9
Пропиин Propiin	Не обнаружено Not detected	3,88	5,4

*Концентрация сульфоксидов – 1 мг/мл.

*The concentration of sulfoxides – 1 mg/ml.

Примечание. C115H МГЛ-Dz – C115H метионин γ-лиаза, конъюгированная с дайдзеином; IC₅₀ – ингибирующая концентрация на 50 %.

Note. C115H MGL-Dz – C115H methionine γ-lyase conjugated with daidzein; IC₅₀ – inhibitory concentration by 50 %.

признаков активации каспаз (некроз или каспазане-зависимый апоптоз). Применение C115H МГЛ-Dz в различных концентрациях (0,1; 0,4 и 0,5 μM) в присутствии пропиина (1 мг/мл) приводило к дозозависимому увеличению концентрации клеток в ранней фазе апоптоза (в клетках 22Rv1: 21,22; 19,56 и 24,02 % соответственно) по сравнению с контролем (<2 %) (рис. 1). После коинкубации с C115H МГЛ-Dz/пропином наблюдалось увеличение популяции клеток в поздней стадии апоптоза: с 35,91 до 38,97 % на линии клеток 22Rv1. Менее 2 % клеточной популяции демонстрировали признаки гибели без активации каспаз во всех протестированных клеточных линиях при инкубации с C115H МГЛ-Dz/пропином. Эти результаты свидетельствуют о том, что дипропилтиосульфат, образующийся в результате реакции β-элиминирования пропиина, катализируемой C115H МГЛ-Dz, может индуцировать апоптоз как посредством активации каспаз, так и через альтернативные пути.

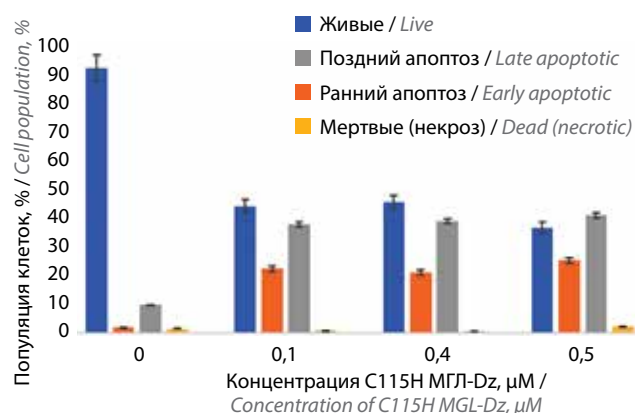


Рис. 1. Активность каспаз 3/7 при индукции апоптоза на клеточной линии рака предстательной железы (22Rv1). Здесь и на рис. 2: C115H МГЛ-Dz – C115H метионин γ-лиаза, конъюгированная с дайдзеином

Анализ популяции клеток, находящихся на стадиях клеточного цикла G₀/G₁, S, G₂/M, показал, что при коинкубации с 0,1 и 0,4 μM C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина клетки 22Rv1 делились более активно (24,7 и 29,9 % в фазе G₂/M соответственно) по сравнению с контрольной группой, где концентрация клеток в этой фазе соответствовала 19,7 % (рис. 2). Аналогичный результат наблюдали после коинкубации клеток линии SKBR3 с 0,1 и 0,4 μM C115H МГЛ-Dz в присутствии пропиина: 14,2 и 18,0 % клеток в фазе G₂/M соответственно (см. рис. 2). Наблюдали снижение концентрации клеток в состоянии покоя (фаза G₀/G₁): с 60,8 % в контрольной группе до 55,7 % (0,1 μM C115H МГЛ-Dz) и 52,3 % (0,4 μM C115H МГЛ-Dz) в клетках 22Rv1 и с 71,9 % в контрольной группе до 66,4 % (0,1 μM C115H МГЛ-Dz) и 62,9 % (0,4 μM C115H МГЛ-Dz) в клетках SKBR3. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что дипропилтиосульфат, ферментативно образующийся в паре C115H МГЛ-Dz/пропиин, опосредовал снижение концентрации клеток в фазе G₂/M, т. е. оказывал антипролиферативный эффект.

Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz/пропиин ингибирует рост подкожных опухолевых ксенографтов рака поджелудочной железы человека Panc1. Терапия животных фармакологической парой C115H МГЛ-Dz/пропиин приводила к значительному уменьшению размера опухолей Panc1 (ТРО 67 %, $p = 0,004$) по сравнению с контролем. Введение животным фармакологической пары с неконъюгированным ферментом (C115H МГЛ/пропиин), а также фармакологической пары, где сульфоксид заменен на PBS (C115H МГЛ-Dz/PBS), приводило к уменьшению роста опухоли, однако эффект был статистически незначимым (ТРО 48 % ($p = 0,160$) и ТРО 51 % ($p = 0,462$) соответственно) (табл. 2).

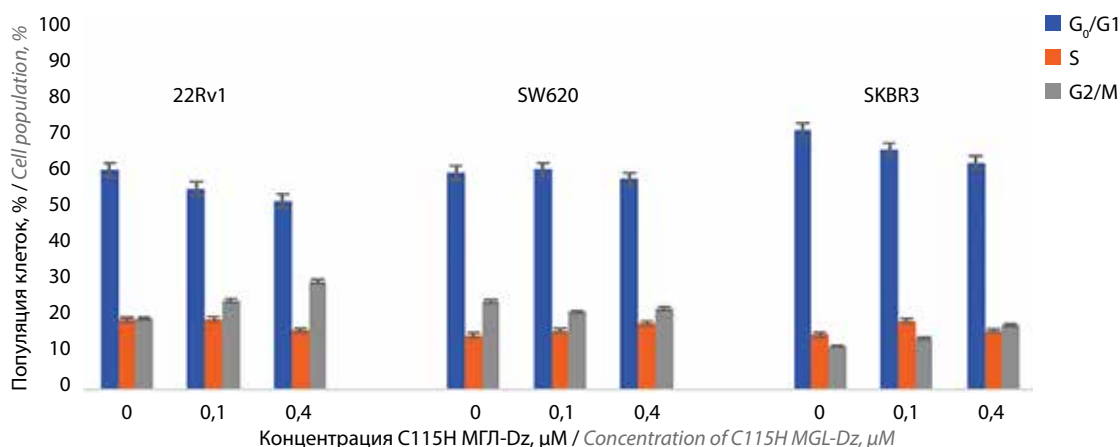


Рис. 2. Анализ фазы клеточного цикла на клеточных линиях 22Rv1, SW620 и SKBR3 при лечении с C115H МГЛ-Dz/пропином

Fig. 2. Analysis of cell cycle phases in 22Rv1, SW620, and SKBR3 cell lines treated with C115H MGL-Dz/propine

Таблица 2. Противоопухолевая активность фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин на модели рака поджелудочной железы человека Panc1

Table 2. Antitumor effect of pharmacological pairs C115H MGL-Dz/propine, C115H MGL-Dz/PBS and C115H MGL/propine in the Panc1 human pancreatic cancer model

Группа Group	Начальный объем опухоли, мм ³ Initial tumor volume, mm ³	Конечный объем опухоли, мм ³ Final tumor volume, mm ³	ТРО, % TGI, %	Начальная масса тела мыши, г Initial body weight of a mouse, g	Конечная масса тела мыши, г Final body weight of a mouse, g
1-я (контроль) 1 st (control)	70,3 ± 10,6	442,9 ± 65,5	—	23,6 ± 0,6	23,7 ± 0,7
2-я (C115H МГЛ-Dz/пропиин) 2 nd (C115H MGL-Dz/propine)	80,3 ± 10,6	143,9 ± 36,9	67*	23,2 ± 0,8	22,5 ± 0,6
3-я (C115H МГЛ-Dz/PBS) 3 rd (C115H MGL-Dz/PBS)	69,8 ± 17,7	227,9 ± 61,2	48**	24,3 ± 0,2	24,5 ± 0,6
4-я (C115H МГЛ/пропиин) 4 th (C115H MGL/propine)	69,9 ± 18,6	215,7 ± 34,1	51***	24,1 ± 1,4	24,4 ± 2,0

* $p = 0,004$; ** $p = 0,160$; *** $p = 0,462$.

Примечание. Здесь и в табл. 3, 4: C115H МГЛ – C115H метионин γ -лиаза; C115H МГЛ-Dz – C115H метионин γ -лиаза, конъюгированная с дайдезином; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; ТРО – торможение роста опухоли.

Note. Here and in the table. 3, 4: C115H MGL-C115H methionine- γ -lyase; C115H MGL-Dz – C115H methionine- γ -lyase conjugated with daidzein; PBS – phosphate buffered saline; TGI – tumor growth inhibition.

C115H МГЛ-Dz/пропиин подавляет рост ксенографтов рака толстой кишки человека SW620. К 3-му дню лечения у всех животных, которым были имплантированы суспензии клеточных линий SW620, сформировались подкожные макроскопические опухолевые узлы. Введение фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ/пропиин или C115H МГЛ-Dz/PBS приводило к уменьшению роста опухоли, однако эффект был статистически незначимым (табл. 3).

Противоопухолевая активность C115H МГЛ-Dz/пропиин *in vivo* на модели рака предстательной железы

22Rv1. Как видно из табл. 4, введение животным фармакологической пары C115H МГЛ-Dz/пропиин приводило к значительному уменьшению объема опухолевой массы по сравнению с контролем (ТРО 70 %, $p = 0,043$). Введение мышам C115H МГЛ-Dz/PBS приводило к снижению объема опухоли по сравнению с контролем (ТРО 23 %, $p = 0,165$). Средний объем опухоли достигал $460,2 \pm 108,0$ мм³ в контроле, $436,1 \pm 268,6$ мм³ – в группе C115H МГЛ/пропиина.

Полученные результаты показывают, что конъюгаты C115H МГЛ-Dz могут связываться на поверхности раковых клеток, при введении сульфоксидов

Таблица 3. Противоопухолевая активность фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин на модели рака толстой кишки человека SW620

Table 3. Antitumor activity of pharmacological pairs C115H MGL-Dz/propine, C115H MGL-Dz/PBS and C115H MGL/propine in SW620 human colon cancer model

Группа Group	Начальный объем опухоли, мм ³ Initial tumor volume, mm ³	Конечный объем опухоли, мм ³ Final tumor volume, mm ³	ТРО, % TGI, %	Начальная масса тела мыши, г Initial body weight of a mouse, g	Конечная масса тела мыши, г Final body weight of a mouse, g
1-я (контроль) 1 st (control)	82,0 ± 12,9	219,0 ± 26,8	—	25,3 ± 0,9	25,8 ± 0,4
2-я (C115H МГЛ-Dz/про- пиин) 2 nd (C115H MGL-Dz/propine)	82,1 ± 11,5	170,9 ± 92,9	22,07*	24,4 ± 0,9	22,1 ± 0,4
3-я (C115H МГЛ-Dz/PBS) 3 rd (C115H MGL-Dz/PBS)	84,8 ± 10,4	185,0 ± 118,8	15,46**	26,7 ± 0,6	24,8 ± 1,9
4-я (C115H МГЛ/пропиин) 4 th (C115H MGL/propine)	83,4 ± 9,3	167,1 ± 35,7	23,78***	24,7 ± 0,9	24,6 ± 1,0

* $p = 0,12$; ** $p = 0,25$; *** $p = 0,15$.

Таблица 4. Противоопухолевая активность фармакологических пар C115H МГЛ-Dz/пропиин, C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин на модели рака предстательной железы 22Rv1

Table 4. Antitumor activity of pharmacological pairs C115H MGL-Dz/propine, C115H MGL-Dz/PBS and C115H MGL/propine in 22Rv1 prostate cancer model

Группа Group	Начальный объем опухоли, мм ³ Initial tumor volume, mm ³	Конечный объем опухоли, мм ³ Final tumor volume, mm ³	ТРО, % TGI, %	Начальная масса тела мыши, г Initial body weight of a mouse, g	Конечная масса тела мыши, г Final body weight of a mouse, g
1-я (контроль) 1 st (control)	98,7 ± 45,4	460,2 ± 108,0	—	25,2 ± 1,6	28,8 ± 1,2
2-я (C115H МГЛ-Dz/про- пиин) 2 nd (C115H MGL-Dz/propine)	105,4 ± 55,7	138,5 ± 73,3	70*	25,2 ± 2,8	25,8 ± 2,3
3-я (C115H МГЛ-Dz/PBS) 3 rd (C115H MGL-Dz/PBS)	119,8 ± 82,3	352,1 ± 144,8	23**	24,6 ± 1,4	23,7 ± 3,7
4-я (C115H МГЛ/пропиин) 4 th (C115H MGL/propine)	104,2 ± 91,1	436,1 ± 268,6	5***	25,3 ± 0,4	26,1 ± 0,8

* $p = 0,043$; ** $p = 0,165$; *** $p > 0,05$.

в опухоль C115H МГЛ-Dz катализируют расщепление сульфоксидов с образованием тиосульфидов, обладающих противоопухолевой активностью. При лечении животных фармакологической парой C115H МГЛ-Dz/пропиин наблюдалось значительное уменьшение объема опухоли для всех линий. Существенных изменений массы тела мышей не наблюдалось ни в одной из групп. Это свидетельствует о том, что схема лечения хорошо переносится и не имеет явных побочных эффектов. В опытных группах — C115H МГЛ-Dz/PBS и C115H МГЛ/пропиин — не наблюда-

лось значительного эффекта в уменьшении объема опухоли во всех исследованных клеточных линиях *in vivo*.

Выводы

Получены конъюгаты C115H МГЛ из *Clostridium novyi* с дайдзеином. Цитотоксичность конъюгата в присутствии сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина была продемонстрирована *in vitro* на различных линиях опухолевых клеток. Фармакологическая пара C115H МГЛ-Dz/пропиин уменьшала рост солидных злокачественных новообразований *in vivo*. Наиболее

чувствительными оказались ксенографты 22Rv1. Использование конъюгированной с дайдезином C115H МГЛ в качестве компонента фармакологической пары C115H МГЛ-Dz/сульфоксиды S-алк(ен)ил-

L-цистеина позволяет вырабатывать противоопухолевые тиосульфиды непосредственно у поверхности раковой клетки и тем самым значительно минимизировать возможные негативные побочные эффекты.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Henderson B.E., Ross R.K., Pike M.C., Casagrande J.T. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 1982;42(8):3232–9.
- Tanaka H., Esaki N., Soda K. A versatile bacterial enzyme: l-methionine γ -lyase. *Enzyme Microb Technol* 1985;7(11):530–7. DOI: 10.1016/0141-0229(85)90094-8
- Morozova E., Anufrieva N., Koval V. et al. Conjugates of methionine γ -lyase with polysialic acid: two approaches to antitumor therapy. *Int J Biol Macromol* 2021;182:394–401. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.03.201
- Fujisawa H., Watanabe K., Suma K. et al. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73(9):1948–55. DOI: 10.1271/bbb.90096
- Weber N.D., Andersen D.O., North J.A. et al. *In vitro* virucidal effects of *Allium sativum* (garlic) extract and compounds. *Planta Med* 1992;58(5):417–23. DOI: 10.1055/s-2006-961504
- Hoffman R.M. Development of recombinant methioninase to target the general cancer-specific metabolic defect of methionine dependence: a 40-year odyssey. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15(1):21–31. DOI: 10.1517/14712598.2015.963050
- Pokrovsky V.S., Anisimova N.Yu., Davydov D.Zh. et al. Methionine gamma lyase from *Clostridium sporogenes* increases the anticancer effect of doxorubicin in A549 cells and human cancer xenografts. *Invest New Drugs* 2019;37(2):201–9. DOI: 10.1007/s10637-018-0619-4
- Filardo E.J., Quinn J.A., Frackelton A.R.J., Bland K.I. Estrogen action *via* the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 2002;16(1):70–84. DOI: 10.1210/mend.16.1.0758
- Mesmar F., Dai B., Ibrahim A. et al. Clinical candidate and genistein analogue AXP107-11 has chemoenhancing functions in pancreatic adenocarcinoma through G protein-coupled estrogen receptor signaling. *Cancer Med* 2019;8(18):7705–19. DOI: 10.1002/cam4.2581
- Ariyani W., Miyazaki W., Amano I. et al. Soy isoflavones accelerate glial cell migration *via* GPER-mediated signal transduction pathway. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11:554941. DOI: 10.3389/fendo.2020.554941
- Jacenic D., Beswick E.J., Krajewska W.M., Prossnitz E.R. G protein-coupled estrogen receptor in colon function, immune regulation and carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2019;25(30):4092–104. DOI: 10.3748/wjg.v25.i30.4092
- Chan Q.K.Y., Lam H.-M., Ng C.-F. et al. Activation of GPR30 inhibits the growth of prostate cancer cells through sustained activation of Erk1/2, c-jun/c-fos-dependent upregulation of p21, and induction of G2 cell-cycle arrest. *Cell Death Differ* 2010;17(9):1511–23. DOI: 10.1038/cdd.2010.20
- Sarkar F.H., Li Y. Soy isoflavones and cancer prevention. *Cancer Invest* 2003;21(5):744–57. DOI: 10.1081/CNV-120023773
- Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N. et al. Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfonates. *Biochimie* 2016;128–129:92–8. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.07.007
- Kulikova V., Morozova E., Rodionov A. et al. Non-stereoselective decomposition of ($\pm$)-S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides to antibacterial thiosulfonates catalyzed by C115H mutant methionine γ -lyase from *Citrobacter freundii*. *Biochimie* 2018;151:42–4. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.05.011
- Kulikova V.V., Morozova E.A., Revtovich S.V. et al. Gene cloning, characterization, and cytotoxic activity of methionine γ -lyase from *Clostridium novyi*. *IUBMB Life* 2017;69(9):668–76. DOI: 10.1002/iub.1649
- Morozova E.A., Bazhulina N.P., Anufrieva N.V. et al. Kinetic and spectral parameters of interaction of *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase with amino acids. *Biochemistry (Moscow)* 2010;75(10):1272–80. DOI: 10.1134/S0006297910100093
- Kohen F., Gayer B., Kulik T. et al. Synthesis and evaluation of the antiproliferative activities of derivatives of carboxyalkyl isoflavones linked to N-t-Boc-hexylenediamine. *J Med Chem* 2007;50(25):6405–10. DOI: 10.1021/jm070727z
- Bank U., Reinhold D., Ansorge S. [Measurement of cellular activity with the MTT test. Optimization of the method (In German)]. *Allerg Immunol (Leipzig)* 1991;37(3–4):119–23.

Благодарности

Авторы благодарят д.б.н. Н.Ю. Анисимову, ведущего научного сотрудника Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, за помощь в проведении экспериментов *in vitro*.

Acknowledgments

The authors thank N.Yu. Anisimova, PhD, DSc, a leading researcher at the Research Institute for Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, for assistance in conducting experiments *in vitro*.

Вклад авторов

Л. Або Кура: получение данных для анализа, анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи, написание текста статьи; Е.А. Морозова, В.С. Покровский: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных; В.С. Коваль, В.В. Куликова, Т.С. Спирина, Е.А. Демидова: получение данных для анализа, анализ полученных данных; Т.В. Демидкина: разработка дизайна исследования.

Author's contribution

L. Abo Qoura: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article, writing of the manuscript;
E.A. Morozova, V.S. Pokrovsky: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data;
V.S. Koval., V.V. Kulikova, T.S. Spirina, E.A. Demidova: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;
T.V. Demidkina: research design development.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л. Або Кура / L. Abo Qoura: <https://orcid.org/0000-0001-5391-5077>
Е.А. Морозова / E.A. Morozova: <https://orcid.org/0000-0003-2922-2793>
В.В. Куликова / V.V. Kulikova: <https://orcid.org/0000-0003-0618-1407>
В.С. Покровский / V.S. Pokrovsky: <https://orcid.org/0000-0003-4006-9320>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор о субсидиях № 075-15-2021-1060 от 28 сентября 2021 г.). Синтез дайдзеина и конъюгатов C115H-Dz поддержан Российским научным фондом (проект № 20-14-00258).

Funding. *In vitro* and *in vivo* experiments were performed with the financial support by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement on subsidies No. 075-15-2021-1060 dated on September 28, 2021). The synthesis of daidzein and conjugate C115H MGL-Dz was supported by the Russian Science Foundation (project No. 20-14-00258).

Соблюдение правил биоэтики. Все эксперименты проводили в соответствии с этическими требованиями к исследованиям на биологических моделях и экспериментальных животных, утвержденными в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Compliance with principles of bioethics. The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia local ethics committee for animal trials.

Статья поступила: 08.10.2022. Принята к публикации: 07.11.2022.

Article received: 08.10.2022. Accepted for publication: 07.11.2022.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2022-21-4-71-75>

Серотипнезависимая протективная активность рекомбинантной формы пневмолизина в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипов 4 и 6В

Д.С. Воробьев^{1,2}, Е.С. Петухова¹, Ю.В. Волох¹, О.М. Афанасьева¹, М.М. Токарская¹, А.Ю. Леонова¹, О.В. Жигунова¹, И.Б. Семенова¹, Н.Ф. Гаврилова¹, И.В. Яковлева¹, Н.Е. Ястребова¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; Россия, 105064 Москва, Малый Казенный пер., 5А;

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

Контакты: Денис Сергеевич Воробьев vorobievdenis@yandex.ru

Введение. Разработка пневмококковой вакцины с серотипнезависимой активностью актуальна для всего мира, что обусловлено высокой распространенностью *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), постоянной сменой серотипов возбудителя и ростом антибиотикорезистентных штаммов. В предыдущих экспериментах нами выявлен протективный эффект иммунизации рекомбинантным пневмолизин (rPly) в модели системной инфекции, вызванной *S. pneumoniae* серотипа 3.

Цель исследования – изучение серотипнезависимой протективной активности rPly.

Материалы и методы. Для выполнения работы использовали штаммы *S. pneumoniae* серотипов 4 и 6В. Мышей иммунизировали внутрибрюшинно двукратно или трехкратно с интервалом 14 дней rPly. Для оценки протективной активности rPly животных после двукратной или трехкратной иммунизации заражали внутрибрюшинно *S. pneumoniae*.

Результаты. rPly при трехкратной иммунизации в дозе 25 мкг защищал мышей от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* серотипа 4, индекс эффективности по сравнению с контролем повышался в 2 раза. При двукратной иммунизации rPly защищал мышей от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* серотипа 6В, индекс эффективности по сравнению с контролем повышался в 6,61 раза.

Заключение. rPly защищает животных от заражения разными серотипами *S. pneumoniae*, что позволяет считать его перспективным препаратом для разработки пневмококковых вакцин с серотипнезависимой активностью.

Ключевые слова: *Streptococcus pneumoniae*, рекомбинантный пневмолизин, серотипнезависимая защита

Для цитирования: Воробьев Д.С., Петухова Е.С., Волох Ю.В. и др. Серотипнезависимая протективная активность рекомбинантной формы пневмолизина в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae* серотипов 4 и 6В. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):71–5. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-71-75

Serotype-independent protective activity of recombinant pneumolysin in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 4 and 6B

Denis S. Vorobyev^{1,2}, Ekaterina S. Petukhova¹, Yury V. Volokh¹, Olga M. Afanasyeva¹, Marina M. Tokarskaya¹, Anna Yu. Leonova¹, Olga V. Zhigunova¹, Irina B. Semenova¹, Natalya F. Gavrilova¹, Irina V. Yakovleva¹, Natalia E. Yastrebova¹

¹I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera; 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russia;

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

Contacts: Denis Sergeevich Vorobyev vorobievdenis@yandex.ru

Background. The development of a pneumococcal vaccine with serotype-independent activity is relevant for the whole world, as this is due to the high prevalence of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), the constant change

of pathogen serotypes and the growth of antibiotic-resistant strains. In previous experiments, we revealed a protective effect of immunization with recombinant pneumolysin (rPly) in a model of systemic infection caused by *S. pneumoniae* serotype 3.

Aim. Study of serotype-independent protective activity of rPly.

Materials and methods. Strains of *S. pneumoniae* serotypes 4 and 6B were used. Mice were immunized intraperitoneally two or three times with an interval of 14 days with rPly. To assess the protective activity of rPly, animals after double or triple immunization were infected intraperitoneally with *S. pneumoniae*.

Results. rPly at a triple immunization in a dose of 25 µg protected mice from intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 4, the efficiency index increased by 2 times compared with the control. With a double immunization, rPly protected mice from intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 6B, efficiency index increased by 6.61 times compared with the control.

Conclusion. rPly protects animals from infection with different serotypes of *S. pneumoniae*, which allows us to consider it a promising drug for the development of pneumococcal vaccines with serotype-independent activity.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, recombinant pneumolysin, serotype independent protection

For citation: Vorobyev D.S., Petukhova E.S., Volokh Yu.V. et al. Serotype-independent protective activity of recombinant pneumolysin in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae* serotypes 4 and 6B. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):71–5. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-71-75

Введение

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) — условно патогенная бактерия, которая колонизирует слизистые оболочки верхних дыхательных путей человека и является причиной внебольничной пневмонии, отита, менингита и сепсиса [1, 2]. В настоящее время пневмококковую инфекцию успешно предотвращают с помощью вакцинации с применением зарубежных полисахаридных и конъюгированных вакцин [3]. Конъюгированные вакцины расширяют возможности специфической профилактики в таких возрастных категориях, как дети младше 5 лет и пожилые люди старше 65 лет [4]. Однако все разрешенные вакцины создают строгий серотипспецифический иммунитет, связанный, прежде всего, с иммунным ответом на капсульный полисахарид. Перспективной является разработка пневмококковой вакцины на основе только протективных белковых антигенов микроба или комбинации белковых антигенов и капсульного полисахарида. Как один из перспективных белков *S. pneumoniae* рассматривается пневмолизин, поскольку он является консервативным антигеном и обнаружен во всех штаммах пневмококка независимо от их серотипа [5]. Ранее нами была показана защита мышей при введении нативных белоксодержащих антигенов пневмококка, содержащих пневмолизин, от внутрибрюшинного заражения *S. pneumoniae* разных серотипов [6], а также защита мышей при иммунизации рекомбинантным пневмолизином (rPly) от заражения *S. pneumoniae* серотипа 3 [7].

Целью исследования явилось изучение серотип-независимой протективной активности rPly.

Материалы и методы

Мыши линии BALB/c, самцы массой 14–16 г, были получены из питомника ООО «СМК СТЕЗАР»

(г. Владимир). Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова). Все эксперименты на мышах проводили в соответствии с межгосударственным стандартом по содержанию и уходу за лабораторными животными (ГОСТ 33217–2014).

Штаммы, использованные в работе: штамм № 1/56 *S. pneumoniae* серотипа 4; штамм № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6B. Работа выполнена с использованием штаммов коллекции центра коллективного пользования ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова при финансовой поддержке проекта Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021).

Для выполнения работы rPly получен и предоставлен сотрудниками ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для иммунизации мышей использовали rPly в дозе 25 мкг/мышь, сорбированный на Al (OH)₃ в течение ночи при 4 °C из расчета 200 мкг Al (OH)₃ на мышь. Животных иммунизировали внутрибрюшинно двукратно или трехкратно с интервалом 14 дней. Разовую иммунизирующую дозу вводили в физиологическом растворе в объеме 0,5 мл. В качестве контрольной группы использовали интактных мышей, которым вводили физиологический раствор.

Для исследования протективной активности иммунизированных мышей заражали внутрибрюшинно: штаммом № 1/56 *S. pneumoniae* серотипа 4 четырьмя дозами в диапазоне от 10³ до 10⁶ микробных клеток (м. кл.)/мышь в 0,5 мл физиологического раствора через 14 дней после 2-й или 3-й иммунизации; штаммом № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6B тремя заражающими дозами в диапазоне от 10⁴ до 10⁶ м. кл. /мышь через 14 дней после 2-й иммунизации. Заражающая доза

10^6 м. кл./мышь была абсолютно летальной для серотипа 4, а заражающая доза 10^5 м. кл./мышь вызывала гибель 90 % животных; заражающая доза 10^5 м. кл./мышь была абсолютно летальной для серотипа 6В. Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней после заражения.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием показателя LD_{50} , определяемого по формуле Кербера в модификации И.П. Ашмарина [8]:

$$LD_{50} = \text{обратный логарифм } \lg D_N - \delta (\Sigma L_i - 0,5),$$

где D_N — наибольшая из заражающих доз, δ — логарифм кратности разведений доз, ΣL_i — сумма результатов (отношение числа павших животных к общему числу зараженных животных в группе). После определения LD_{50} вычисляли индекс эффективности (ИЭ) по формуле:

$$ИЭ = \frac{LD_{50 \text{ опыт}}}{LD_{50 \text{ контроль}}}.$$

Результаты

В контрольной серии экспериментов было установлено, что абсолютно летальные заражающие дозы для *S. pneumoniae* серотипов 4 и 6В находились в интервале между 10^5 и 10^6 м. кл./мышь. Мышей иммунизировали двукратно или трехкратно гРly в дозе 25 мкг, после чего животных заражали внутрибрюшинно вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 4. Результаты изучения протективной активности гРly при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 4 представлены в табл. 1.

Данные, приведенные в табл. 1, свидетельствуют, что гРly способен защищать мышей от пневмококковой инфекции при трехкратной иммунизации. ИЭ при сравнении опытной группы, получавшей гРly трехкратно, с контрольной группой составил 2, в то время как в группе мышей с двукратной иммунизацией ИЭ составил всего 1,26. В частности, при заражении мышей *S. pneumoniae* серотипа 4 в дозе 10^5 м. кл./мышь в контрольной группе наблюдали гибель 90 % особей, тогда как трехкратная иммунизация гРly увеличивала выживаемость до 40 % животных. Хотя эти различия между контрольной и опытными группами не были

Таблица 1. Протективная активность рекомбинантного пневмолизина при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 4
Table 1. Protective activity of recombinant pneumolysin in case of intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 4

Доза и кратность иммунизации Dose and frequency of immunization	Доза заражения, м. кл./0,5 мл ф. р. The dose of infection, m. c./0.5 ml s. s.	Количество мышей павших/выживших Number of mice thar have dead/survived	LD ₅₀ , м. кл. LD ₅₀ , m. c.	ИЭ EI
25 мкг/мышь, двукратно 25 µg/mouse, twice	1 000 000	10/0	39 800 (126 000:12 600)*	1,26
	100 000	8/2		
	10 000	1/9		
	1 000	0/10		
25 мкг/мышь, трехкратно 25 µg/mouse, thrice	1 000 000	10/0	63 100 (200 000:20 000)*	2,0
	100 000	6/4		
	10 000	1/9		
	1 000	0/9		
Контроль (неиммунизированные мыши) Control (non-immunized mice)	1 000 000	10/0	31 600 (100 000:10 000)*	—
	100 000	9/1		
	10 000	1/9		
	1 000	0/9		
<i>p</i>	—			0,348

*95 % доверительный интервал LD_{50} .

*The 95 % confidence interval of LD_{50} .

Примечание. Здесь и в табл. 2: м. кл. — микробные клетки; ф. р. — физиологический раствор; ИЭ — индекс эффективности.
Note. Here and in table 2: m. c. — microbial cells; s. s. — saline solution; EI — efficiency index.

Таблица 2. Протективная активность рекомбинантного пневмолизина при внутрибрюшинном заражении *S. pneumoniae* серотипа 6ВTable 2. Protective activity of recombinant pneumolysin in case of intraperitoneal infection with *S. pneumoniae* serotype 6В

Доза и кратность иммунизации Dose and frequency of immunization	Доза заражения, м. кл./0,5 мл ф. р. The dose of infection, m. c./0.5 ml s. s.	Количество мышей павших/ выживших Number of mice that have dead/survived	LD ₅₀ , м. кл. LD ₅₀ , m. c.	ИЭ EI
25 мкг/мышь, двукратно 25 µg/mouse, twice	1 000 000	6/3	33 900 (339 000:3 390)*	6,61
	100 000	7/3		
	10 000	6/4		
Контроль (неиммунизи- рованные мыши) Control (non-immunized mice)	1 000 000	8/1	5 130 (12 900:1 020)*	—
	100 000	10/0		
	10 000	9/1		
<i>p</i>	—			<0,01**

*95 % доверительный интервал LD₅₀; **при сравнении опытной группы с контролем различия статистически значимы.

*The 95 % confidence interval of LD₅₀; **the differences are statistically significant when comparing the experimental group with the control.

статистически достоверными ($p = 0,348$), отмечалась очевидная тенденция к улучшению выживаемости мышей, инфицированных *S. pneumoniae* серотипа 4.

В специальной серии опытов животных иммунизировали гРly двукратно и через 14 дней заражали внутрибрюшинно вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 6В (результаты представлены в табл. 2). Как видно из табл. 2, рекомбинантный белок защищает мышей от развития пневмококковой летальной инфекции, о чем свидетельствует ИЭ, который составил 6,61 ($p < 0,01$).

Обсуждение

Анализ протективной активности рекомбинантного белка показал, что при заражении *S. pneumoniae* серотипа 4 эффективна трехкратная иммунизация гРly, в то время как при заражении *S. pneumoniae* серотипа 6В достаточно было двукратной иммунизации гРly. Более того, при двукратной иммунизации рекомбинантным белком формировалась более выраженная защита от заражения пневмококком серотипа 6В (ИЭ составил 6,61) по сравнению с трехкратной иммунизацией от заражения пневмококком серотипа 4 (ИЭ составил 2). Вероятно, протективная активность гРly обусловлена не только кратностью введе-

ния препарата, но и биологическими свойствами штаммов патогена, которыми заражают животных. Ранее нами было показано, что трехкратная иммунизация мышей гРly защищает 67 % животных от внутрибрюшинного заражения вирулентным штаммом *S. pneumoniae* серотипа 3 в дозе 10^6 м. кл./мышь по сравнению с контролем [7]. Таким образом, полученные в данной работе, а также ранее опубликованные данные свидетельствуют о том, что гРly может формировать серотипнезависимую защиту от *S. pneumoniae* при внутрибрюшинном заражении мышей.

Заключение

Полученные результаты позволяют предположить, что для разных серотипов пневмококка следует использовать различные варианты иммунизации животных. Поэтому в перспективе представляется целесообразным оценить взаимосвязь между кратностью иммунизации гРly, титром антител к рекомбинантному белку и протективной активностью в модели активной защиты мышей. Однако примечательным остается результат, что гРly защищает животных от заражения разными серотипами *S. pneumoniae*, что, соответственно, делает его перспективным для разработки пневмококковых вакцин с серотипнезависимой активностью.

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

- Brooks L.R.K., Mias G.I. *Streptococcus pneumoniae's* virulence and host immunity: aging, diagnostics, and prevention. *Front Immunol* 2018;9:1366. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01366
- Weiser J.N., Ferreira D.M., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat Rev Microbiol* 2018;16(6):355–67. DOI: 10.1038/s41579-018-0001-8
- Masomian M., Ahmad Z., Gew L.T., Poh C.L. Development of next generation *Streptococcus pneumoniae* vaccines conferring broad protection. *Vaccines (Basel)* 2020;8(1):132. DOI: 10.3390/vaccines8010132
- Briles D.E., Paton J.C., Mukerji R. et al. Pneumococcal vaccines. *Microbiol Spectr* 2019;7(6). DOI: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0028-2018
- Nishimoto A.T., Rosch J.W., Tuomanen E.I. Pneumolysin: pathogenesis and therapeutic target. *Front Microbiol* 2020;11:1543. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01543
- Воробьев Д.С., Семенова И.Б., Волох Ю.В. и др. Свойства нативных белоксодержащих антигенов *Streptococcus pneumoniae*. *Микробиология* 2019;1:22–8. DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-22-28
- Vorobyev D.S., Semenova I.B., Volokh Yu.V. et al. Properties of native protein-containing antigens of *Streptococcus pneumoniae*. *Mikrobiologiya = Microbiology* 2019;1:22–8. (In Russ.). DOI: 10.36233/0372-9311-2019-1-22-28
- Петухова Е.С., Воробьев Д.С., Сидоров А.В. и др. Иммунизация рекомбинантным пневмолизином вызывает выработку антител и защищает мышей в модели системной инфекции, вызванной *Streptococcus pneumoniae*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2019;168(10):471–3. Petukhova E.S., Vorobyev D.S., Sidorov A.V. et al. Immunization with recombinant pneumolysin induces the production of antibodies and protects mice in a model of systemic infection caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Bulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2019;168(10):471–3. (In Russ.).
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 183 с. Ashmarin I.P., Vorobyev A.A. Statistical methods in microbiological research. Leningrad: Medgiz, 1962. 183 p. (In Russ.)

Вклад авторов

Д.С. Воробьев: иммунизация и заражение животных, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Е.С. Петухова, Ю.В. Волох, О.М. Афанасьева, О.В. Жигунова: иммунизация и заражение животных;
 М.М. Токарская: приготовление штамма № 296 *S. pneumoniae* серотипа 6В;
 А.Ю. Леонова: приготовление штамма 1/56 *S. pneumoniae* серотипа 4;
 И.Б. Семенова: обзор публикаций по теме статьи, редактирование статьи;
 Н.Ф. Гаврилова, И.В. Яковлева: получение данных для анализа, статистический анализ данных;
 Н.Е. Ястребова: анализ полученных данных, редактирование статьи.

Authors' contributions

D.S. Vorobyev: immunization and infection of animals, analysis of the data obtained, writing the text of manuscript;
 E.S. Petukhova, Yu.V. Volokh, O.M. Afanasyeva, O.V. Zhigunova: immunization and infection of animals;
 M.M. Tokarskaya: preparation of strain No. 296 *S. pneumoniae* serotype 6B;
 A.Yu. Leonova: preparation of strain No. 1/56 *S. pneumoniae* serotype 4;
 I.B. Semenova: review of publications on the topic of the article, editing of the article;
 N.F. Gavrilova, I.V. Yakovleva: obtaining data for analysis, statistical analysis;
 N.E. Yastrebova: analysis of the data obtained, editing of the article.

ORCID авторов/ ORCID of authors

Д.С. Воробьев / D.S. Vorobyev: <https://orcid.org/0000-0002-1926-8803>
 Е.С. Петухова / E.S. Petukhova: <https://orcid.org/0000-0003-0796-5764>
 Ю.В. Волох / Yu.V. Volokh: <https://orcid.org/0000-0002-5161-4964>
 О.М. Афанасьева / O.M. Afanasyeva: <https://orcid.org/0000-0003-0875-4141>
 М.М. Токарская / M.M. Tokarskaya: <https://orcid.org/0000-0002-5175-5433>
 А.Ю. Леонова / A.Yu. Leonova: <https://orcid.org/0000-0002-2889-2405>
 О.В. Жигунова / O.V. Zhigunova: <https://orcid.org/0000-0002-3958-6219>
 И.Б. Семенова / I.B. Semenova: <https://orcid.org/0000-0002-6630-4838>
 Н.Ф. Гаврилова / N.F. Gavrilova: <https://orcid.org/0000-0001-6704-0339>
 И.В. Яковлева / I.V. Yakovleva: <https://orcid.org/0000-0001-5123-2651>
 Н.Е. Ястребова / N.E. Yastrebova: <https://orcid.org/0000-0002-6911-1345>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-20221.

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-25-20221.

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

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 14.10.2022. **Принята к публикации:** 11.11.2022.

Article submitted: 14.10.2022. **Accepted for publication:** 11.11.2022.

Влияние ЛХС-1269 на морфологию и ангиогенез карциномы легкого Льюис

И.Б. Меркулова, И.С. Голубева, Д.А. Хоченков, Т.В. Абрамова, Н.П. Ермакова, Л.В. Эктова

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115552 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Введение. Новое противоопухолевое соединение ЛХС-1269 из класса индолокарбазолов проходит доклинические исследования в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ЛХС-1269 обладает высокой противоопухолевой активностью на перевиваемых опухолях мышей, проявляет значимую цитотоксическую активность на многих клеточных линиях *in vitro*, ингибирует васкулогенную мимикрию в опухолях *in vitro*. ЛХС-1269 не влияет на каталитическую активность топоизомераз I и IIα человека. Возможен антиангиогенный механизм противоопухолевого действия ЛХС-1269.

Цель исследования – оценка влияния ЛХС-1269 на морфологические особенности и ангиогенез перевиваемой эпидермоидной карциномы легкого Льюис (LLC) мышей.

Материалы и методы. Группа мышей ($n = 20$) линии BDF₁ с перевитой опухолью LLC на 1-е и 3-и сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения ЛХС-1269 в разовой дозе 60 мг (суммарная доза – 300 мг/кг); группа мышей ($n = 20$) на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения препарата в дозе 100 мг/кг и группа мышей ($n = 20$) с перевитыми опухолями, которым препарат не вводили (контроль). Оценивали противоопухолевый эффект по критерию торможения роста опухоли (%) и исследовали морфологические особенности опухолей. Для оценки влияния ЛХС-1269 на опухолевый ангиогенез в срезах опухоли LLC проводили визуальный подсчет среднего числа (плотности) кровеносных сосудов и иммуногистохимическое выявление экспрессии маркера эндотелия CD31⁺.

Результаты. Соединение ЛХС-1269 в группах животных при 5-кратном и однократном применении вызывало торможение роста опухоли (59–70 и 67–79 %) с выраженными морфологическими изменениями и гибелью опухолевых клеток. В опухолях и окружающих тканях во всех группах обнаружено неравномерное распределение кровеносных сосудов. ЛХС-1269 вызывало статистически значимое уменьшение среднего числа кровеносных сосудов в опухоли как после 5-кратного, так и после однократного введения. Статистически значимое уменьшение среднего числа кровеносных сосудов в окружающей опухоль соединительной ткани наблюдали лишь после 5-кратного введения препарата. Снижение среднего числа CD31⁺-эндотелиальных клеток после 5-кратного внутрибрюшинного введения было статистически незначимым по сравнению с контролем ($83,1 \pm 8,7$ и $59,6 \pm 18,9$ соответственно). Увеличение этого показателя после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 по сравнению с контролем было статистически значимым.

Заключение. ЛХС-1269 при 5-кратном и однократном введении мышам вызывал выраженные морфологические изменения в виде повреждений и гибели клеток опухоли LLC. Результаты исследования ангиогенеза в опухоли не позволяют сделать однозначный вывод об угнетающем действии ЛХС-1269 на сосудистую сеть опухоли LLC у мышей.

Ключевые слова: противоопухолевое соединение ЛХС-1269, эпидермоидная карцинома легкого Льюис, ангиогенез, морфологические изменения, мембранный белок CD31, эндотелиальные клетки

Для цитирования: Меркулова И.Б., Голубева И.С., Хоченков Д.А. и др. Влияние ЛХС-1269 на морфологию и ангиогенез карциномы легкого Льюис. Российский биотерапевтический журнал 2022;21(4):76–88. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-76-88

Effect of LHS-1269 on morphology and angiogenesis of Lewis lung carcinoma

Irina B. Merkulova, Irina S. Golubeva, Dmitriy A. Khochenkov, Tatiana V. Abramova, Nadezhda P. Ermakova, Lidia V. Ektova

N. N. Blokhin National Medical Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24, Kashirskoe Shosse, Moscow 115552, Russia

Contacts: Irina Sergeevna Golubeva irinagolubewa52@mail.ru

Background. The new anticancer chemical compound LHS-1269 from the class of indolocarbazoles is undergoing preclinical studies at the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia. LHS-1269 has a high antitumor activity on transplanted tumors of mice, showed high cytotoxic activity on many tumor cells lines *in vitro*, and has shown an inhibitory effect on vasculogenic mimicry in tumors *in vitro*. LHS-1269 does not affect the catalytic activity of human topoisomerases I and II α . An antiangiogenic mechanism of the drug's antitumor action is suggested.

Aim. To evaluate the effect of LHS-1269 on the morphological features and angiogenesis of transplanted Lewis lung carcinoma (LLC) in BDF₁ mice.

Materials and methods. In BDF₁ mice ($n = 20$) with transplanted LLC tumor on days 1 and 3 after 5-fold intraperitoneal administration of LHS-1269 in a single dose of 60 mg (total dose – 300 mg/kg), mice ($n = 20$) on days 5 and 8 after a single intravenous injection of LHS-1269 at a dose of 100 mg/kg, mice ($n = 20$) with transplanted LLC tumor without administration of LHS-1269 (control). The assessment of the antitumor effect was carried out according to the criterion of inhibition of tumor growth (%) and the study of the morphological features of the tumors. To assess the effect of LHS-1269 on tumor angiogenesis in LLC tumor sections, a visual calculation of the average number (density) of blood vessels and immunohistochemical detection of expression of the CD31⁺ endothelial marker were performed.

Results. The LHS-1269 compound in animal groups with 5-fold and 1-fold use caused tumor growth inhibition – 59–70 and 67–79 %, with pronounced morphological changes and tumor cell death. There is an uneven distribution of blood vessels in tumors and surrounding tissues in all groups. LHS-1269 caused a statistically significant decrease in the average number of blood vessels in the tumor both after 5-fold and after 1-fold administration. The statistically significant decrease in the average number of blood vessels in the surrounding connective tissue tumor was observed only after 5-fold administration of the drug. The decrease in the average number of CD31⁺ endothelial cells after five times intraperitoneal administration was statistically insignificant compared to control (83.1 ± 8.7 and 59.6 ± 18.9 , respectively). The increase in this indicator after a single intravenous injection of LHS-1269 was statistically significant.

Conclusion. LHS-1269, when administered five times and once in mice, caused pronounced morphological changes in the form of damage and death of LLC tumor cells. The results of a study of angiogenesis in a tumor do not allow an unambiguous conclusion about the inhibitory effect of LHS-1269 on angiogenesis in LLC tumors in mice.

Keywords: antitumor compound LHS-1269, Lewis lung carcinoma, angiogenesis, morphological changes, membrane protein CD31, endothelial cells

For citation: Merkulova I.B., Golubeva I.S., Khochenkov D.A. et al. Effect of LHS-1269 on morphology and angiogenesis of Lewis lung carcinoma. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2022;21(4):76–88. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-4-76-88

Введение

Новое соединение с противоопухолевой активностью ЛХС-1269 из класса индолокарбазолов отобрано из большого числа гликозидов индолокарбазолов и проходит доклиническое исследование с изучением механизмов противоопухолевого действия в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [1]. Установлено, что ЛХС-1269 обладает высокой противоопухолевой активностью на перевиваемых солидных и асцитных опухолях мышей [1–3]. Препарат проявил цитотоксическую активность на опухолевых клеточных линиях *in vitro* при исследовании с помощью МТТ-теста [4, 5], однако не влиял на каталитическую активность топоизомераз I и II α человека [5]. Показан ингибирующий эффект ЛХС-1269 на васкулогенную мимикрию в опухолях *in vitro* [4]. Имеются данные об антиангиогенном и антипролиферативном действии некоторых производных индолокарбазола. Так, аналоги алкалоида стауроспорина, производного индолокарбазола, являющегося неизбирательным ингибитором проте-

инкиназы C, подавляли формирование капиллярной трубки из эндотелиоцитов линии HUVEC в матрицельной матрице *in vitro* и вызывали некоторое уменьшение числа метастазов карциномы легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC) мышей *in vivo* [6]. В связи с вышеизложенным для соединения ЛХС-1269 мы предполагаем возможность антиангиогенного механизма противоопухолевого действия. Как известно, сосудистая сеть опухолей, обеспечивая опухолевые клетки питательными веществами и кислородом, способствует выведению продуктов обмена веществ. Регуляция ангиогенеза осуществляется с помощью ростовых факторов, специфичных для эндотелия кровеносных сосудов и продуцируемых опухолевыми и некоторыми стромальными клетками [7–9]. Некоторые злокачественные опухоли способны формировать сосудистоподобные каналы без эндотелиальных клеток (васкулогенная мимикрия) и экспрессировать маркеры, характерные для эндотелиальных клеток [4, 10]. Известно, что ингибирующий эффект антиангиогенных таргетных противоопухолевых препаратов связан с блокированием активации

рецепторов ростовых факторов на клетках эндотелия кровеносных сосудов опухоли, что приводит к снижению неоангиогенеза, развитию гипоксии, последующему повреждению и гибели опухолевых клеток и, как следствие, торможению роста опухоли (ТРО) [11, 12].

Среди существующих методов оценки ангиогенеза в злокачественных опухолях иммуногистохимическая оценка плотности микрососудов является основным способом анализа [13]. При этом используют маркеры клеток эндотелия кровеносных сосудов при иммуногистохимическом анализе ткани, такие как гликопротеин, мембранный белок CD31, антиген фактора VIII, CD34 и др. [14–16]. Химиопрепараты разных классов могут оказывать антиангиогенное действие на опухоли. Так, препарат араноза наряду с высоким противоопухолевым эффектом на перевиваемой опухоли LLC дозозависимо снижал неоангиогенез в участках максимальной плотности микрососудов [17]. Показано также, что применение наноразмерной формы доксорубина у крыс Wistar с перевиваемой глиобластомой 101.8 вызывало снижение объемной доли и количества сосудов в опухоли (антиангиогенное действие), выявляемых с помощью маркера эндотелия изолектина B4, что наблюдалось параллельно с гибелью опухолевых клеток и снижением их пролиферативной активности [18]. Однако неясно, на какие молекулярные мишени ангиогенеза эти препараты влияют.

Как отмечено выше, соединение ЛХС-1269 обладает цитотоксическим действием на опухолевые клетки *in vitro* [4, 5], но морфологические исследования изменений в опухолях под влиянием этого препарата *in vivo* не проводились. Учитывая, что повреждение и гибель опухолевых клеток могут в какой-то степени снижать продукцию ангиогенных факторов, мы в настоящем исследовании попытались оценить взаимосвязь между морфологическими изменениями опухоли LLC и ее васкуляризацией под воздействием ЛХС-1269, примененного в дозах и режимах, оказывающих высокий противоопухолевый эффект у мышей [3]. Результаты многочисленных морфологических исследований перевиваемых опухолей мышей и крыс, полученные при углубленном доклиническом изучении противоопухолевых соединений разных классов, обладающих цитостатической и цитотоксической активностью, опубликованные в 60–80-е годы прошлого века, и в настоящее время остаются актуальными при изучении действия новых противоопухолевых препаратов, их комбинаций между собой и с модифицирующими факторами [19, 20], а также в клинической практике при оценке лекарственного патоморфоза злокачественных опухолей с целью прогноза онкологического заболевания [21, 22]. В этих работах при использовании рутинных ги-

стологических методик (окраска гематоксилином и эозином) на перевиваемых опухолях или клиническом опухолевом материале изучаются динамика патоморфологических изменений в опухоли, особенности изменений и гибели опухолевых клеток, изменения стромы и ее клеток, особенности клеточной инфильтрации; оценивается количество пролиферирующих клеток (фигуры митозов), очагов некроза, наличие и состояние кровеносных сосудов. Исследование морфологических особенностей перевиваемой опухоли LLC мышей, визуальный подсчет кровеносных сосудов, а также иммуногистохимическое выявление и подсчет кровеносных микрососудов с использованием маркера эндотелия CD31 при воздействии ЛХС-1269 могут внести определенный вклад в понимание механизма действия этого соединения.

Цель исследования — оценка влияния ЛХС-1269 на морфологические особенности и ангиогенез перевиваемой LLC у мышей BDF₁.

Материалы и методы

Исследование выполнено на иммунокомпетентных мышах, которых содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и со свободным доступом к воде. Использовано 60 мышей-самок линии BDF₁ (C57Bl/6 × DBA/2) массой 18–22 г, полученных из отдела разведения лабораторных животных ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Соединение с противоопухолевой активностью ЛХС-1269 использовали в экспериментальной лекарственной форме ЛФ 1 (состав: субстанция ЛХС-1269, коллидон 17PF, этанол, диметилсульфоксид, вода).

Для исследования использовали эпидермоидную LLC. Эта модель опухолевого роста мышей широко применяется в экспериментальной онкологии [23].

Для трансплантации опухолевую ткань рака легкого мыши LLC измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл (50 мг опухолевой массы) полученной суспензии вводили подкожно в область правой подмышечной впадины мышам.

Через 48 ч после перевивки мыши с опухолями были разделены на 3 группы по 20 мышей в каждой: 1-я группа (контроль) — мыши с перевитыми опухолями, которым препарат не вводили; 2-я группа — мыши, которым через 48 ч после перевивки опухоли вводили 5-кратно внутрибрюшинно с интервалом 24 ч ЛХС-1269 в разовой дозе 60 мг/кг (суммарная доза — 300 мг/кг); 3-я группа — мыши, которым через 48 ч после перевивки опухоли вводили ЛХС-1269 внутривенно однократно в дозе 100 мг/кг.

Для гистологического и иммуногистохимического исследования опухолей по 10 мышей из каждой

группы выводили из опыта на 7-е и 10-е сутки после перевивки опухоли соответственно, на 1-е и 3-и сутки после окончания 5-кратного внутрибрюшинного и на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения соединения ЛХС-1269. Мышей усыпляли диэтиловым эфиром. Затем по общепринятой методике, используя измерение 3 диаметров каждой опухоли, определяли средний объем опухоли и ТРО (%) в каждой группе [23]. На вскрытии опухоли удаляли и помещали в 10 % нейтральный формалин для фиксации. По окончании фиксации опухоли подвергали общепринятой гистологической обработке, включавшей заливку в парафин; половину срезов толщиной 5 мкм от каждой опухоли окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световым микроскопом фирмы Leica при увеличении: $\times 100$, $\times 400$ и $\times 1000$. Другую половину срезов опухолей использовали для иммуногистохимического исследования.

Гистологическое исследование включало изучение общей морфологии опухолей, опухолевых клеток, особенностей расположения кровеносных сосудов в опухоли и в окружающих тканях (рыхлой соединительной и жировой ткани), подсчет визуализируемых кровеносных сосудов на 1 поле зрения при увеличении $\times 1000$ в 10–20 участках жизнеспособной ткани каждой опухоли (в зависимости от площади среза) и в прилежащей к ней соединительной или жировой ткани. При этом учитывали все видимые кровеносные сосуды (поперечные или продольные срезы) диаметром от 3–10 до 70–100 мкм, преимущественно содержащие эритроциты. Результаты подсчета средних величин числа сосудов на 1 поле зрения микроскопа в каждой опухоли усредняли и получали среднее арифметическое число кровеносных сосудов на 1 поле зрения опухоли в каждой группе.

Иммуногистохимическое определение количества микрососудов в опухоли проводили стандартным методом с использованием антител к CD31 (Abcam) — маркеру клеточной адгезии клеток эндотелия в участках высокой плотности микрососудов. Инкубация с антителами проходила в течение 18 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Проявку результатов (экспрессию CD31) проводили при помощи EnVision +kit (Dako). Гистологические срезы докрашивали гематоксилином и заключали под покровное стекло. Подсчет окрашенных CD31⁺-микрососудов выполняли в 20 полях зрения микроскопа при увеличении $\times 200$.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Office и BioStat Professional. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

У мышей контрольной группы на 7-е сутки после перевивки опухоль состояла преимущественно из

2–3 узелков, окруженных рыхлой соединительной или жировой тканью (рис. 1). По морфологическому строению опухоль соответствовала штамму LLC [24]. Опухоль состояла в основном из плотно расположенных полиморфных округлых клеток, большая часть которых имела круглые светлые ядра с глыбками хроматина и крупными 1–2 ядрышками. На периферии опухолевые клетки располагались более рыхло, разрозненно, границы цитоплазмы четкие; в некоторых участках опухолевые клетки образовывали синцитий. Среди жизнеспособных опухолевых клеток обнаруживали единичные клетки с признаками апоптоза или некроза. В некоторых участках опухолей находили митотические фигуры (по 2–3 в поле зрения при увеличении $\times 1000$). В большинстве опухолей этой группы обнаруживали очаги некроза, что характерно для LLC [24]. Вокруг опухоли, в рыхлой соединительной и жировой тканях, наблюдали неравномерную лимфомакрофагальную инфильтрацию, более сильную вблизи очагов некроза. Кроме того, в соединительной и жировой тканях с одной стороны и в мышечной ткани с другой стороны опухоли обнаруживали инвазию тканей опухолевыми клетками, что также характерно для LLC [24].

Кровеносные сосуды внутри опухоли обнаруживали в небольшом количестве, в основном в виде тонкостенных капилляров и венул, преимущественно содержащих эритроциты. На периферии опухоли кровеносные сосуды находили в большем количестве. Следует заметить, что кровеносные сосуды располагались неравномерно как в опухоли, так и в прилежащих к ней тканях. Участки без кровеносных сосудов чередовались с участками, содержащими единичные сосуды (в опухоли по 1–2 сосуда в поле зрения) или группы кровеносных сосудов (в тканях, окружающих опухоль, по 5–7 сосудов) (см. рис. 1). В тканях вокруг опухоли местами наблюдалось много предшествовавших кровеносных сосудов крупного диаметра.

На 10-е сутки после перевивки рост опухолей продолжается, увеличивается их средний объем (табл. 1).

Морфологическая картина опухолей существенно не отличается от картины в предыдущий срок. Опухолевые клетки инфильтрируют окружающие ткани; в некоторых участках опухоли обнаруживаются фигуры митоза, вокруг некоторых опухолей несколько сильнее, чем в предыдущий срок, выражена лимфомакрофагальная реакция; среди участков жизнеспособной ткани сохраняются участки некрозов разной величины, кровеносные сосуды в опухоли и в окружающих тканях обнаруживаются с той же частотой (рис. 2).

Торможение роста опухоли во 2-й группе на 1-е сутки после окончания 5-кратного введения препарата составило 59 % (7-е сутки после перевивки опухоли)

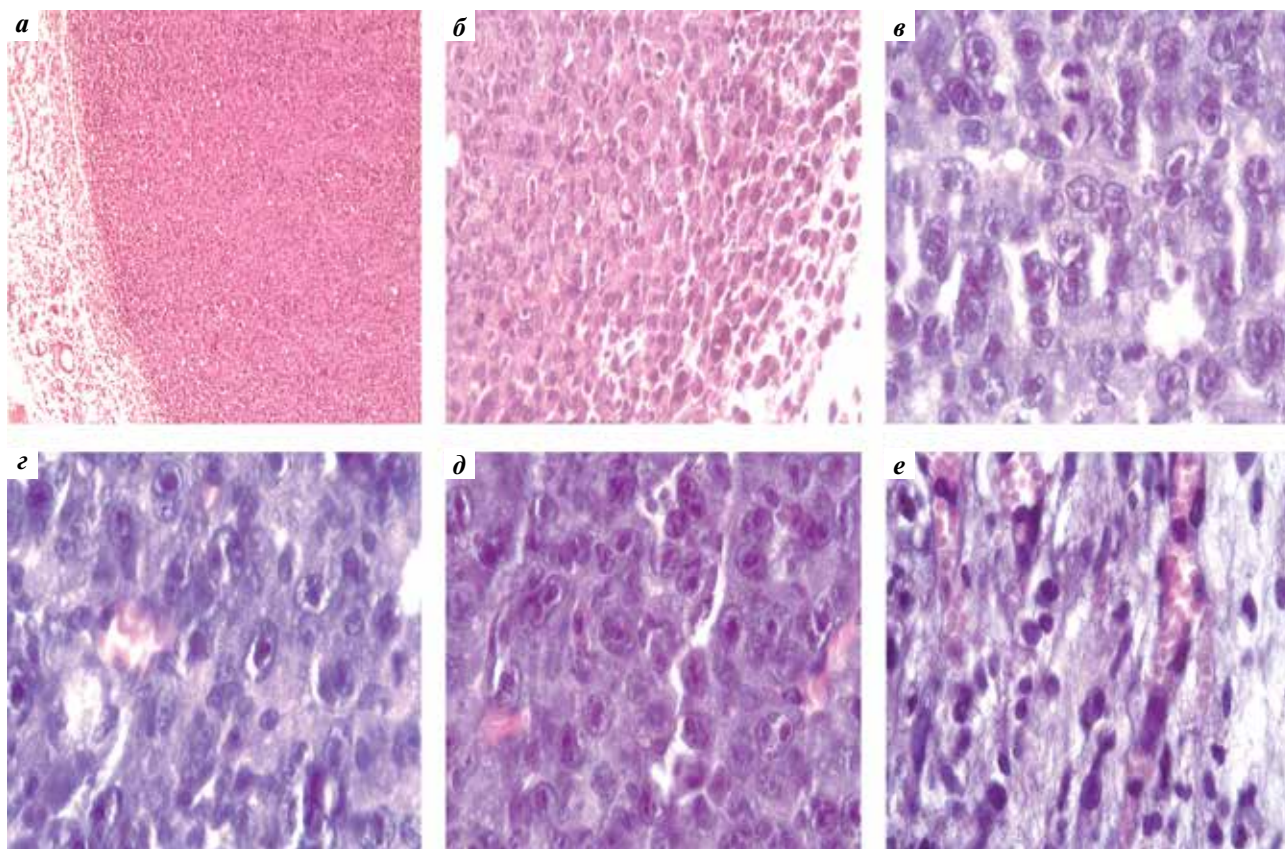


Рис. 1. Контроль. Опухоль LLC на 7-е сутки после перевивки (окраска гематоксилином и эозином): а — общий вид опухоли LLC с окружающей рыхлой соединительной тканью ($\times 100$); б — инвазия опухолевых клеток в окружающую ткань, 3 кровеносных сосуда среди полиморфных опухолевых клеток ($\times 400$); в — полиморфные опухолевые клетки с крупным светлым ядром и крупным ядрышком, 2 митоза ($\times 1000$); г — 3 кровеносных сосуда разного диаметра среди опухолевых клеток ($\times 1000$); д — 2 кровеносных сосуда среди полиморфных опухолевых клеток ($\times 1000$); е — кровеносные сосуда в рыхлой соединительной ткани, граничащей с опухолью ($\times 400$). Здесь и на рис. 2–6: LLC — карцинома легкого Льюис

Fig. 1. Control. Tumor LLC on the 7th day after inoculation (staining with hematoxylin and eosin): а — general view of the LLC tumor with surrounding loose connective tissue ($\times 100$); б — invasion of tumor cells into the surrounding tissue; three blood vessels among polymorphic tumor cells ($\times 400$); в — polymorphic tumor cells with a large light nucleus and a large nucleolus, two mitoses ($\times 1000$); г — three blood vessels of different diameters among tumor cells ($\times 1000$); д — two blood vessels among polymorphic tumor cells ($\times 1000$); е — blood vessels in the loose connective tissue bordering the tumor ($\times 400$). Here and on fig. 2–6: LLC—Lewis lung carcinoma

и увеличилось к последующим 3-м суткам до 70 % (10-е сутки после перевивки) (см. табл. 1).

При гистологическом исследовании образцов опухоли 2-й группы на 1-е сутки после окончания введения ЛХС-1269 в опухолевых узелках, окруженных рыхлой соединительной или жировой тканью, среди участков жизнеспособных опухолевых клеток обнаруживали участки опухолевых клеток с признаками дистрофии и дегенерации (крупные клетки с крупными светлыми или пикноморфными ядрами, клетки с вакуолизацией ядер, цитоплазмы и в состоянии лизиса). Митозы обнаруживали крайне редко. Кровеносные сосуды внутри опухолей визуализировались редко, а на периферии опухоли и в окружающих тканях обнаруживались чаще, но неравномерно (рис. 3). Следует заметить, что, в отличие от контроля, в большинстве опухолей отсутствовали характер-

ные массивные очаги некроза. Это отмечено и другими авторами для других препаратов [19, 20].

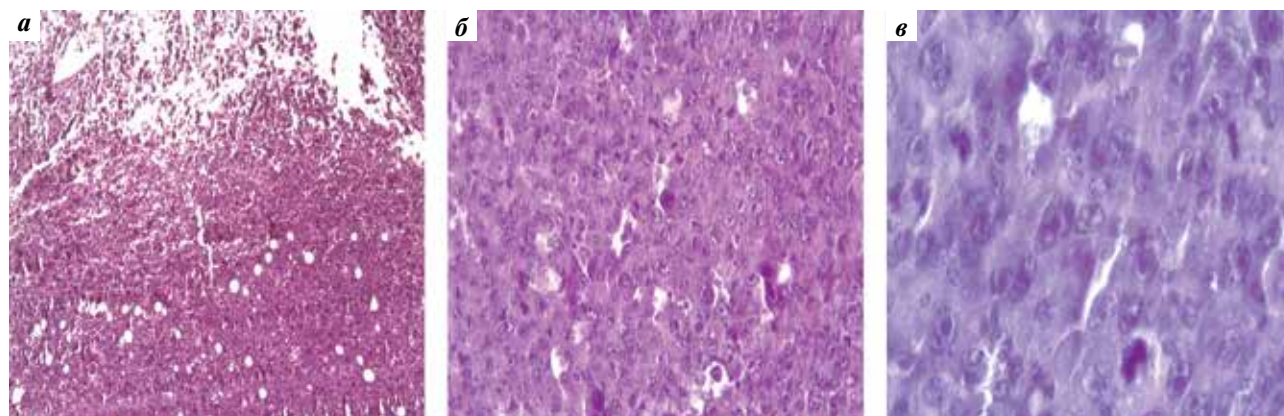
На 3-и сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения препарата процесс повреждения опухоли продолжается: выявляется большое число поврежденных и погибших опухолевых клеток (рис. 4), во многих опухолях обнаруживаются очажки микронекроза и участки разрежения клеток опухоли, а на периферии части опухолей выражена соединительнотканная реакция в виде многих рядов коллагеновых волокон, фибробластов и макрофагов между ними. В отличие от предыдущего срока опыта, в этот срок митотические фигуры обнаруживаются чаще, но реже, чем в контроле. Отмечается набухание стенок кровеносных сосудов опухоли, а также запустевание части сосудов.

Торможение роста опухоли в 3-й группе на 5-е сутки после окончания введения ЛХС-1269 (7-е сутки

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность ЛХС-1269 на модели карциномы легких Льюис

Table 1. LHS-1269 antitumor effect against Lewis lung carcinoma

Группа опыта Experience group	Сроки оценки эффекта Effect evaluation time		Средний объем опухоли, $M \pm m$, mm^3 Mean tumor volume, $M \pm m$, mm^3	Торможение роста опухоли, %, Tumor growth inhibition, %
	После перевивки опухоли After tumor transplantation	После окончания введения препарата After the end of the drug administration		
Контроль Control	7-е сутки 7 th day	—	163,5 $\pm$ 22,0	—
	10-е сутки 10 th day	—	1837,0 $\pm$ 332,9	—
ЛХС-1269 60 мг/кг $\times$ 5 (в/б) LHS-1269 60 mg/kg $\times$ 5 (i/p)	7-е сутки 7 th day	1-е сутки 1 st day	68,3 $\pm$ 14,6*	59
	10-е сутки 10 th day	3-и сутки 3 rd day	558,0 $\pm$ 106,6*	70
ЛХС-1269 100 мг/кг $\times$ 1 (в/в) LHS-1269 100 mg/kg $\times$ 1 (i/v)	7-е сутки 7 th day	5-е сутки 5 th day	54,6 $\pm$ 12,5*	67
	10-е сутки 10 th day	8-е сутки 8 th day	383,5 $\pm$ 92,7*	79

*Статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.*Statistically significant differences compared to control, $p \leq 0.05$.**Примечание.** Здесь и в табл. 2, 3: в/б – внутрибрюшинно; в/в – внутривенно; $M \pm m$ – среднее значение $\pm$ стандартное отклонениеNote. Here and in tables 2, 3: i/p – intraperitoneal; i/v – intravenously; $M \pm m$ – arithmetic mean $\pm$ standard deviation**Рис. 2.** Контроль. Опухоль LLC на 10-е сутки после перевивки (окраска гематоксилином и эозином): а – общий вид опухоли LLC с окружающей тканью, инфильтрированной лимфомакрофагальными элементами и опухолевыми клетками ($\times 400$); б – погибшие опухолевые клетки и кровеносные сосуды в опухоли ($\times 400$); в – 3 фигуры митоза в ткани опухоли ($\times 1000$)**Fig. 2.** Control. Tumor LLC on the 10th day after inoculation (staining with hematoxylin and eosin): а – general view of the LLC tumor with surrounding tissue infiltrated with lymphomacrophage elements and tumor cells ($\times 400$); б – dead tumor cells and blood vessels in the tumor ($\times 400$); в – three mitotic figures in the tumor tissue ($\times 1000$)

после перевивки) составило 67 % и увеличилось к 8-м суткам после окончания введения препарата (10-е сутки после перевивки) до 79 % (см. табл. 1).

Хотя гистологическое исследование проведено на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения, изменения в опухолях достаточно четкие. В отличие от контроля, наблюдали выраженное уменьшение площади среза опухолей, разрастание

рыхлой соединительной ткани вокруг опухоли и между опухолевыми узелками, отсутствие или слабую инвазию опухолевых клеток в окружающие ткани, отсутствие или минимальный размер очагов некроза (только 3 из 8 опухолей имели небольшие очаги некроза); митозы обнаруживали крайне редко; дистрофические и деструктивные изменения опухолевых клеток выражались в пикнозе или вакуолизации ядер,

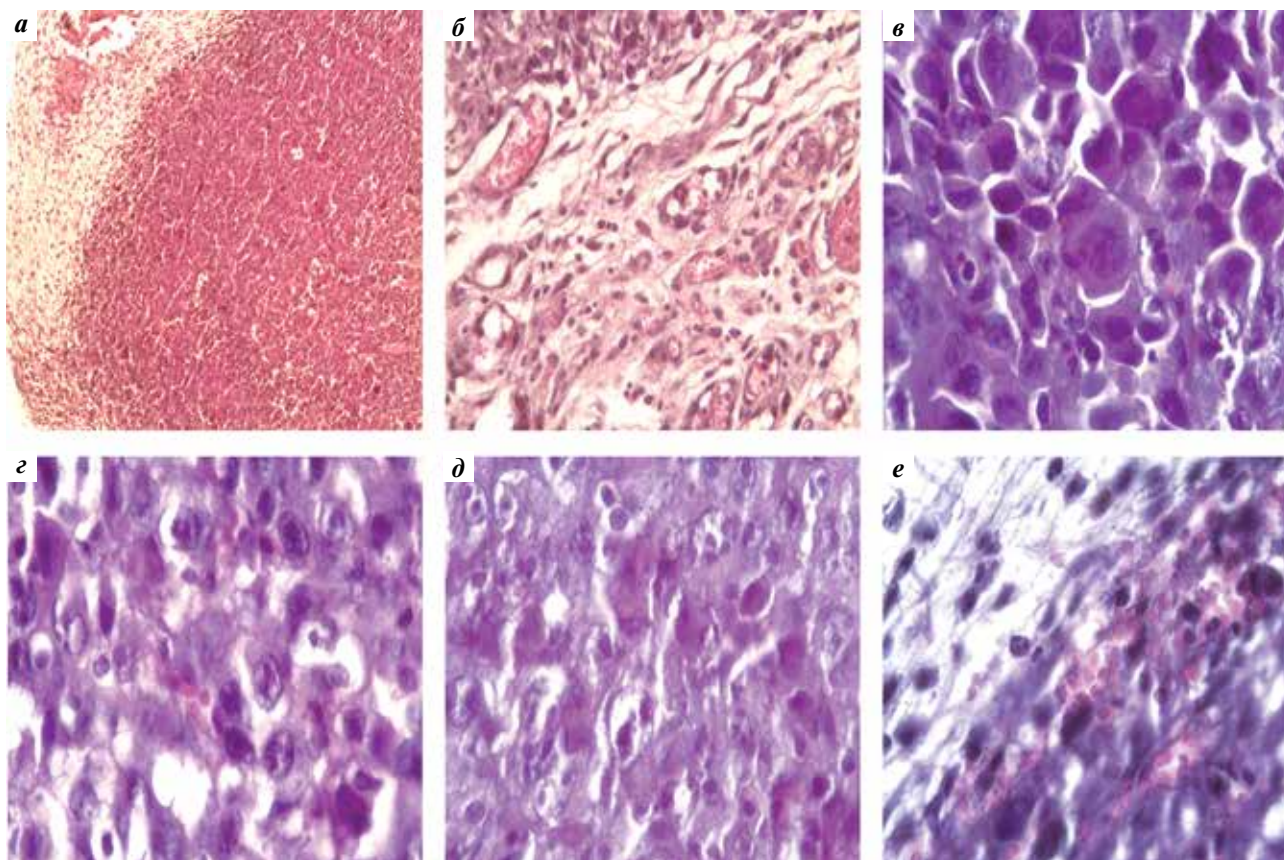


Рис. 3. Изменения в опухоли LLC на 1-е сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения ЛХС-1269 (7-е сутки после перевивки) (окраска гематоксилином и эозином): а — край опухоли с прилегающей рыхлой соединительной тканью ($\times 100$); б — кровеносные сосуды и лимфомакрофагальные элементы в рыхлой соединительной ткани, граничащей с опухолью ($\times 100$); в — полиморфные опухолевые клетки с пикноморфными ядрами ($\times 1000$); г — кровеносные сосуды среди поврежденных опухолевых клеток ($\times 1000$); д — увеличение, вакуолизация и пикноз ядер опухолевых клеток ($\times 1000$); е — кровеносные сосуды в краевой зоне опухоли ($\times 400$)

Fig. 3. Changes in the LLC tumor on the 1st day after 5-fold intraperitoneal injection of LHS-1269 (7th day after inoculation) (staining with hematoxylin and eosin): а — edge of the tumor with adjacent loose connective tissue ($\times 100$); б — blood vessels and lymphomacrophage elements in the loose connective tissue bordering the tumor ($\times 100$); в — polymorphic tumor cells with pycnomorphic nuclei ($\times 1000$); г — blood vessels among damaged tumor cells ($\times 1000$); д — enlargement, vacuolization and pycnosis of tumor cell nuclei ($\times 1000$); е — blood vessels in the marginal zone of the tumor ($\times 400$)

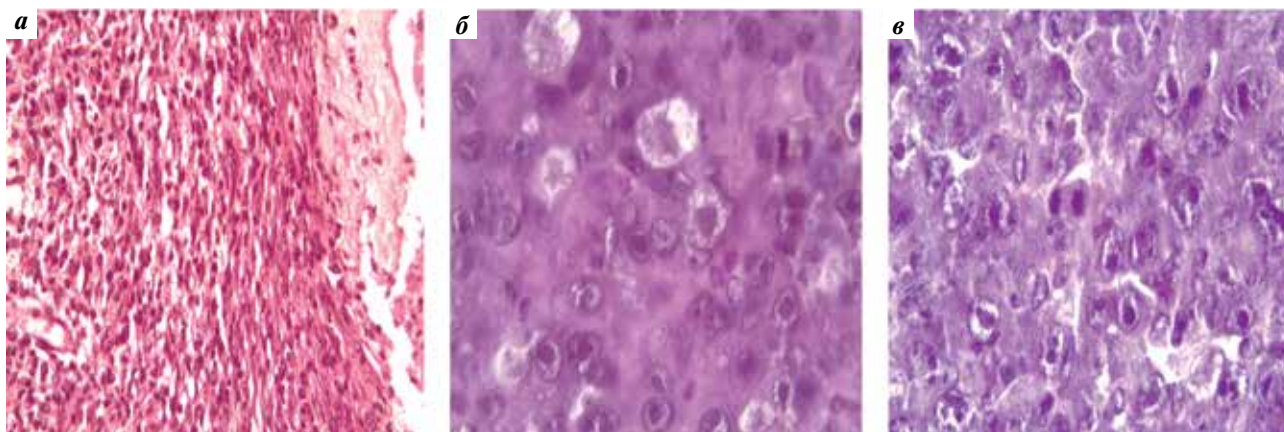


Рис. 4. Изменения в опухоли LLC на 3-и сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения ЛХС-1269 (10-е сутки после перевивки) (окраска гематоксилином и эозином): а — участок соединительнотканной реакции в виде нескольких рядов коллагеновых волокон, фибробластов и макрофагов между ними ($\times 400$); б — участок микронекроза и разрежения клеток опухоли ($\times 400$); в — митоз опухолевой клетки ($\times 1000$)

Fig. 4. Changes in the LLC tumor on 3rd day after 5-fold intraperitoneal injection of LHS-1269 (10th day after inoculation) (staining with hematoxylin and eosin): а — area of connective tissue reaction in the form of several rows of collagen fibers, fibroblasts and macrophages between them ($\times 400$); б — area of micro necrosis and rarefaction of tumor cells ($\times 400$); в — mitosis of a tumor cell ($\times 1000$)

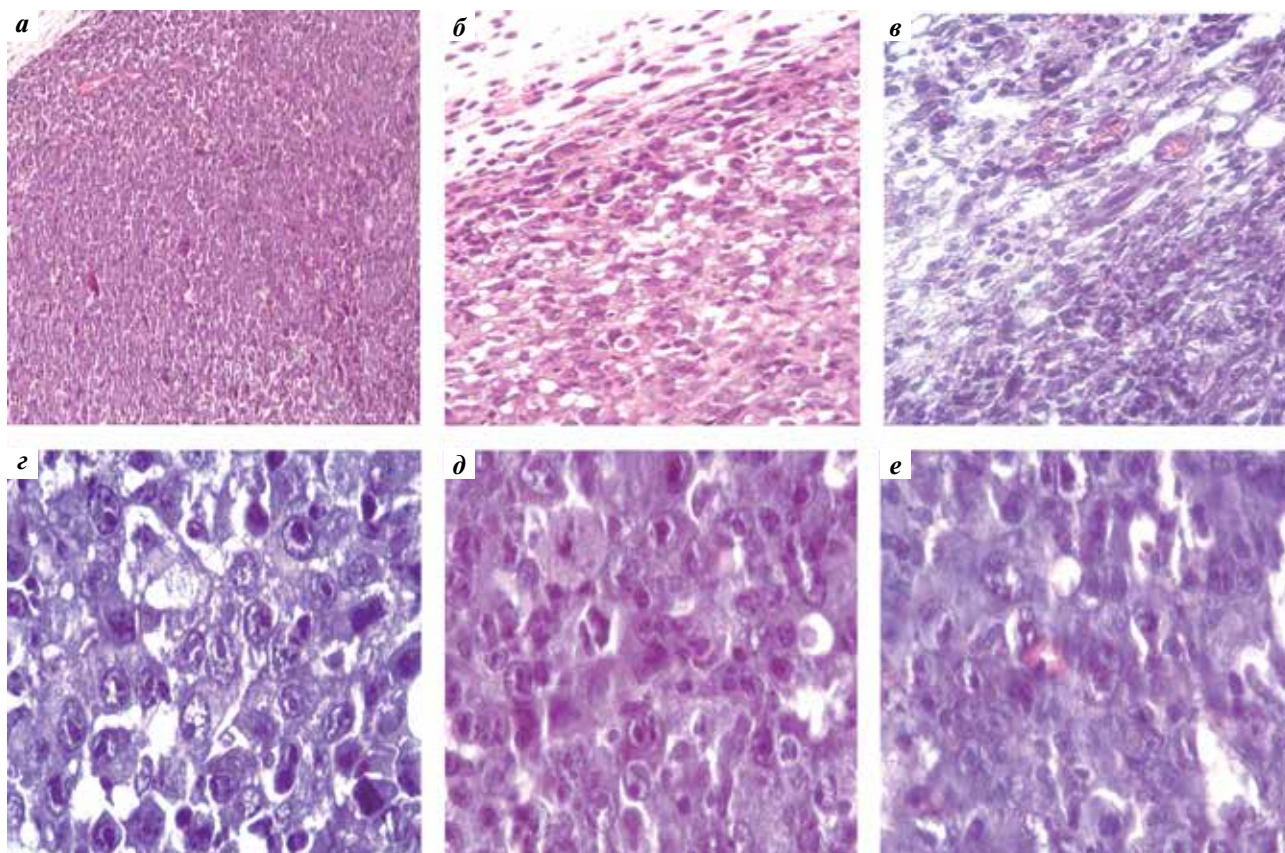


Рис. 5. Изменения в опухоли LLC на 5-е сутки после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 (7-е сутки после перевивки) (окраска гематоксилином и эозином): а – общий вид опухоли LLC, участки рыхлого строения (разрежений) опухолевой ткани и кровеносные сосуды на периферии опухоли ($\times 100$); б – соединительнотканная капсула из параллельных рядов фибробластов и волокнистых структур, рыхлое строение опухоли на периферии ($\times 400$); в – кровеносные сосуды разного калибра и лимфомакрофагальная инфильтрация в рыхлой соединительной ткани, окружающей опухоль ($\times 400$); г – деструктивные изменения и увеличение размеров опухолевых клеток, снижение плотности их расположения ($\times 1000$); д – лизис ядра опухолевой клетки, пикноз и распад ядер опухолевых клеток ($\times 1000$); е – кровеносный сосуд (капилляр) среди измененных опухолевых клеток ($\times 1000$)

Fig. 5. Changes in the LLC tumor on 5th day after a single intravenous injection of LHS-1269 (7th day after inoculation) (staining with hematoxylin and eosin): а – general view of the LLC tumor, areas of loose structure (discharges) of the tumor tissue and blood vessels on the periphery of the tumor ($\times 100$); б – connective tissue capsule of parallel rows of fibroblasts and fibrous structures, loose structure of the tumor on the periphery of the tumor ($\times 400$); в – blood vessels of different calibers and lymphohistiocytic infiltration in the loose connective tissue surrounding the tumor ($\times 400$); г – destructive changes and an increase in the size of tumor cells, a decrease in their density ($\times 1000$); д – lysis of the nucleus of the tumor cell, pyknosis and disintegration of the nuclei of the tumor cells ($\times 1000$); е – blood vessel (capillary) among altered tumor cells ($\times 1000$)

увеличении ядер с конденсацией хроматина, лизисе опухолевых клеток (рис. 5). Кроме того, характерным для большинства опухолей этой группы было появление крупных клеток с оксифильной широкой удлиненной цитоплазмой и овальным ядром, похожих на гигантские фибробласты. Морфологическая картина опухолей этой группы в целом была характерной для частично рассасывающихся опухолей разных штаммов под влиянием противоопухолевых препаратов. Расположение кровеносных сосудов как в опухоли, так и в прилежащей к ней рыхлой соединительной ткани, как и в контроле, было неравномерным.

На 8-е сутки после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 микроскопическая картина несколько отличалась от предыдущей. В опухолях участки плотного строения, состоящие из относительно

мономорфных клеток со светлыми ядрами, чередовались с участками более рыхлого строения. Следует отметить, что крупные фибробластоподобные клетки обнаруживали крайне редко. В некоторых опухолях ближе к центру наблюдали участки начального склероза стромы. В целом в этот срок выявляется еще много поврежденных и погибших опухолевых клеток, а в окружающих тканях и внутри очагов некроза выражена лимфомакрофагальная инфильтрация (рис. 6). Также в этот срок в некоторых участках опухоли обнаруживали фигуры митоза. Кровеносные сосуды, расположенные в опухоли, были редки, отмечалось запустевание части из них (лишены крови).

Таким образом, морфологическое исследование показало, что ЛХС-1269 в примененных дозах и режимах обладает достаточно выраженным цитотоксическим

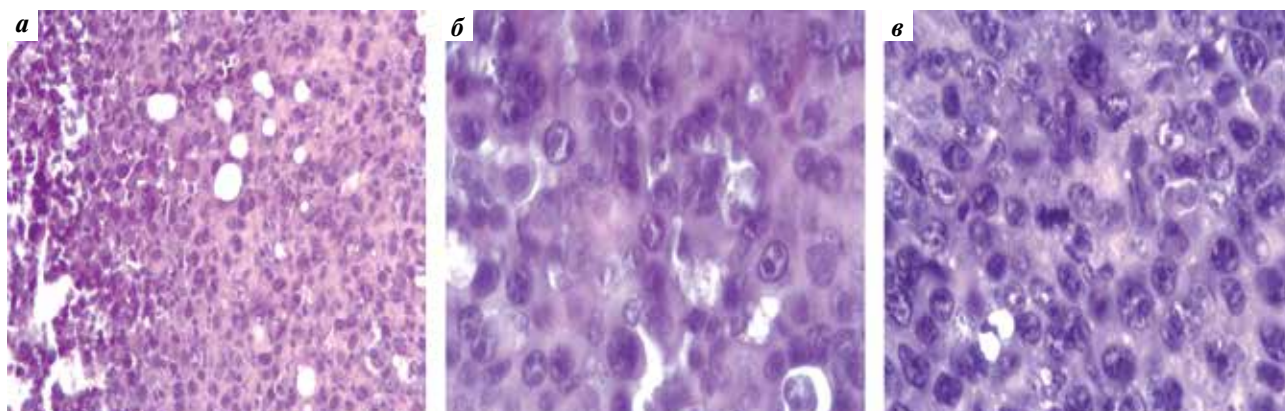


Рис. 6. Изменения в опухоли LLC на 8-е сутки после однократного внутривенного введения ЛХС-1269 (окраска гематоксилином и эозином): а — на периферии опухоли — плотное расположение жизнеспособных опухолевых клеток и лимфоидно-макрофагальных элементов ($\times 400$); б — кровеносный сосуд среди поврежденных и неповрежденных опухолевых клеток ($\times 1000$); в — митотические фигуры и мелкие кровеносные сосуды среди опухолевых клеток ($\times 1000$)

Fig. 6. Changes in the LLC tumor on the 8th day after a single intravenous injection of LHS-1269 (staining with hematoxylin and eosin): а — dense arrangement of viable tumor cells and lymphoid-macrophage elements on the periphery of the tumor ($\times 400$); б — blood vessel among damaged and undamaged tumor cells ($\times 1000$); в — mitotic figures and small blood vessels among tumor cells ($\times 1000$)

действием на перевиваемой карциноме LLC мышей. В нашем опыте ЛХС-1269 при однократном и 5-кратном введении мышам наряду с высоким торможением роста вызывал морфологические изменения в исследованных опухолях: повреждение и гибель многих опухолевых клеток, торможение пролиферации (практически полное исчезновение митотических фигур), инвазию опухолевых клеток, разрастание рыхлой соединительной ткани как на 1-е и 3-и сутки после окончания 5-кратного внутривенного введения, так и на 5-е и 8-е сутки после однократного внутривенного введения. О снижении скорости пролиферации опухолевых клеток под влиянием ЛХС-1269 можно косвенно судить и по уменьшению площади зон некроза в опухолях по сравнению с опухолями контрольной группы. В перевиваемых опухолях очаги некроза развиваются, как известно, вследствие гипоксии, так как образование новых кровеносных сосудов может отставать от размножения самих опухолевых клеток. Морфологические изменения в опухоли LLC были сходны с изменениями в перевиваемых опухолях (включая и опухоль LLC) при действии цитотоксических противоопухолевых препаратов разных классов и наблюдаемыми при изучении патоморфоза разных солидных злокачественных опухолей [17, 19, 20].

Для уточнения предположения об антиангиогенном механизме действия ЛХС-1269 в гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, провели визуальный подсчет кровеносных сосудов в опухоли и окружающих ее тканях при увеличении $\times 1000$, при этом подсчету подвергали хорошо видимые округлые, овальные и несколько вытянутые кровеносные сосуды замкнутого типа, содержащие эритроциты (эритроцит). Кроме того, в препаратах,

окрашенных маркером эндотелия CD31, провели наиболее полное иммуногистохимическое выявление и подсчет микрососудов (эндотелиальных клеток) на 1 поле зрения микроскопа при увеличении микроскопа $\times 200$.

Результаты визуального подсчета кровеносных сосудов в опухоли и окружающей рыхлой соединительной ткани представлены в табл. 2.

ЛХС-1269 в обоих режимах применения (2-я и 3-я группы) вызвал статистически значимое снижение числа кровеносных сосудов в опухоли. В прилежащей к опухоли соединительной ткани статистически значимое снижение числа кровеносных сосудов отмечено только во 2-й группе.

Результаты иммуногистохимического окрашивания CD31⁺ микрососудов в опухоли LLC в участках максимальной плотности при увеличении $\times 200$ после применения ЛХС-1269, представленные в табл. 3, показали, что отмеченное снижение среднего числа CD31⁺-микрососудов во 2-й группе было статистически незначимым по сравнению с контролем. Увеличение этого показателя в 3-й группе было статистически значимым по сравнению с контролем.

При сопоставлении результатов визуального и иммуногистохимического подсчета кровеносных микрососудов на 8-е сутки после перевивки опухолей как в контроле, так и при применении ЛХС-1269 в обоих режимах обнаружены различия в среднем количестве микрососудов (средних числах). Это вполне объяснимо большей чувствительностью иммуногистохимического метода и различиями в использовании разрешающей способности микроскопа. Визуально при увеличении микроскопа $\times 1000$ и окраске гематоксилином и эозином мы могли

Таблица 2. Среднее число кровеносных сосудов в карциноме легкого Льюис и окружающей соединительной ткани после применения ЛХС-1269
Table 2. Mean number of blood vessels in Lewis lung carcinoma and surrounding loose connective tissue after application of LHS-1269

Группа опыта Experience group	Срок оценки эффекта Effect evaluation time		Среднее число кровеносных сосудов, $M \pm m$ Average number of blood vessels, $M \pm m$	
	После перевивки опухоли After tumor transplantation	После окончания введения препарата After the end of the drug administration	Опухоль Tumor tissue	Соединительная ткань Connective tissue
Контроль Control	8-е сутки 8 th day	—	$0,78 \pm 0,43$ ($n = 10$)	$1,31 \pm 0,73$ ($n = 10$)
ЛХС-1269 60 мг/кг $\times$ 5 (в/б) LHS-1269 60 mg/kg $\times$ 5 (i/p)	8-е сутки 8 th day	1-е сутки 1 st day	$0,45 \pm 0,23^*$ ($n = 9$)	$0,67 \pm 0,31^*$ ($n = 8$)
ЛХС-1269 100 мг/кг $\times$ 1 (в/в) LHS-1269 100 mg/kg $\times$ 1 (i/v)	8-е сутки 8 th day	5-е сутки 5 th day	$0,36 \pm 0,22^*$ ($n = 8$)	$1,00 \pm 0,81$ ($n = 9$)

*Статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

*Statistically significant differences compared to control, $p \leq 0.05$.

Примечание. Здесь и в табл. 3: n — число опухолей (мышей).

Note. Here and in table 3: n — number of tumors (mice).

Таблица 3. Результаты иммуногистохимического окрашивания CD31⁺-микрососудов в опухоли (карциноме легкого Льюис) после применения ЛХС-1269
Table 3. Results of immunohistochemical staining of CD31⁺ microvessels in tumor (Lewis lung carcinoma) after application of LHS-1269

Группа опыта Experience group	Срок оценки эффекта Effect evaluation time		Среднее число CD31 ⁺ -микрососудов, $M \pm m$ Mean number of CD31 ⁺ microvessels, $M \pm m$
	После перевивки опухоли After tumor transplantation	После окончания введения препарата After the end of the drug administration	
Контроль Control	8-е сутки 8 th day	—	$59,6 \pm 18,9$ ($n = 10$)
ЛХС-1269 60 мг/кг $\times$ 5 (в/б) LHS-1269 60 mg/kg $\times$ 5 (i/p)	8-е сутки 8 th day	1-е сутки 1 st day	$56,1 \pm 16,1$ ($n = 9$)
ЛХС-1269 100 мг/кг $\times$ 1 (в/в) LHS-1269 100 mg/kg $\times$ 1 (i/v)	8-е сутки 8 th day	5-е сутки 5 th day	$83,1 \pm 8,7^*$ ($n = 8$)

*Статистически значимые различия по сравнению с контролем, $p \leq 0,05$.

*Statistically significant differences compared to control, $p \leq 0.05$.

видеть и подсчитывать лишь микрососуды диаметром от 3—8 до 40 мкм и более, образованные 1—2 эндотелиальными клетками и содержащие эритроциты. Кроме того, подсчет сосудов проводили в случайных полях зрения микроскопа по всей площади среза. При иммуногистохимическом исследовании выявляется значительно больше мелких микрососудов разной формы и величины (от 1—2 мкм) в участках максимальной плотности микрососудов. Иммуногистохимическое исследование показало, что соединение ЛХС-1269 на 1-е сутки после 5-кратного внутрибрюшинного введения не проявило антиангиогенного действия в опухоли LLC, а на 5-е сутки после его однократного внутривенного применения

вызвало стимулирование ангиогенеза. Визуальное исследование плотности микрососудов в LLC при применении ЛХС-1269 в тех же режимах и дозах в те же сроки показало некоторый антиангиогенный эффект.

Заключение

Учитывая результаты морфологического исследования опухоли LLC и высокий процент ТРО, можно заключить, что ЛХС-1269 обладает цитотоксическим действием. При этом ЛХС-1269 в режиме однократного и 5-кратного введения мышам вызывает выраженные морфологические изменения в виде повреждений и гибели многих опухолевых клеток, изменения

структуры опухоли LLC. Также вместе с опухолевыми клетками происходят прямое повреждение и гибель некоторой части более крупных кровеносных сосудов или их участков. Более мелкие микрососуды и отдельные эндотелиальные клетки, определяемые иммуно-

гистохимическим методом, сохраняются, и наблюдается неоангиогенез. Результаты исследования ангиогенеза в опухоли не позволяют сделать вывод об антиангиогенном механизме действия ЛХС-1269 в перевиваемой карциноме легкого LLC мышей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Голубева И.С., Яворская Н.П., Еремина В.И. и др. Противоопухолевая активность гликозидов индокарбазолов. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):23–4. Golubeva I.S., Yavorskaya N.P., Eremina V.I. et al. Antitumor activity of indolocarbazole glycosides. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):23–4 (In Russ.).
2. Яворская Н.П., Голубева И.С., Эктова Л.В. и др. Противоопухолевая активность индокарбазола ЛХС-1269. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(1):125–6. Yavorskaya N.P., Golubeva I.S., Ektova L.V. et al. Antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(1):125–6. (In Russ.).
3. Голубева И.С., Еремина В.И., Тихонова Н.И. и др. Изучение противоопухолевой активности индокарбазола ЛХС-1269 на раке легкого LLC, режимы и способы введения. Российский биотерапевтический журнал 2018;17(S):21. Golubeva I.S., Eremina V.I., Tikhonova N.I. et al. Study of the antitumor activity of indolocarbazole LHS-1269 on lung cancer LLC, modes and methods of administration. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2018;17(S):21. (In Russ.).
4. Vartanian A., Golubeva I., Shprakh Z. Is vasculogenic mimicry a hallmark of an aggressive tumor? In: Horizons in cancer research. V. 65. Ed. by Y.S. Watanabe. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2017. P. 13–33.
5. Зенков Р.Г., Фетисов Т.И., Эктова Л.В. и др. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности производных N-гликозидов индокарбазолов ЛХС-1208 и ЛХС-1269. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4S):87. Zenkov R.G., Fetisov T.I., Ektova L.V. et al. Molecular mechanisms of antitumor activity of derivatives of N-glycosides of indolocarbazoles LHS-1208 and LHS-1269. Uspekhi molekularnoy onkologii = Advances in molecular oncology 2018;5(4S):87.
6. Acero N., Braña M.F., Añorbe L. et al. Synthesis and biological evaluation of novel indolocarbazoles with anti-angiogenic activity. Eur J Med Chem 2012;48(2):108–13. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.11.040
7. Kerbel R.S. Tumor angiogenesis. N Engl J Med 2008;358(19):2039–49. DOI: 10.1056/NEJMed0706596
8. Сеньчукова М.А., Макарова Е.В., Калинин Е.А., Ткачев В.В. Современные представления о происхождении, особенностях морфологии, прогностической и предиктивной значимости опухолевых сосудов. Российский биотерапевтический журнал 2019;18(1):6–15. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-6-15
9. Сеньчукова М.А., Макарова Е.В., Калинин Е.А., Ткачев В.В. Modern ideas about the origin, features of morphology prognostic and predictive significance of tumor vessels. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2019;18(1):6–15. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-1-6-15
10. Иванов А.И., Пучиньян Д.М., Норкин И.А. Роль эндотелиальных клеток в ангиогенезе. Успехи современной биологии 2015;136(5):491–505. Ivanov A.I., Puchin'yan D.M., Norkin I.A. The role of endothelial cells in angiogenesis. Uspekhi sovremennoy biologii = Advances in Modern Biology 2015;136(5):491–505. (In Russ.).
11. Григорьева И.Н., Харатишвили Т.К., Барышников А.Ю. Васкулогенная мимикрия – альтернативный механизм кровоснабжения опухоли? Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):25–9. Grigorieva I.N., Kharatishvili T.K., Baryshnikov A.Yu. Vasculogenic mimicry – an alternative mechanism of tumor blood supply? Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2011;10(3):25–9.
12. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза. Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):17–24. Blokhin D.Y., Chmutin E.F., Ivanov P.K. Molecular targets for anticancer therapy: growth factors, angiogenesis and apoptosis. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2011;10(3):17–24. (In Russ.).
13. Ливанова А.А., Деев Р.В., Ризванов А.А. Современные методы исследования ангиогенеза в эксперименте. Гены и клетки 2015;10(1):115–27. Livanova A.A., Deev R.V., Rizvanov A.A. Modern methods for the study of angiogenesis in the experiment. Geny i kletki = Genes and Cells 2015;10(1):115–27. (In Russ.).
14. Горбань Н.Е., Корякин О.Б., Попов А.М. и др. Роль морфологических показателей внутриопухолевых микрососудов и пролиферативной активности опухолевых клеток при почечно-клеточном раке. Онкоурология 2012;8(4):10–4. DOI: 10.17650/1726-9776-2012-8-4-10-14
15. Горбань Н.Е., Корякин О.Б., Попов А.М. et al. The role of morphological parameters of intratumoral microvessels and proliferative activity of tumor cells in renal cell carcinoma. Onkourologiya = Oncourology 2012;8(4):10–4. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2012-8-4-10-14
16. Спринджук М.В. Ангиогенез и цифровая патология. Доступно по: https://oncology.ru/specialist/journal_oncology/arch

- ive/0211/001/?ysclid=lasqywgmsy404775687.
Sprindzukn M.V. Angiogenesis and digital pathology. Available at: https://oncology.ru/specialist/journal_oncology/archive/0211/001/?ysclid=lasqywgmsy404775687. (In Russ.).
16. Никитенко Н.В., Сеньчукова М.А., Томчук О.Н. и др. Морфологическая характеристика и прогностическое значение разных типов сосудов при раке молочной железы. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(3):15–22. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-22
Nikitenko N.V., Senchukova M.A., Tomchuk O.N. et al. Morphological characteristic and clinical value of different types of tumor vessels in breast cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2016;15(3):15–22. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-22
 17. Хоченков Д.А., Сапрыкина Н.С., Барышникова М.А. и др. Новый механизм действия аранозы — блокада неоангиогенеза. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина 2015;3:71–5. Khochenkov D.A., Saprykina N.S., Baryshnikova M.A. et al. A new mechanism of action of aranzose — blockade of neoangiogenesis. Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina = Journal of N.N. Blokhin Russian Oncology Center 2015;3:71–5. (In Russ.).
 18. Федосеева В.В., Постовалова Е.А., Халанский В.А. и др. Лекарственный патоморфоз глиобластомы 101,8 у крыс линии Wistar при лечении наноразмерной формой доxorубина на основе полилактидных наночастиц. Современные технологии в медицине 2018;10(4):105–12. DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12
Fedoseeva V.V., Postovalova E.A., Khalansky V.A. et al. Drug-induced pathomorphosis of glioblastoma 101.8 in Wistar rats treated with doxorubicin bound to poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. Sovremennye tehnologii v meditsine = Modern Technologies in Medicine 2018;10(4):105–12. (In Russ.). DOI: 10.17691/stm2018.10.4.12
 19. Плотникова Н.А., Пятаев Н.А., Канаев П.М. и др. Особенности морфологии карциномы легкого Льюиса на фоне коррекции опухолевого роста мелатонином и 3-гидроксипиридином. Фундаментальные исследования 2014;(10-3):549–52. Plotnikova N.A., Pyataev N.A., Kanaev P.M. et al. Features of the morphology of Lewis lung carcinoma against the background of correction of tumor growth with melatonin and 3-hydroxypyridine. Fundamentalnye issledovaniya = Basic Research 2014;(10-3):549–52.
 20. Джадранов Е.С., Ергазина М.Ж., Джангельдина З.Н., Красноштанов А.В. Влияние циклофосфана на развитие экспериментальной перевивной опухоли крыс саркома 45. Вестник КазНМУ 2015;(1):351–3. Dzhadranov E.S., Ergazina M.Zh., Dzhangel'dina Z.N., Krasnoshtanov A.V. Influence of cyclophosphane on the development of an experimental transplantable tumor of sarcoma rats 45. Vestnik KazNMU = Bulletin of Kazakh National Medical University 2015;(1):351–3. (In Russ.).
 21. Грабовий О.М., Тарасова Т.О., Кушубарова М.В. Гистологическая оценка ответа опухоли на химио-/лучевую терапию. Клінічна Онкологія 2012;6(2):138–43. Graboviy O.M., Tarasova T.O., Kushubarova M.V. Histological assessment of tumor response to chemotherapy/radiation therapy. Klinichna onkologiya = Clinical Oncology 2012;6(2):138–43. (In Russ.).
 22. Галахин К.А., Югринов О.Г., Курик Е.Г. и др. Химиотерапевтический патоморфоз злокачественных опухолей. Украинский химиотерапевтический журнал 2000;4:8–12. Galakhin K.A., Yuginov O.G., Kurik E.G. et al. Chemotherapeutic pathomorphosis of malignant tumors. Ukrainskiy khimioterapevticheskiy zhurnal = Ukrainian Journal of Chemotherapy 2000;4:8–12. (In Russ.).
 23. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевых лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А.Н. Миронова, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–57. [Treshcalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Guidelines for preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Ed. by A.N. Mironov, N.D. Bunyatyan, A.N. Vasil'yev et al. Moscow: Grief i K, 2012. P. 642–57. (In Russ.).
 24. Mayo J.G. Biological characterizations of the subcutaneously implanted Lewis lung tumor. Cancer Chemother Rep (2) 1972;3(1):325–30.

Вклад авторов

И.Б. Меркулова: разработка плана и дизайна исследования, получение и анализ данных, анализ данных литературы, написание, оформление и редактирование статьи;
И.С. Голубева, Т.В. Абрамова: постановка эксперимента, получение данных для анализа;
Д.А. Хоченков: получение данных для анализа, анализ и статистическая обработка данных, написание раздела статьи;
Н.П. Ермакова: статистическая обработка данных;
Л.В. Эктова: автор соединения ЛХС-1269, синтез субстанции, разработка и планирование концепции статьи, редактирование статьи.

Authors' contributions

I.B. Merkulova: developing of the plan and design of the research, data obtaining and analysis, article writing, design and editing of the article;
I.S. Golubeva, T.V. Abramova: experimental set up, obtaining data for analysis;
D.A. Khochenkov: obtaining data for analysis, analysis and statistical data processing, writing of the article section;
N.P. Ermakova: statistical data processing;
L.V. Ektova: author of LHS-1269 compound, synthesis of substance, development and planning of the article concept, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

И.Б. Меркулова / I.B. Merkulova: <https://orcid.org/0000-0001-7461-3422>
И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>
Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>
Т.В. Абрамова / T.V. Abramova: <https://orcid.org/0000-0002-8662-3422>
Н.П. Ермакова / N.P. Ermakova: <https://orcid.org/0000-0002-3125-157X>
Л.В. Эктова / L.V. Ektova: <https://orcid.org/0000-0002-3987-6072>

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

Финансирование. Исследование выполнено без спонсорской поддержки.
Funding. The study was performed without external funding.

Соблюдение правил биоэтики. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.
Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes.

Статья поступила: 28.02.2022. Принята к публикации: 28.10.2022.
Article submitted: 28.02.2022. Accepted for publication: 28.10.2022.

