

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

Российский Биотерапевтический Журнал
2023 • том 22 • № 3



**Russian Journal
of Biotherapy**

3

ТОМ 22
2023

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук.

Журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

теоретический и научно-практический рецензируемый журнал

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

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

ОСНОВАН В 2002 г. профессором А.Ю. Барышниковым

3 ТОМ 22
'23

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: bioterapy_rbj@mail.ru
rbjournal@ronc.ru

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

Редактор Е.М. Печерская
Корректоры: Р.В. Журавлева,
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.
2023. Том 22. № 3. 1–88.
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2023

Подписной индекс в каталоге агентства
«Роспечать» – 81679.
Отпечатано в типографии «Лайдер принт».
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, профессор 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)

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)

Курбатова Екатерина Алексеевна, д.м.н., профессор, заведующая лабораторией терапевтических вакцин ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (Москва, 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 Наталья 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

3 VOL. 22
'23

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
Proofreaders: R.V. Zhuravleva, 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. 2023. Volume 22. No 3. 1–88.

© PH "ABV-Press", 2023
Rospechat' catalogue index: 81679.
Printed at the Leader Print Ltd Bld. 16, 13 Perevedenovsky lane, Moscow 105082.
1,000 copies. Free distribution
<http://bioterapevt.elpub.ru>

EDITOR-IN-CHIEF

Kiselevskiy, Mikhail V., 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

Karaulov, Alexander V., 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)

Shprakh, Zoya S., PhD, DSc, Head of Laboratory of Chemical-Pharmaceutical Analysis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia, 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

Sokolova, Zinaida A., 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

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

Bunyatyán, Natalia D., 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)

Evsegneevea, Irina V., 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)

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

Kurbatova, Ekaterina A., PhD, DSc, Professor, Head of Laboratory of Therapeutic Vaccines, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera (Moscow, Russia)

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

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

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

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

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

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

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

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

Sokolova, Tatiana M., 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)

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

Titov, Konstantin S., 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)

Ulasov, Ilya V., 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)*

Estrin, Yuri Z., 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

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

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

Demidov, Lev V., 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)*

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

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

Kosorukov, Vyacheslav S., 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)*

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

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

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- В.Н. Блиндарь, Г.Н. Зубрихина, Т.В. Давыдова, М.М. Добровольская*
Особенности регуляции гепсидина и ферропортина у онкологических больных
(обзор литературы) 10

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

- М.П. Никулин, Н.В. Шилова, А.Д. Липатников, А.В. Семьянихина, И.С. Стилиди,
 Н.В. Бовин, Н.Н. Тупицын*
**Уровни антител к маннозе у больных раком желудка (обзор литературы
 и клинико-экспериментальное исследование) 19**

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Н.Р. Хилал, Д.В. Новиков, В.Н. Якимов, Р.Г. Пегов, В.В. Новиков*
мРНК гена *OY-TES-1* в периферической крови и опухоли при колоректальном раке. . . . 28
- А.С. Анискина, Ю.Г. Паяниди, А.М. Строганова, И.В. Манина, К.И. Жордания*
**Определение статуса микросателлитной нестабильности в опухолях больных
 эндометриодной аденокарциномой яичников и/или тела матки 36**
- О.Н. Гуськова, И.А. Аллилуев, Е.В. Вереникина, В.В. Половодова, М.А. Rogozin,
 Т.Ю. Мяжкова, М.Л. Адамян, О.Е. Женило, Н.М. Абдуллаева, М.Р. Цандекова,
 Н.Д. Ушакова, Д.С. Кутилин*
**Изменение концентрации метаболитов в моче как малоинвазивный маркер
 серозной аденокарциномы яичников 43**
- О.А. Бочарова, И.В. Казеев, В.Е. Шевченко, Н.С. Ионов, О.П. Шейченко,
 Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова, В.Г. Кучеряну, А.А. Лагунин, Д.А. Филимонов,
 В.С. Косоруков, В.В. Поройков, В.А. Тутьельян, Н.В. Пятигорская*
**Схизандрин и схизантерин А в составе мультифитоадаптогена
 для профилактической онкологии 51**
- Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова, О.В. Рыбальченко, М.В. Шинкарева,
 Д.Р. Темралиева, К.М. Новрузов, А.Г. Рааб, Е.А. Лукьянова, Е.А. Корнюшенков,
 Д.В. Филоненко, Д.Е. Митрушкин, С.В. Добаткин*
**Исследование биосовместимости и противоопухолевой цитотоксической
 активности *in vitro* упрочненных равноканальным угловым прессованием
 сплавов $Zn - 1\%Mg$ и $Zn - 1\%Mg - 0,1\%Ca$ 64**
- Д.А. Церковский, А.Н. Мазуренко, Д.И. Козловский, Н.Д. Адаменко,
 Ф.Ф. Боричевский*
**Комбинированная фотодинамическая и радиодинамическая терапии
 с хлориновым фотосенсибилизатором при фракционированном лучевом воздействии
 на перевивные опухоли в эксперименте *in vivo* 75**

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ 87

REVIEWS

*Valentina N. Blindar, Galina N. Zubrikhina, Tatiana V. Davydova,
Marina M. Dobrovolskaya*

Features of regulation of hepcidin and ferroportin in cancer patients (literary review) 10

LITERATURE REVIEW AND CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDY

*Maxim P. Nikulin, Nadia V. Shilova, Alexander D. Lipatnikov, Alexandra V. Semyanikhina,
Ivan S. Stilidi, Nikolay V. Bovin, Nikolay N. Tupitsyn*

**Mannose antibody levels in gastric cancer patients (literature review and clinical
and experimental study) 19**

ORIGINAL REPORTS

*Nadezhda R. Hilal, Dmitry V. Novikov, Vasily N. Yakimov, Roman G. Pegov,
Viktoir V. Novikov*

mRNA of the OY-TES-1 gene in peripheral blood and tumors in colorectal cancer 28

*Anastasiia S. Aniskina, Julia G. Payanidi, Anna M. Stroganova, Irina V. Manina,
Kirill I. Zhordania*

**Detection of a status of microsatellite instability in tumors of patients
with endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and/or of uterine corpus 36**

*Olga N. Guskova, Ilya A. Alliluyev, Ekaterina V. Verenikina, Veronica V. Polovodova, Ark A. Ro-
gozin, Tatiana Yu. Myagkova, Mary L. Adamyan, Oksana E. Zhenilo,
Nina M. Abdullaeva, Marietta R. Tsandekova, Denis S. Kutilin*

**Changes in urine metabolite concentration as a minimally invasive marker
of ovarian serous adenocarcinoma 43**

*Olga A. Bocharova, Ilya V. Kazeev, Valery E. Shevchenko, Nikita S. Ionov, Olga P. Sheichenko,
Eugeny V. Bocharov, Regina V. Karpova, Valerian G. Kucheryanu, Alexey A. Lagunin, Dmi-
try A. Filimonov, Vyacheslav S. Kosorukov, Vladimir V. Poroikov, Viktor A. Tutelyan, Nata-
lya V. Pyatigorskaya*

Schisandrin and Schisantherin A in Multiphytoadaptogen for Preventive Oncology 51

*Natalia S. Martynenko, Natalia Yu. Anisimova I—, Olga V. Rybalchenko, Maria V. Shinkare-
va, Diana R. Temralieva, Keryam M. Novruzov, Arseny G. Raab, Elena A. Lukyanova, Evge-
ny A. Korniyushenkov, Dmitriy V. Filonenko, Dmitriy E. Mitrushkin, Sergey V. Dobatkin*

**Study of biocompatibility and antitumor cytotoxic activity *in vitro* of Zn – 1 %Mg
and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys strengthened by equal angular pressing 64**

*Dmitry A. Tzerkovsky, Alexandr N. Mazurenko, Denis I. Kozlovsky,
Natalia D. Adamenko, Fedor F. Borichevsky*

**Combined photodynamic and radiodynamic therapy with a chlorine photosensitizer
under fractionated radiation exposure to transplanted tumors in an *in vivo* experiment 75**

INFORMATION FOR AUTHORS 87

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-10-18>

Особенности регуляции гепсидина и ферропортина у онкологических больных (литературный обзор)

В.Н. Блиндарь, Г.Н. Зубрихина, Т.В. Давыдова, М.М. Добровольская

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

Контакты: Валентина Николаевна Блиндарь bld51@list.ru

Введение. Пути приобретения, оттока, хранения и регуляция железа нарушены при раке, что позволяет предположить то, что перепрограммирование метаболизма железа – один из центральных аспектов выживания опухолевых клеток.

Цель исследования – обзор и обобщение современных литературных данных об особенностях регуляции гепсидина, ферропортина и перспективах коррекции метаболизма железа у онкологических больных.

Материалы и методы. В работе представлены результаты международных и отечественных исследований особенностей метаболизма железа и перспективы коррекции его показателей у онкологических больных. Поиск соответствующих источников произведен в системах Web of Science, PubMed, Medline, eLibrary.ru за период 1988–2023 гг. Из проанализированных исследований 61, наиболее актуальное, было использовано для написания систематического обзора.

Результаты. За последнее десятилетие появилось новое понимание роли белков, в частности гепсидина и ферропортина, которые регулируют клеточное железо, в росте рака, его ангиогенезе и метастазировании. Появляются новые методы лечения с модифицирующими гепсидин стратегиями и стабилизаторами факторов, индуцируемых гипоксией, но их терапевтическая эффективность для коррекции метаболизма железа у онкологических больных нуждается в оценке и клинических испытаниях.

Заключение. Анализ литературных данных показал высокую актуальность исследований особенностей регуляции гепсидина и ферропортина у онкологических больных и необходимость дальнейшего изучения этой проблемы.

Ключевые слова: метаболизм железа, онкологические больные, гепсидин, ферропортин

Для цитирования: Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В., Добровольская М.М. Особенности регуляции гепсидина и ферропортина у онкологических больных (литературный обзор). Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):10–18. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-10-18

Features of regulation of hepcidin and ferroportin in cancer patients (literary review)

Valentina N. Blindar, Galina N. Zubrikhina, Tatiana V. Davydova, Marina M. Dobrovolskaya

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

Contacts: Valentina Nikolaevna Blindar bld51@list.ru

Background. The pathways of iron acquisition, outflow, storage and regulation are disrupted in cancer, which suggests that the reprogramming of iron metabolism is one of the central aspects of the survival of tumor cells.

Aim. Is to review and generalize modern literature data on the regulation of hepcidin, ferroportin and prospects for the correction of iron metabolism in cancer patients.

Materials and Methods. The paper presents the results of international and domestic studies of the peculiarities of iron metabolism and the prospects for its correction in cancer patients. The search for relevant sources was carried out in the Web of Science, PubMed, Medline, eLibrary.ru systems for 1988–2023. Of the analyzed studies 61, the most relevant, were used to write a systematic review.

Results. Over the past decade, a new understanding has emerged of the role of proteins, in particular hepcidin and ferroportin, which regulate cellular iron in cancer growth, angiogenesis and metastasis. New treatment methods

with hepcidin-modifying strategies and stabilizers of hypoxia-induced factors are emerging, but their therapeutic efficacy for correcting iron metabolism in cancer patients needs to be evaluated and clinical trials.

Conclusion. Analysis of the literature data has shown the high relevance of studies of the regulation of hepcidin and ferroportin in cancer patients and the need for further study of this problem.

Keywords: iron metabolism, cancer patients, hepcidin, ferroportin

For citation: Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V., Dobrovolskaya M.M. Features of regulation of hepcidin and ferroportin in cancer patients (literary review). Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):10–18. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-10-18

Введение

Представление о метаболизме железа в опухолевых клетках значительно изменилось за последние годы. Многие белки, участвующие в регуляции метаболизма железа, показали высокую экспрессию, и они, по-видимому, могут влиять на пролиферацию и метастазирование при раке. У онкологических больных часто выявляют высокий уровень сывороточного гепсидина [1–5].

Цель исследования — обзор и обобщение современных литературных данных об особенностях регуляции гепсидина, ферропортина и перспективах коррекции метаболизма железа у онкологических больных.

Материалы и методы

В работе представлены результаты международных и отечественных исследований особенностей метаболизма железа и перспективы коррекции его показателей у онкологических больных. Поиск соответствующих источников произведен в системах Web of Science, PubMed, Medline, eLibrary.ru за период 1988–2023 гг. Из проанализированных исследований 61, наиболее актуальное, было использовано для написания систематического обзора.

Результаты

Гепсидин — гормон, представляющий пептид из 25 аминокислот, вырабатываемый в печени, участвует в регуляции метаболизма и транспорта железа в организме, играет важную роль в развитии анемии при хронических заболеваниях, обусловленной активацией провоспалительных цитокинов у онкологических больных. Исследователи полагают то, что специфический цитокин, известный как интерлейкин-6 (ИЛ-6), в большинстве случаев стимулирует выработку гепсидина, хотя последний также может вырабатываться в ответ на воспаление путями, не связанными с ИЛ-6. Избыток гепсидина приводит к тому, что слишком много железа задерживается в клетках, снижая количество железа, доступного для производства гемоглобина, что приводит к анемии с нарушением метаболизма железа. Большинство авторов считают, что гепсидин — ключевой фактор, влияющий на развитие цитокин-индуцированной анемии [1, 3, 6].

В настоящее время разработан и применяется в практике сывороточный иммуноферментный анализ (ИФА) гепсидина. Исследования [6, 7, 8, 9] показали неопределяемые или низкие концентрации гепсидина в сыворотке крови у пациентов с железодефицитной анемией (ферритин <10 нг/мл) и гемохроматозом, высокие — у пациентов с воспалением (С-реактивный белок >10 мг/л), множественной миеломой или хроническим заболеванием почек. Метод исследования гепсидина с помощью ИФА в сыворотке или плазме крови дает точные и воспроизводимые результаты, которые надлежащим образом отражают физиологические, патологические и генетические процессы, а также информацию об этиологии заболеваний, связанных с железом.

Ферропортин и гепсидин являются критически важными белками для регуляции системного гомеостаза железа. Ферропортин — единственный белок с известным механизмом экспорта внутриклеточного железа, не связанного с гемом; его стабильность регулируется гормоном гепсидином. В работе [10] продемонстрировано то, что как ферропортин, так и гепсидин экспрессируются в культивируемых эпителиальных клетках молочной железы человека и что гепсидин регулирует ферропортин в этих клетках.

Ряд публикаций указывают на то, что центральная передача сигналов гомеостаза железа, ось «гепсидин — ферропортин» искаженно регулируются при раке. Тем не менее механизмы неправильной регуляции экспрессии связанных с железом генов по этой передаче сигналов при раке остаются в значительной степени неизвестными. Недавние исследования подтверждают то, что нарушение гомеостаза железа при раке происходит из-за аномальной регуляции гепсидина и ферропортина, оба из которых имеют прогностическое значение у онкологических больных [1, 4].

Избыточная экспрессия гепсидина предотвращает экспорт железа посредством деградации ферропортина, основного клеточного транспортера железа, и тем самым увеличивает пул железа в опухолевых клетках, помогая им выживать и размножаться [1, 11]. Сами опухолевые клетки могут быть источником этого белка или провоспалительных цитокинов. Ряд авторов наблюдали повышенный уровень гепсидина при злокачественных опухолях молочной железы

по сравнению с доброкачественными заболеваниями [6, 11]. В свою очередь, избыток гепсидина может снижать всасывание железа из кишечника и блокировать утилизацию железа в костном мозге. Железо может быть в избытке в костном мозге, но не всасываться и не поступать в кровоток, поэтому оно недоступно для эритропоэза (ЕРО): развивается функциональный дефицит железа. Эффективное лечение анемии и восстановление метаболизма железа могут привести к улучшению качества жизни и повышению выживаемости больных со злокачественными опухолями, теоретически — к замедлению прогрессирования процесса и повышению эффективности противоопухолевой терапии [7, 12–15].

Экспериментально доказано то, что повышенная продукция гепсидина при воспалениях осуществляется посредством провоспалительных цитокинов, наиболее эффективный из которых — ИЛ-6. Показано, что уровень ИЛ-6 часто увеличивается и коррелирует с уровнем гепсидина [16, 17]. Вместе с тем на ранних стадиях рака, в частности рака молочной железы, не выявлено тесной корреляции между воспалительными стимулами и увеличением гепсидина, о чем свидетельствовало и наше исследование, проведенное ранее у 37 больных раком молочной железы и у 30 здоровых женщин с помощью ИФА [3, 6, 9]. Показатели гепсидина в контрольной группе колебались в пределах 0,8–7,5 нг/мл, в среднем они составили $4,6 \pm 0,06$ нг/мл. При этом у больных раком молочной железы и железодефицитной анемией значения гепсидина были ниже 4,6 нг/мл, а при функциональном дефиците железа значительно превышали пороговые значения нормы (>25 нг/мл). Следует отметить то, что выявлены статистически значимые более высокие значения гепсидина у пациенток с III–IV стадией по сравнению с группой больных с I–II стадией рака молочной железы.

В ряде работ отмечена корреляция высокого уровня ИЛ-6 с агрессивным поведением опухоли, неблагоприятным гистологическим подтипом и метастатическим потенциалом [17]. Эти наблюдения также подтверждены исследованиями пациентов с метастатическим раком молочной железы, где уровень ИЛ-6 в сыворотке значительно коррелировал с уровнем сывороточного гепсидина [18, 19].

Нарушения модуляторов железа при раке вызывают изменения гомеостаза железа. Пути приобретения, оттока, хранения и регуляция железа нарушены при раке, что позволяет предположить то, что перепрограммирование метаболизма железа — один из центральных аспектов выживания опухолевых клеток. Железо — важный микроэлемент, способствующий пролиферации и росту клеток. Однако железо также участвует в окислительно-восстановительных процессах и образовании свободных радикалов. Сле-

довательно, железо может способствовать как иницированию, так и росту опухоли [1–3, 5, 6]. Клинические исследования обнаружили, что существует положительная корреляция между содержанием железа в организме и риском развития опухолей [20–22]. При этом в ряде исследований документально подтверждено то, что уменьшение поступления железа в опухолевые клетки может препятствовать росту опухоли на экспериментальных моделях [22] и даже у пациентов с различными видами рака [23–25].

Свободное нехелатированное железо вследствие его каталитического действия в одной из редокс-реакций ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}$) образует гидроксильные радикалы, которые могут вызывать гибель клеток в результате пероксидативного повреждения клеточных мембран. Токсичность свободного двухвалентного железа объясняется его способностью запускать цепные свободно-радикальные реакции, приводящие к перекисному окислению липидов в биологических мембранах, повреждению структуры белков и нуклеиновых кислот [20]. Канцерогенный эффект железа может быть обусловлен несколькими факторами, такими как гиперпродукция активных форм кислорода и свободных радикалов через железо-зависимую реакцию Фентона, индукцию транскрипционных факторов, чувствительных к окислению, и провоспалительных цитокинов, а также передачу сигналов железо-опосредованной гипоксии [26].

Гипоксия в опухолях — прежде всего патофизиологическое следствие структурно-функционального нарушения микроциркуляции и ухудшения условий диффузии. Опухолевая гипоксия, по всей вероятности, тесно связана с распространением опухоли, злокачественной прогрессией и резистентностью к терапии, и таким образом она стала центральной проблемой физиологии опухолей и лечения рака [26, 27]. Гипоксические области, области пониженного уровня кислорода в тканях обнаруживаются во многих солидных опухолях, возникающих в результате неупорядоченной сосудистой сети, развившейся для снабжения кислородом быстро растущей опухоли. Гипоксия обычно возникает в солидных опухолях на расстоянии примерно 100 мкм от функционального кровеносного сосуда. Опухоли могут преодолеть ограничения пролиферации, вызванные стрессовой микросредой, путем стимуляции образования новых кровеносных сосудов за счет высвобождения индуцируемых гипоксией ангиогенных факторов, таких как фактор роста эндотелия сосудов, для развития нового кровоснабжения [27, 28].

В условиях гипоксии в опухолевых клетках глубокие изменения претерпевают сигнальные пути, регулирующие метаболизм, энергетический обмен, пролиферацию, ангиогенез и клеточную гибель.

Выраженная адаптация к гипоксии канцерогенных клеток позволяет им не только выживать, активно расти и делиться, но и проявлять резистентность к терапии. В связи с этим сигнальные пути гипоксии и их мишени выступают в качестве многообещающих новых мишеней для терапевтических воздействий на канцерогенез [29, 30]. У онкологических больных гипоксия опухоли приводит к неблагоприятному прогнозу [31] из-за возможности повышения злокачественности, устойчивости как к химиотерапии, так и к лучевой терапии, а также повышенной вероятности метастазирования [31, 32]. Среди генов, активированных при гипоксии, значительный интерес представляют гены, участвующие в опухолевом ангиогенезе. В злокачественных клетках в состоянии кислородного голодания меняется метаболизм, включаются механизмы приспособления. В результате гипоксии активизируются гены семейства *HIF-1* (hypoxia-inducible factors). Эти гены, в свою очередь, могут запустить серию молекулярных aberrаций, в частности усиливается продукция фактора роста эндотелия сосудов [30–32].

Снижение активности таких генов тормозит рост опухоли. Однако гипоксия не только стимулирует образование сосудов в опухолях, но и влияет на взаимодействие между опухолевыми клетками, а также на их связь с внеклеточным матриксом. Так, установлено то, что гипоксия подавляет экспрессию Е-кадгерина в эндотелиальных клетках микрососудов. Потеря кадгерина, участвующего в межклеточных контактах, рассматривается как начальный этап в опухолевом прогрессировании. Нарушение межклеточного взаимодействия и потеря контактного торможения деления канцерогенных клеток играют также важную роль в их последующем метастазировании. Гипоксия опухоли ответственна за селективный отбор мутантных и канцерогенных генов [29–32].

Изучение роли железа за последние годы показало то, что белки, участвующие в метаболизме железа, могут быть многофункциональными и способствовать развитию злокачественных новообразований независимо от их основной роли в метаболизме железа. В то же время гипоксия опухолевой ткани, как уже говорилось, при анемии может ассоциироваться с резистентностью к химио- и лучевой терапии, стимуляцией генетических мутаций и ангиогенеза, которые затрудняют контроль опухолевого роста. В многочисленных исследованиях с помощью многофакторного анализа подтверждена связь низких показателей гемоглобина и/или гипоксии опухолевой ткани с ухудшением прогноза [33–35]. В ряде исследований авторы обнаружили повышенный уровень гепсидина в сыворотке крови у больных раком молочной железы, который ассоциировался с развитием анемического синдрома [3, 4, 36]. Снижение

уровня гепсидина в печени путем введения гепарина ограничивало онкогенные свойства опухолевых клеток молочной железы. Исследование доказало то, что повышенное содержание железа, костного морфогенетического белка 6 (BMP6) и ИЛ-6 совместно способствует синтезу печеночного гепсидина. Костные морфогенетические белки (BMPs – bone morphogenetic proteins) – группа факторов роста, иногда относимых к цитокинам, первоначально открыты благодаря их способности воздействовать на формирование кости и хряща. Сегодня известно то, что BMP – одна из основных групп морфогенетических сигнальных белков, которые организуют построение тканей в организме человека. Важность BMP иллюстрируется тем, что нарушения их работы связаны с многочисленными патологиями. Особенно часто нарушения регуляции сигнальной системы BMP встречаются у онкологических больных [37].

X.N. Shao и соавт. была проведена сравнительная оценка диагностической ценности гепсидина, BMP6 и ИЛ-6 при раке молочной железы и его метастазах в кости. Оказалось, что гепсидин имел более высокую диагностическую ценность как для рака молочной железы, так и для рака молочной железы с метастазами в кости, чем BMP6 и ИЛ-6. Авторы считают то, что гепсидин информативен в качестве потенциального прогностического маркера для наблюдения за пациентами с метастазами рака молочной железы в кости [15].

Ряд исследователей [15, 37, 38] придерживаются указанной позиции, что повышенное содержание железа, BMP6 и ИЛ-6 совместно способствует синтезу печеночного гепсидина. Экспрессия гепсидина была незначительно увеличена в опухолях молочной железы по сравнению с соседними нормальными тканями. Напротив, концентрация ферропортина была значительно снижена в опухолях молочной железы, особенно в злокачественных опухолях, по сравнению с нормальными тканями. Повышение концентрации ферропортина ингибировало пролиферацию клеток *in vitro* и *in vivo*, подавляя экспрессию гепсидина в злокачественных клетках. Кроме того, авторами было продемонстрировано то, что повышенный уровень ИЛ-6 совместно с гепсидином усиливает туморогенные эффекты железа за счет увеличения клеточного роста. Объединенные данные в целом расшифровали механизм, который изменил передачу сигналов оси «гепсидин – ферропортин» при раке молочной железы. Таким образом, нацеливание на передачу сигналов оси «гепсидин – ферропортин» может представлять собой многообещающий подход к терапии опухолей.

Модуляция гепсидина обещает обнадеживающие клинические перспективы. С момента открытия гепсидина в 2001 г. активно развивались стратегии,

направленные на коррекцию его избытка или дефицита, причем несколько препаратов уже проходили клинические испытания и многие другие находились на стадии доклинических исследований [39]. Были изучены нейтрализующие антитела к гепсидину [40], низкомолекулярные ингибиторы пути BMP/SMAD (small mothers against decapentaplegic) [41], технология siRNA и антисмысловых олигонуклеотидов [42], а также миметики гепсидина (мини-гепсидины) [43], которые подавляют или индуцируют экспрессию гепсидина.

Существует несколько механизмов воздействия на уровень гепсидина в сыворотке: ингибирование продукции гепсидина через BMP-путь (секвестрация BMP, ингибирование рецепторов BMP, ингибирование корецепторов BMP) и ингибирование сигналов ИЛ-6. BMP — мощные индукторы продукции гепсидина. Ингибиторы сигнальной системы BMP могут непосредственно секвестрировать внеклеточные BMP, предотвращать активацию рецептора BMP или ингибировать внутриклеточные SMAD-сигналы. Субстраты рецептора BMP I типа включают недавно идентифицированное семейство белков — белки SMAD, которые играют центральную роль в передаче сигналов BMP от рецептора к генам-мишеням в ядре [38]. Принимая во внимание важность передачи сигналов BMP/SMAD не только в связанной с железом регуляции экспрессии гепсидина, но и в экспрессии гепсидина, связанной с воспалением, в доклинических исследованиях изучалось влияние ингибиторов пути BMP — SMAD на прогрессирование заболевания [38].

Все эти подходы эффективно снижают продукцию гепсидина. В частности, ряд авторов полагают, что гепарин, являющийся гликозаминогликаном, способен непосредственно связываться с BMP [44, 45]. М. Poli и соавт. показали: коммерчески доступный гепарин ингибирует продукцию гепсидина в клетках гепатоцеллюлярной карциномы *in vitro*. Помимо того, гепарин эффективно снижает уровень гепсидина в печени в мышинной модели и в сыворотке крови у пациентов на 15–20 % [46]. Однако из-за антикоагулянтных свойств гепарина применение его ограничено. Тем не менее работы в этом направлении проводились [47].

Исследование гепарина в качестве антагониста гепсидина привело к созданию химически модифицированных gs-гепаринов (glycol-split), которые характеризуются сниженной антикоагулянтной способностью и сохраняют способность снижать продукцию гепсидина. Применение gs-гепаринов, снижающих продукцию гепсидина, продемонстрировало то, что циркулирующий гепсидин, секретируемый печенью, оказывает сильное влияние на ферропортин-опосредованный экспорт железа в опухолевых клетках, а дефицит гепсидина приводит к увеличению выхода

железа из опухолевых клеток с последующим подавлением роста опухоли [46, 47].

L. Borsig выявил новый ингибирующий эффект гепарина на прогрессирование рака молочной железы за счет подавления гепсидина, который, несомненно, вносит вклад в общие противоопухолевые эффекты, опосредованные гепарином; между тем раньше этот механизм не был признан [48].

Экспериментально доказана и роль эритроферона (ERFE — erythroferrone) в снижении высокого уровня гепсидина. ERFE является регулятором гомеостаза железа, управляемым EPO. ERFE опосредует подавление гормона гепсидина для увеличения абсорбции железа и мобилизации железа из запасов. ERFE — недавно обнаруженный гормон, высвобождаемый из эритробластов, который осуществляет регрессию гепсидина во время EPO. У мышей с дефицитом ERFE наблюдалась отсроченная частичная коррекция анемии, вызванная термически обработанной *Brucella abortus* [49]. Эти данные говорят о том, что введение ERFE может повышать сниженные показатели при анемиях, связанных с повышенным уровнем гепсидина. Фармацевтическая компания Silarus Therapeutics (США) продолжает дальнейшее развитие ERFE-направленной терапии для лечения нарушений метаболизма железа [49, 50]. Секретция ERFE ингибирует экспрессию гепсидина путем секвестрации нескольких членов семейства BMP для повышения доступности железа для EPO [50].

Как уже упоминалось, метаболизм железа контролируется гепсидином. Продукция гепсидина индуцируется воспалением и вызывает секвестрацию железа в клетках ретикулоэндотелиальной системы, подавляя EPO и снижая активность агентов, стимулирующих EPO. По этой причине нейтрализация гепсидина была предложена в качестве терапевтического лечения анемии. Авторами [51] представлена разработка препарата с использованием человеческих антител к гепсидину в качестве потенциального терапевтического средства для лечения анемии и других нарушений метаболизма железа. Антитело 12B9m было сочтено подходящим кандидатом для использования в качестве потенциального терапевтического средства для лечения анемии у пациентов с заболеванием почек или раком [51]. Впоследствии было доказано, что 12B9m увеличивает уровень железа в сыворотке, лечит EPO-рефрактерную анемию при совместном назначении EPO в мышинной модели. В этой модели лечение 12B9m увеличивало среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците, а при совместном лечении с EPO дополнительно увеличивались уровни гемоглобина и железа в сыворотке, число ретикулоцитов, средний объем эритроцитов [52].

Отдельный подход к коррекции нарушений, связанных с перегрузками железом из-за гепсидина,

заключается в нарушении функции гепсидина. Несколько фармацевтических компаний разрабатывали терапию, нацеленную непосредственно на гепсидин. Так, компания Pieris Pharmaceuticals Inc. (США) работала с PRS-080 — антикалином, направленным против гепсидина. Антикарины представляют собой небольшие лиганд-связывающие белки, основанные на липокалиновом каркасе. Антикарины имеют несколько потенциальных преимуществ перед антителами, которые были резюмированы выше. PRS-050 эффективно нейтрализовали активность гепсидина *in vitro* и в мышинной модели *in vivo* [53]. Другой антикалин, разработанный Pieris Pharmaceuticals Inc., хорошо переносился в ходе исследования 1-й фазы. Компанией Pieris Pharmaceuticals Inc. было инициировано испытание 2-й фазы у пациентов с хроническим заболеванием почек, страдающих от функциональной железодефицитной анемии [54].

В 2017 г. были доложены результаты 1-й фазы клинических испытаний применения препарата LY2787106 у пациентов, страдающих анемией, ассоциированной с раком. LY2787106 является полностью гуманизированным моноклональным антителом с высоким аффинностью к человеческому гепсидину. В 1-й фазе испытания оценивались безопасность, фармакокинетика, фармакодинамика и эффективность (воздействие на уровень железа в сыворотке, ретикулоциты и гемоглобин) этого препарата [55]. Кроме того, апробировались антитела против ИЛ-6. В настоящий момент установлено, что ИЛ-6 синтезируется как нормальными, так и опухолевыми клетками различного гистогенеза. Несколько исследований основаны на том, что оцениваемый ИЛ-6 связан со многими типами опухолей, такими как рак молочной железы, колоректальный рак, рак легких, рак яичников и лимфомы [2–4]. Ряд авторов [2–4, 56] считают, что показатели ИЛ-6 коррелируют с агрессивным ростом опухоли и ответом на терапию при многих типах рака. Показана возможность использования ИЛ-6 в качестве маркера агрессивности клинического течения рака яичников. ИЛ-6 может способствовать канцерогенезу через несколько механизмов, включая подавление апоптоза, выживание, пролиферацию, ангиогенез, инвазивность, метастазирование и метаболизм опухолевых клеток. Во время воспаления молекулы ИЛ-6, передавая сигнал через JAK2 и STAT3, стимулируют продукцию гепсидина. Сигнальный путь JAK — STAT представляет собой цепочку взаимодействий между белками в клетке и участвует в таких процессах, как иммунитет, деление клеток, гибель клеток и образование опухоли. Этот путь передает информацию от химических сигналов вне клетки к клеточному ядру, что приводит к активации генов посредством транскрипции [56].

Терапия, направленная на ИЛ-6, показала эффективность в снижении уровня гепсидина и коррекции анемии. Так, препарат siltuximab (Sylvant™) — химерное моноклональное антитело, направленное против ИЛ-6 и одобренное управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA — Food and Drug Administration) для использования при мультицентрической болезни Кастлемана (multicentric Castleman disease). В ретроспективном анализе клинического испытания 1-й фазы siltuximab снижает уровень гепсидина в сыворотке крови у 97 % пациентов со множественной миеломой или болезнью Кастлемана [57]. Полученные данные подтверждают возможность использования siltuximab (Sylvant™) для лечения анемии хронического воспаления.

Другой препарат — tocilizumab (Actemra®) — представляет собой гуманизированное антитело к рецептору ИЛ-6, одобренное FDA для использования при ревматоидном и ювенильном идиопатическом артрите. Было показано то, что tocilizumab снижает уровень гепсидина в сыворотке у пациентов с болезнью Кастлемана. В клинических исследованиях tocilizumab предотвращал индуцированную ИЛ-6 экспрессию гепсидина в клетках гепатомы *in vitro* и уменьшал у пациентов уровень гепсидина в сыворотке [57].

Еще одна возможность нацелиться на избыток железа в опухолевых клетках заключается в индукции ферроптоза — железозависимой и управляемой перекисным окислением формы гибели клеток. В ряде работ продемонстрировано, что этот тип гибели клеток осуществляется через супрессор опухоли p53, что предполагает естественную противоопухолевую роль ферроптоза [58, 59].

Примечательно, что особенно резистентные к терапии и толерантные к лекарствам опухолевые клетки склонны к ферроптозу [60, 61]. Так, можно предположить то, что индукторы ферроптоза появятся как новые и довольно избирательные противораковые препараты.

Заключение

Таким образом, в настоящее время широко признано то, что гомеостаз железа нарушается при многих видах рака. Действительно, несколько белков гомеостаза, в частности гепсидин и ферропортин, могут быть ответственны за инициацию, пролиферацию и метастатическое распространение опухолей. Большое количество исследований продемонстрировало потенциальную клиническую ценность использования этих белков в качестве прогностических биомаркеров злокачественности и ответа на противораковое лечение. Кроме того, железо, присутствующее в раковых клетках, и важность железа

в сигнальных путях гибели клеток ферроптоза побуждали к разработке терапевтических стратегий против поздних стадий или резистентного рака. В числе наиболее перспективных будущих направлений для применения модуляторов гепсидина может быть терапия онкологических заболеваний. Хотя роль гепсидина в стимуляции роста раковых клеток все еще изучает-

ся, известен тот факт, что уровень гепсидина значительно повышен при ряде онкологических заболеваний. Использование антагонистов гепсидина для снижения деградации ферропортина в опухолевых клетках увеличивает отток железа и потенциально уменьшает рост опухоли, что, возможно, является новым направлением применения модуляторов гепсидина.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mutlu T., Ozoran E., Trabulus D.C. et al. Expression of genes related to iron homeostasis in breast cancer. *Mol Biol Rep* 2023;50:5157–63. DOI: 10.1007/s11033-023-08433-1
- Pourali L., Taghizadeh A., Akhoundi M.R. et al. Frequency of Chemotherapy Induced Anemia in Breast Cancer Patients. *Int J Cancer Manag* 2017;10(1):e4672. DOI: 10.17795/ijcp-4672
- Aapro M., Beguin Y., Bokemeyer C. et al. Management of anaemia and iron deficiency in patients with cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2018; 29(Suppl 4):iv96–iv110. DOI: 10.1093/annonc/mdx758
- Jung M., Mertens C., Tomat E., Brüne B. Iron as a central player and promising target in cancer progression. *Int J Mol Sci* 2019;20(2):273. DOI: 10.3390/ijms20020273
- Madeddu C., Neri M., Sanna E. et al. Experimental drugs for chemotherapy- and cancer-related anemia. *J Pharm and Exper* 2021;13:593–611. DOI: 0.2147/JEPS262349
- Блиндарь В.Н., Хагажеева М.Н., Давыдова Т.В. и др. Диагностика и лечение анемического синдрома у больных раком молочной железы на фоне неoadъювантной химиотерапии. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(2):42–52. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-2-42-52
- Блиндарь В.Н., Добровольская М.М., Хагажеева М.Н. и др. Роль интерлейкина-6 и гепсидина-25 в патогенезе анемического синдрома, ассоциированного со злокачественными новообразованиями у онкологических больных раком молочной железы до неoadъювантной химиотерапии. *Клиническая лабораторная диагностика* 2021;66(3):147–53. DOI:10.51620/0869-2084-2021-66-3-147-153
- Blindar V.N., Dobrovolskaya M.M., Khagazheeva M.N. et al. The role of interleukin-6 and hepcidin-25 in the pathogenesis of anemic syndrome associated with malignant neoplasms in cancer patients with breast cancer before neoadjuvant chemotherapy. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics* 2021; 66(3):147–53. (In Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-3-147-153
- Nemeth E., Ganz T. Hepcidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. *Int J Mol Sci* 2021;22(12):6493. DOI: 10.3390/ijms22126493
- Charostad J., Azaran A., Nakhaei M. et al. Upregulation of interleukin-6 in HPV-positive breast cancer patients. *Iran J Immunol* 2021;18(4):315–30. DOI: 10.22034/IJI.2021.89107.1930
- Juli n-Serrano S., Yuan F., Wheeler W. et al. Hepcidin-regulating iron metabolism genes and pancreatic ductal adenocarcinoma: a pathway analysis of genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr* 2021;114(4):1408–17. DOI: org/10.1093/ajcn/nqab217
- Nitrisselli C.M., De Bortoli M., Taverna E. et al. Plasma hepcidin in early-stage breast cancer patients: no relationship with interleukin-6, erythropoietin and erythroferrone. *Exp Rev Prot* 2015;12(6):695–701. DOI: 10.1586/14789450.2015.1099436
- Tesfay L., Clausen K.A., Kim J.W. et al. Hepcidin regulation in prostate and its disruption in prostate cancer. *Cancer Res* 2015;75(11):2254–63. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2465
- Lu Ye, Cheng X., Li R. et al. The expression and clinical significance of ferroportin and hepcidin in breast cancer patients. *The Journal of the Kuwait Medical Association* 2016;48(4): 323–7.
- Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В. и др. Разработка стратегических подходов к современной диагностике анемического синдрома у больных раком молочной железы. *Клиническая лабораторная диагностика* 2019;64(4):210–5. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-4-210-215
- Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V. et al. The development of the strategic approaches to modern diagnosis of anemic syndrome in patients with breast cancer. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics* 2019;64(4):210–5. (In Russ.). DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-4-210-215
- Shao X.N., Cao F., Tao M. the clinical value of hepcidin in breast cancer and its bone metastasis. *Ann Clin Lab Sci* 2017;47(2):120–8.
- Andrews N.C. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. *J Clin Invest* 2004;113(9):1251–3.
- De Bortoli M., Taverna E., Varinelli L. et al. Plasma hepcidin in early-stage breast cancer patients: no relationship with interleukin-6, erythropoietin and erythroferrone. *Expert Rev Proteom* 2015;12(6):695–701. DOI: 10.1586/14789450.2015.1099436
- Блиндарь В.Н., Зубрихина Г.Н., Давыдова Т.В. и др. Особенности метаболизма железа у больных раком молочной железы до адъювантной химиотерапии. *Российский биотерапевтический журнал* 2022;21(1):33–41. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-1-33-41
- Blindar V.N., Zubrikhina G.N., Davydova T.V. et al. Features of iron metabolism in breast cancer patients before adjuvant chemotherapy. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21 (1):33–41. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-1-33-41
- Marques O., Porto G., Rêma A. et al. Local iron homeostasis in the breast ductal carcinoma microenvironment. *BMC Cancer* 2016;16:187. DOI: 10.1186/s12885-016-2228-y
- Добровольская М.М., Зубрихина Г.Н., Блиндарь В.Н., Сытов А.В. Окислительный стресс и эндогенная интоксикация у онкологических больных. *Клиническая лабораторная диагностика* 2021;66(7):401–6. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-401-406
- Dobrovolskaya M.M. Zubrikhina G.N., Blindar V.N., Sytov A.V. Oxidative stress and endogenous intoxication in cancer patients. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics* 2021;66(7):401–6. (In Russ.). DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-7-401-406

21. Demir H., Beipinar J., Urvay S. et al. Prognostic role of pre-operative serum ferritin level in stage 2 colon cancer. *Eur Rev Med and Pharmac Sci* 2021;25(21):6473–9. DOI: 10.26355/eurrev_202111_27091
22. Zhang S.P., Chen Y., Guo W.L. et al. Disordered hepcidin-ferroportin signaling promotes breast cancer growth. *Cell Sign* 2014;26(11):2539–50. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.07.029
23. Wang J., Liu W., Lee J.K. Hepcidin downregulation correlates with disease aggressiveness and immune infiltration in liver cancer. *Front Oncol* 2021;11:714756.
24. Manz D.H., Blanchette N.L., Paul B.T. et al. Iron and cancer: recent insights. *Ann NY Acad Sci* 2016;1368(1):149–61. DOI: /10.1111/nyas.13008
25. Sornjai W., Nguyen V., Long F. et al. Iron and hepcidin mediate human colorectal cancer cell growth. *Chem Biol Interact* 2020;319:109021. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109021
26. Torti S.V., Torti F.M. Iron and Cancer: Vision 2020. *Cancer Res* 2020;80(24):5435–48. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2017
27. Al Tameemi W., Dale T.P., Al-Jumaily R.M.Kh. et al. Hypoxia-modified cancer cell metabolism. *Front Cell and Devel Biol* 2019;7:4. DOI: 10.3389/fcell.2019.00004
28. Неведова Н.А., Харлова О.А., Данилова Н.В. и др. Маркеры ангиогенеза при опухолевом росте. *Архив патологии* 2016;78(2):55–63. DOI: 10.17116/patol201678255-62
Nefedova N.A., Kharlova O.A., Danilova N.V. et al. Markers of angiogenesis in tumor growth. *Arxiv patologii = Archive of Pathology* 2016;78(2):55–63. (In Russ.). DOI: org/10.17116/patol201678255-62
29. Васильев А.Г. Неоангиогенез и опухолевый рост. *Российские биомедицинские исследования*. 2017;2(4):4–10.
Vasiliev A.G. Neoangiogenesis and tumor growth. *Rossiiskie biomedicinskie issledovaniya = Russian Biomedical Research* 2017;2(4):4–10. (In Russ.).
30. Liu Z., Wu Z., Fan Y., Fang Y. An overview of biological research on hypoxia-inducible factors (HIFs). *Endokrynol Pol* 2020;71(5):432–40. DOI: 10.5603/EPa2020.0064
31. Huang G., Yan J., Xu C. et al. The crosstalk between HIFs and mitochondrial dysfunctions in cancer development. *Cell Death Dis* 2021;12(2):215. DOI: 10.1038/s41419-021-03505-1
32. Асташкин Е.И. Влияние гипоксии на жизнедеятельность опухолевых клеток и его коррекция химическими агентами и лекарствами. *Фарматека* 2016;9:20–7.
Astashkin E.I. Effect of hypoxia on the life of tumor cells and its correlation by chemical agents and drugs. *Farmateka* 2016;9: 20–7. (In Russ.).
33. Forciniti S., Greco L., Grizzi F. et al. Iron metabolism in cancer progression. *Int J Mol Sci* 2020;21(6):2257. DOI: 10.3390/ijms21062257
34. Pasricha S.R., McHugh C., Draksmith H. Hepcidin regulation by erythropoiesis: the current history. *Annu Rev Nutr* 2016;36: 417–34. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071715-050731
35. Vela D., Vela-Gaxha Z. Differential regulation of hepcidin in cancer and non-cancer tissues and its clinical implications. *Exp Mol Med* 2018;50(2):e436. DOI: 10.1038/emmm.2017.273
36. Durigova A., Lamy P.J., Thezenas S. et al. Anemia and iron biomarkers in patients with early breast cancer. Diagnostic value of hepcidin and soluble transferrin receptor quantification. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(9):1833–41. DOI: 10.1515/cclm-2013-0031
37. Serrano S.J., Yuan F.C., Wheeler W. et al. Hepcidin-regulating iron metabolism genes and pancreatic ductal adenocarcinoma: A pathway analysis of genome-wide association studies. *Am J Clin Nutr* 2021;114(4):1408–17. DOI: org/10.1093/ajcn/nqab2171
38. Xiao X., Alfaro-Magallanes V.M., Babitt J.L. Bone morphogenic proteins in iron homeostasis. *Bone* 2020;138:115495. DOI: 10.1016/j.bone.2020.115495
39. Park C.H., Valore E.V., Waring A.J. et al. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* 2001;276(11):7806–10. DOI: 10.1074/jbc.M008922200
40. Sasu B.J., Cooke K.S., Arvedson T.L. et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010;115: 3616–24. DOI: 10.1182/blood-2009-09-245977
41. Steinbicke U., Sachidanandan C., Vonner A.J. et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood* 2011;117:4915–23. DOI: 10.1182/blood-2010-10-313064
42. Guo S., Casu C., Gardenghi S. et al. Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice. *J Clin Invest* 2013;123:1531–41. DOI: 10.1172/JCI166969
43. Ramos E., Ruchala P., Goodnough J.B. et al. Minihepcidins prevent iron overload in a hepcidin-deficient mouse model of severe hemochromatosis. *Blood* 2012;120:3829–36. DOI: 10.1182/blood-2012-07-440743
44. Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J. et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 1988; 242(4885):1528–34. DOI: 10.1126/science.3201241
45. Rider C.C. Heparin/heparan sulphate binding in the TGF- β cytokine superfamily. *Biochem Soc Trans* 2006;34(Pt 3):458–60. DOI: 10.1042/BST0340458
46. Poli M., Girelli D., Campostrini N. et al. Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2011;117(3):997–1004. DOI: 10.1182/blood-2010-06-289082
47. Ritchie J.P., Ramani V.C., Ren Y. et al. SST0001, a chemically modified heparin, inhibits myeloma growth and angiogenesis via disruption of the heparanase/syndecan-1 axis. *Clin Cancer Res* 2011;17(6):1382–93. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2476
48. Borsig L. Heparin as an indicator of cancer progression. *Mol Biol Transl Sci* 2010;93:335–49. DOI 10.1016/C1877-1173(10)93014-7
49. Kautz L., Jung G., Nemeth E., Ganz T. Erythroferone contributes to recovery from anemia of inflammation. *Blood* 2014;124(16):2569–74. DOI: 10.1182/blood-2014-06-584607
50. Castro-Mollo M., Gera S., Ruiz-Martinez M. et al. The hepcidin regulator erythroferone is a new member of the erythropoiesis-iron-bone circuitry. *Elife* 2021;10:e68217. DOI: 10.7554/eLife.68217
51. Witcher D.R., Leung D., Hill K.A., De Rosa D.C. LY2928057, an antibody targeting ferroportin, is a potent inhibitor of hepcidin activity and increases iron mobilization in normal cynomolgus monkeys. *Blood* 2013;122(21):3433. DOI: 10.1182/blood.V122.21.3433.3433
52. Ross S., Biswas K., Rottman J. et al. Identification of antibody and small molecule antagonists of ferroportin-hepcidin interaction. *Biol Front Pharm* 2017;8:838. DOI: 10.3389/fphar.2017.00838
53. Mross K., Richly H., Fischer R. et al. First-in-human phase I study of PRS-050 (Angiocal), an Anticalin targeting and antagonizing VEGF-A, in patients with advanced solid tumors. *PLoS One* 2013;8(12):e83232. DOI: 10.1371/journal.pone.0083232
54. Vyoral D., Petrak J. Therapeutic potential of hepcidin – the master regulator of iron metabolism. *Pharmacological research* 2017;115:242–54. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.11.010
55. Ren F., Li J., Wang Y. et al. The effects of angelica sinensis polysaccharide on tumor growth and iron metabolism by regulating hepcidin in tumor-bearing mice. *Cell Physiol Biochem* 2018;47(3):1084–94. DOI: 10.1159/000490185
56. Shevra C.R., Singh Sh., Singh N. et al. Interleukin-6 and interleukin-4 levels in multiple myeloma and correlation of interleukin-6 with β 2 microglobulin and serum creatinine. *Clin Cancer Invest* 2015;4:211–5. DOI: 10.4103/2278-0513.148963
57. Song S.N., Iwahashi M., Tomosugi N. et al. Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF- α inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 2013;15(5):141. DOI: 10.1186/ar4323

58. Jiang L., Kon N., Li T. et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumor suppression. *Nature* 2015;520(7545):57–62. DOI: 10.1038/nature14344
59. Gnanapradeepan K., Basu S., Barnoud T. et al. Tumor suppressor p53 in the control of metabolism and ferroptosis. *Front Endocrinol* 2018;9:124. DOI: 10.3389/fendo.2018.00124
60. Hassania B., Vandenabil P., Vanden Berge T. Targeting ferroptosis to eliminate cancer. *Cancer cell* 2019;35(6):830–49. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.04.002
61. Rodriguez R., Schreiber S.L., Conrad M. Persistent cancer cells: iron dependence and vulnerability to ferroptosis. *Mol Cell* 2022;82(4):728–40. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.001

Вклад авторов

В.Н. Блиндарь, М.М. Добровольская: разработка дизайна исследования, анализ публикаций по теме статьи, написание текста статьи;
Г.Н. Зубрихина, Т.В. Давыдова: критический пересмотр статьи с внесением ценного интеллектуального содержания

Author's contributions

V.N. Blindar, M.M. Dobrovolskaya: development of research design, analysis of publications on the topic of the article, writing the text of the article;
G.N. Zubrikhina, T.V. Davydova: critical revision of the article with the introduction of valuable intellectual content

ORCID авторов / ORCID of authors

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

Г.Н. Зубрихина / G.N. Zubrikhina: <https://orcid.org/0000-0002-5854-9755>

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

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

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: 07.11.2022. Принята к публикации: 24.07.2023

Article received: 07.11.2022. Accepted for publication: 24.07.2023

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-19-27>

Уровни антител к маннозе у больных раком желудка (обзор литературы и клинико-экспериментальное исследование)

М.П. Никулин¹, Н.В. Шилова², А.Д. Липатников², А.В. Семьянихина¹, И.С. Стилиди¹,
Н.В. Бовин², Н.Н. Тупицын¹

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

²ГНЦ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН; Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Контакты: Максим Петрович Никулин maximetrovich@mail.ru

Введение. Гликаны играют важную роль в патогенезе злокачественных новообразований, в том числе при раке желудка. В последние годы внимание многих исследователей привлечено к маннозе (Man) – гексозе, которая является неперенным компонентом всех N-цепей гликопротеинов, участвующих как в нормальных физиологических, так и в патологических процессах.

Цель исследования – изучение роли факторов врожденного иммунитета и способов воздействия на них посредством маннозы и маннозосодержащих гликанов у больных раком желудка.

Материалы и методы. Представлены данные источников литературы с 2006 г. о роли маннозы – одного из ключевых моносахаридов при формировании N-цепей гликопротеинов – и связывающих ее рецепторов (маннозный рецептор, маннозосвязывающий лектин, антитела) при раке желудка. Исследования антигликановых антител в образцах сыворотки крови 235 больных раком желудка и 76 условно здоровых доноров выполнены с помощью гликоципа.

Результаты. Показано, что уровень антител IgM-класса к Man β – коровой части N-гликанов – у больных раком желудка достоверно ниже по сравнению с донорской группой независимо от возраста ($p = 0,0001$). Для оценки влияния возраста на уровни антигликановых антител больные были разделены на 2 подгруппы – моложе и старше 45 лет. В группе моложе 45 лет достоверные различия по уровням антигликановых антител к Man сохранялись, в то время как достоверных различий по уровням антигликановых антител к Man β 1-4GlcNAc β не наблюдали. При сравнении групп больных и доноров старше 45 лет уровни антител к Man β и Man β 1-4GlcNAc β были достоверно выше только у доноров.

Заключение. Дефицит гуморального иммунитета может быть одним из ключевых звеньев инициации или прогрессии канцерогенеза у человека. В нашей работе у больных раком желудка мы выявили дефицит антигликановых антител к Man β и к Man β 1-4GlcNAc β – коровым фрагментам N-цепей гликопротеинов, причем с возрастом дефицит нарастал. Представленные результаты – многообещающая платформа для дальнейших исследований, направленных не только на изучение роли антиманнозных антител, но и на разработку подходов к иммунопрофилактике.

Ключевые слова: рак желудка, манноза, антигликановые антитела, N-цепи, IgM

Для цитирования: Никулин М.П., Шилова Н.В., Липатников А.Д. и др. Уровни антител к маннозе у больных раком желудка (обзор литературы и клинико-экспериментальное исследование). Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):19–27. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-19-27

Mannose antibody levels in gastric cancer patients (literature review and clinical and experimental study)

Maxim P. Nikulin¹, Nadya V. Shilova², Alexander D. Lipatnikov², Alexandra V. Semyanikhina¹, Ivan S. Stilidi¹,
Nicolai V. Bovin², Nicolai N. Tupitsyn¹

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

²Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, 16/10 Miklukho-Maclay St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Maxim Petrovich Nikulin maximpetrovich@mail.ru

Introduction. Glycans play an important role in the pathogenesis of malignant neoplasms, including stomach cancer. In recent years, the attention of many researchers has been drawn to mannose (Man) – hexose, which is an indispensable component of all N-chains of glycoproteins involved in both normal physiological and pathological processes.

Aim. To investigate the role of innate immunity factors and ways to influence them through mannose and mannose-containing glycans in gastric cancer patients.

Materials and methods. Data on the role of mannose – one of the key monosaccharides in the formation of glycoprotein N-chains – and its binding receptors (mannose receptor, mannose-binding lectin, antibodies) in gastric cancer since 2006 are presented. Levels of anti-glycan antibodies in blood serum samples of 235 gastric cancer patients and 76 healthy donors were evaluated using a glycochip.

Results. It has been shown that the level of IgM-class antibodies to Man β – the core part of N-glycans – in gastric cancer patients is significantly lower compared to the donor group, regardless of age ($p = 0.0001$). To assess the effect of age on the levels of antiglycan antibodies, patients were divided into two subgroups – before and after 45 years. In the group under 45 years of age, significant differences in the levels of antiglycan antibodies to Man β persisted, while significant differences in the levels of antiglycan antibodies to Man β 1-4GlcNAc β were not observed. When comparing groups of patients and donors older than 45 years, the levels of antibodies to Man β and Man β 1-4GlcNAc β were significantly higher only in donors.

Conclusion. Deficiency of humoral immunity may be one of the key factors in the initiation and progression of carcinogenesis in humans. In our work, in patients with stomach cancer, we revealed a deficiency of antiglycan antibodies to Man β and to Man β 1-4GlcNAc β – core fragments of N-chains of glycoproteins, and the deficiency increased with age. The results of the study are a promising platform for further research aimed not only at studying the role of anti-mannose antibodies, but also at developing approaches to adoptive immunoprophylaxis.

Keywords: gastric cancer, mannose, anti-glycan antibodies, N-chains, IgM

For citation: Nikulin M.P., Shilova N.V., Lipatnikov A.D. et al. Mannose antibody levels in gastric cancer patients. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):19–27. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-19-27

Введение

Рак желудка (РЖ) остается одним из самых распространенных смертоносных заболеваний. Ежегодно в мире раком желудка заболевает около 1 млн и умирает почти 800 тыс. человек [1]. Хирургическое лечение РЖ достигло своего предела. Успехи иммунологии и выявление молекул эпидермального фактора роста (EGFR) на клетках РЖ позволили улучшить результаты лечения, однако метастатическая форма заболевания по-прежнему неизлечима.

Злокачественная трансформация нормальной слизистой желудка – сложный процесс, в котором определенную роль играет инфекция *Helicobacter pylori*. Нормальная слизистая желудка покрыта длинными углеводными цепями, которые терминируются в том числе молекулами, определяющими группы крови системы Льюиса. Адгезия *H. pylori* к этим группоспецифическим антигенам приводит к развитию хронического воспаления, которое сопровождается укорочением гликанов, а также появлением сиализированной формы (SLeA) наряду с «нормальным» антигеном LeA. Также процесс канцерогенеза сопровождается гиперэкспрессией муциновых опухлеассоциированных антигенов Tn и STn, которые играют ключевую роль в повышенной мобильности и инвазии опухлевых клеток [2]. Структурный мотив GalNAc является

неотъемлемым участком всех нормальных муцинов человека, как антиген он спрятан глубоко внутри углеводных цепей, однако в процессе онкотрансформации демаскируется и приобретает злокачественный потенциал вследствие укорочения углеводных цепей. Подобный неполный синтез, а также неосинтез – ключевые механизмы онкотрансформации [3]. Неполный синтез гликанов с укорочением углеводных цепей и появлением опухлеассоциированных антигенов (как, например, упомянутые выше STn и Tn) чаще встречается на ранних стадиях рака, неосинтез (например, SLeA) – на поздних стадиях [4]. Гликаны способны изменять конформацию белков, усиливать адгезию опухлевых клеток, повреждать передачу сигнала внутрь клеток, изменять транспорт гормонов, белков внутри клеток, участвовать в ангиогенезе [5]. Исследования, посвященные опухлеассоциированным гликанам, их биосинтезу и рецепторам, привлекают внимание клиницистов с позиции поиска как маркеров злокачественной трансформации, так и потенциальных мишеней для терапии [3].

В последние годы внимание многих исследователей привлечено к маннозе (Man) – гексозе, которая является непременным компонентом всех N-цепей гликопротеинов, участвующих как в нормальных физиологических, так и в патологических процессах.

Man в составе олигосахаридных цепей распознается маннозным рецептором (MR), экспрессированным на дендритных клетках и макрофагах, позволяя им распознавать маннозосодержащие гликополимеры [6], а также мембранонесвязанным маннозосвязывающим лектином (MBL) — компонентом системы врожденного иммунитета, относящимся к семейству коллектинов (суперсемейства лектинов C-типа) [7]. В данной работе речь пойдет о роли свободной маннозы и о ее рецепторах, в том числе антителах крови человека, при раке желудка.

Роль маннозы и маннозосодержащих гликанов в прогрессировании рака желудка

В 2018 г. в журнале *Nature* вышла статья об эффективности использования свободной D-маннозы в подавлении роста злокачественных клеток *in vivo* и *in vitro* [8]. Мыши, получавшие доксорубин интраперитонеально и маннозу *per os*, демонстрировали лучшую выживаемость по сравнению с животными, которых лечили только доксорубином или маннозой. Авторы предположили, что Man транспортируется в клетку с помощью тех же механизмов, что и глюкоза, но нарушает ее (глюкозы) метаболизм внутри клетки, что снижает экспрессию белков семейства Bcl-2, приводя к гибели опухолевых клеток. Кроме того, авторы показали, что чувствительность к Man зависит от уровня фермента фосфоманноизомеразы (PMI). Клетки с низким уровнем PMI чувствительны к маннозе, с высоким уровнем — резистентны к введению этого моносахарида; при этом резистентность можно снизить подавлением функции указанного фермента. Эффекта от добавления других моносахаридов, таких как галактоза, фруктоза, фукоза и глюкоза, не наблюдали.

Аденокарцинома пищевода чаще всего развивается в нижней трети пищевода на фоне гастроэзофагеальной рефлюксной болезни и по своим биологическим свойствам напоминает аденокарциному желудка. Основываясь на своих предыдущих работах, D. Gu и соавт. [9] провели углубленное изучение содержания свободной (не входящей в состав сложных гликанов) D-маннозы, L-пролина и 3-гидроксипирата (BHBA) в сыворотке крови 159 больных аденокарциномой пищевода методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Ранее при исследовании сыворотки крови 30 больных раком пищевода и 30 контрольных случаев авторы выявили повышение уровней указанных метаболитов. Большинство пациентов были мужчинами (91,2 %) и курильщиками (74,8 %). Неoadъювантную химиолучевую терапию получили 112 (70,4 %) пациентов. Больные с высоким уровнем D-маннозы в сыворотке крови демонстрировали пониженный риск смерти по сравнению с пациентами с низким уровнем

(отношение рисков (OR) 0,44; 95 % доверительный интервал (ДИ): 0,25–0,77, $p < 0,01$). В этих группах 5-летняя выживаемость составила 66,4 % и 44,6 % соответственно. Медиана общей выживаемости (ОВ) была значительно более длительной — больше 123,4 мес — в группе больных с высоким содержанием маннозы по сравнению с пациентами с низким уровнем маннозы — 36,9 мес ($p = 0,01$). При анализе безрецидивной выживаемости (БРВ) наблюдали схожую тенденцию: риск рецидива был в 2 раза ниже у пациентов с высоким уровнем содержания D-маннозы в крови (OR 0,51; 95 % ДИ 0,29–0,91, $p = 0,02$), 5-летняя БРВ составила 69,8 и 46,6 % соответственно, а медиана БРВ — более 123,4 мес против 32,9 мес ($p < 0,01$). Кроме того, авторы провели анализ ОВ в зависимости от стадий и индекса массы тела (ИМТ). Положительное влияние повышенного содержания маннозы на прогноз сохранялось в зависимости от стадии (ранние/поздние): OR 0,40; 95 % ДИ 0,16–0,98, $p = 0,05$ для ранних стадий и OR 0,45; 95 % ДИ 0,21–0,92, $p = 0,03$ для поздних стадий. У пациентов с ИМТ < 30 повышенное содержание уровня D-маннозы ассоциировалось с лучшей выживаемостью (OR 0,46; 95 % ДИ 0,22–0,93, $p = 0,03$), в то время как в группе с ИМТ ≥ 30 такой ассоциации не было.

Интересно, что ранее авторы сообщали о повышенном содержании D-маннозы при раке пищевода по сравнению со здоровыми донорами и у пациентов с поздними стадиями [10]. Авторы пытались объяснить этот факт тем, что LC-MS, с помощью которой определяли маннозу, выявляет как свободный моносахарид, так и связанный с MBL. Поскольку низкий уровень MBL ассоциировался ранее с низкой выживаемостью у онкологических пациентов [11], авторы предлагают провести исследования по определению свободной маннозы и MBL при раке пищевода и других опухолях.

Несколько исследований было посвящено изучению влияния маннозы на опухолевые клетки *in vitro* и *in vivo*. В работе J. Sha и соавт. [12] клетки аденокарциномы легкого инкубировали с маннозой, карбоплатином и маннозой + карбоплатином. Установлено, что манноза достоверно ингибирует пролиферацию клеток A549, потенцирует противоопухолевый эффект карбоплатина и усиливает апоптоз опухолевых клеток.

В качестве примера комбинированного применения химиопрепаратов и маннозы можно привести исследование Z. Fan и соавт. [13] по использованию конъюгатных наночастиц метотрексат-маннозы (MTX-Man NPs). Авторы полагают, что такая молекула должна легко распознаваться опухолевой клеткой *in vitro* и *in vivo*. Было продемонстрировано, что MTX-Man NPs лучше накапливаются в опухолевой ткани и усиливают эффекты друг друга [13].

Известно также, что конъюгаты маннозы с фоточувствительными молекулами использовали в качестве фотосенсибилизатора для воздействия на клеточную линию рака молочной железы [14], а также рака предстательной железы [15].

Маннозосвязывающие рецепторы и их роль при раке желудка

Макрофагальный маннозный рецептор. MR играет важную роль во врожденном и приобретенном иммунитете [16]. Внеклеточная часть этого рецептора состоит из нескольких доменов: CR-домена, связывающего сульфатированные углеводы, и 8 лектиновых повторов С-типа, лигандами которого являются в первую очередь (хотя и не только) манно-гликоконъюгаты [17].

В исследовании D. Liu и соавт. [18] изучали экспрессию MR в опухоли желудка и прилегающей нормальной слизистой у 120 пациентов с РЖ иммуногистохимическим методом. Была продемонстрирована сильная реакция в ядрах и цитоплазме опухолевых клеток и слабая или негативная реакция в окружающей слизистой желудка. Пациенты были разделены на 2 группы: со слабой и сильной экспрессией MR. Экспрессию MR на клетках РЖ наблюдали у 45,8 % ($n = 54$) пациентов, его экспрессию в окружающей ткани – у 20,0 % ($n = 36$) пациентов ($p = 0,012$). Для подтверждения этих результатов сравнили уровни микроРНК, ответственной за экспрессию MR, в 30 случаях РЖ и в окружающей слизистой: 19 из 30 случаев РЖ продемонстрировали 2-кратное превышение экспрессии этой микроРНК в опухоли при максимальном превышении в 14,7 раза. Анализ БРВ и ОВ показал, что у пациентов с выраженной экспрессией MR в опухоли результаты были значительно хуже по сравнению с пациентами со слабой экспрессией ($p = 0,001$ и $p = 0,003$ соответственно). В однофакторном анализе нарастание экспрессии MR прямо коррелировало с размером опухоли, стадией, наличием регионарных метастазов. Не было связи с полом, возрастом, локализацией, классификацией по Лаурену (Lauren), отдаленными метастазами, лимфоваскулярной инвазией. В многофакторном анализе на БРВ влияли стадия, статус лимфатических узлов и экспрессия MR, на ОВ – статус лимфатических узлов и экспрессия MR. Авторы подчеркивают, что экспрессия MR в обычной слизистой остается неясной, однако может отражать предраковые изменения.

S.S. Liu и соавт. [19] изучали экспрессию маннозосодержащих гликанов и макрофагального MR на клетках РЖ и макрофагах в опухоли на парафиновых блоках с помощью иммуногистохимического анализа. Непораженная слизистая желудка служила в качестве контроля. Гликаны выявляли с помощью лек-

тина *Narcissus pseudonarcissus* (NPL), а маннозный рецептор – антителом к CD206. Установлено, что количество NPL-позитивных и MR-позитивных макрофагов достоверно больше в опухоли, чем в нормальной прилегающей слизистой. Экспрессия маннозосодержащих гликанов также достоверно превалировала в опухолевой ткани. Была выявлена слабая отрицательная корреляция между уровнем экспрессии и гликанов, и рецептора на макрофагах в опухоли ($r = -0,363$, $p = 0,009$). Повышенное количество NPL-позитивных макрофагов в опухоли явилось достоверным благоприятным фактором отдаленной выживаемости, а повышенное количество MR-позитивных макрофагов – неблагоприятным. Интересно отметить, что определялось лучшее проникновение NPL-позитивных макрофагов внутрь опухоли, чем MR-позитивных макрофагов. В многофакторном анализе пораженные лимфатические узлы ($p = 0,004$) и избыточное количество MR-позитивных макрофагов ($p = 0,033$) в опухоли явились негативными факторами прогноза ОВ. В то же время уровень экспрессии маннозосодержащих гликанов на клетках РЖ не влиял на ОВ.

D. Ding и соавт. [20] измеряли концентрацию растворимого маннозного рецептора (sMR) и растворимого скавенджер-рецептора (sCD163) в сыворотке крови 143 больных РЖ, 66 пациентов с доброкачественными заболеваниями желудка и 59 здоровых доноров. Уровни указанных белков были достоверно выше у больных РЖ в сравнении с контрольной группой ($p < 0,0001$). Высокие предоперационные уровни sMR и sCD163 достоверно коррелировали с худшим прогнозом, наличием регионарных и отдаленных метастазов, а также с уровнями опухолевых маркеров CEA, CA199, CA72–4, CA125. Авторы подчеркивают, что причины полученных результатов не совсем понятны, но они могут отражать слушивание рецепторов с поверхности активных макрофагов и попадание их в кровоток. Похожие результаты по повышению sMR и sCD163 авторы получили, изучив данные 163 больных колоректальным раком, при этом маркеры определяли не только в крови, но и на парафиновых срезах опухоли иммуногистохимическим методом [21]. Авторы предположили, что повышенная экспрессия MR в опухоли отражает стимуляцию M2-макрофагов, которые ответственны за усиление опухолевого роста. Эти данные согласуются с исследованиями H. Zhang и соавт. [22], которые изучали M1-(CD11c+) и M2-макрофаги (CD206+) в опухолях 180 больных РЖ. Повышенное содержание M1-макрофагов в опухоли ассоциировалось с достоверно лучшей выживаемостью, а повышение количества M2-макрофагов достоверно ухудшало прогноз. Интересно отметить, что экспрессия CD206 также коррелировала с классификацией РЖ по Лаурену.

В целом же большинство исследований M1-макрофагов, свидетельствуют о негативном прогнозе при увеличении соотношения указанных клеток в опухолях желудка [23].

Маннозосвязывающий лектин. MBL — это лектин С-типа, синтезируемый в печени в виде мономеров, а в зрелой форме образующий мультимеры вплоть до 18-меров [7]. Уровень сывороточной полимеризации MBL — критический фактор, определяющий его биологическую активность [24]. Как и другие кол-лектины, MBL состоит из домена, богатого остатками цистеина (cysteine-rich domain), коллагеноподобного домена (collagen-like region), соединительного домена (neck region) и домена, связывающего углеводы (carbohydrate recognition domain, CRD) [25]. Этот лектин является одним из центральных звеньев в реализации механизмов врожденного иммунитета и задействован в первой линии противоинфекционной защиты организма человека (лектиновый путь активации комплемента).

Одним из первых сообщений, посвященных генетическим полиморфизмам MBL у больных РЖ, можно считать публикацию А. Вассарелли и соавт. [26], в которой приводятся данные о сравнении 305 случаев РЖ с 427 случаями контроля в польской популяции. Дефицит MBL изучали при 6 различных гаплотипах выявлением аллелей в промоутере гена *MBL2*. Гаплотип HYD ассоциировали с повышенным риском развития РЖ по сравнению с наиболее распространенным гаплотипом HYA (отношение шансов (ОШ) = 1,9; 95 ДИ 1,1–3,2; $p = 0,021$). При анализе диплотипов носители YA/D демонстрировали наиболее высокий риск развития РЖ по сравнению с диплотипом YA/YA (ОШ 3,0; 95 % ДИ 1,2–7,1; $p = 0,015$). Дальнейший анализ по изучению синергизма влияния дефекта *MBL2* и интерлейкина 1В (IL-1В) показал 3,5-кратное увеличение риска (ОШ 3,5, 95 % ДИ 1,6–7,6; $p = 0,001$) при сочетании HYD *MBL2*-гаплотипа и IL-1В-генотипа. Авторы полагают, что между инфекцией *H. pylori*, основного канцерогена при РЖ, полиморфизмом интерлейкина и геном *MBL2* существует тесная взаимосвязь, которая требует углубленного изучения.

F.Y. Wang и соавт. [27] изучали полиморфизм гена *MBL2* у 388 больных РЖ и 144 здоровых доноров в японской популяции. Полиморфизм в 54-м кодоне 1-го экзона исследовался с помощью полимеразной цепной реакции. Значимых отличий между когортой больных и донорами выявлено не было, однако носители аллеля А чаще встречались при распространенных стадиях РЖ (ОШ 1,68; 95 % ДИ 1,05–2,67; $p = 0,03$) и у пациентов моложе 65 лет (ОШ 1,6; 95 % ДИ 1,01–2,52, $p < 0,05$).

В то же время Z. Xie и соавт. [28] в своем мета-анализе, включавшем 43 опубликованных исследо-

вания, не обнаружили ассоциации между полиморфизмом гена *MBL* и РЖ.

Таким образом, результаты исследований роли маннозы и маннозосвязывающих белков человека показали важность этих компонентов в развитии и прогрессии злокачественных опухолей, в частности РЖ. В качестве одного из объяснений воздействия Man на опухолевый рост может служить предположение о повышении экспрессии маннозосодержащих структур на поверхности мембраны опухолевых и других клеток, что облегчает распознавание с помощью как MR, так и MBL. Последний запускает лектиновый путь активации комплемента, приводящий к распознаванию опухолевой клетки. Также надо иметь в виду способность MBL распознавать не только маннозу, но и более широкий круг гликоконъюгатов (согласно исследованиям Консорциума по функциональной гликомике: <http://www.functionalglycomics.com/>), что может отражаться на его функциональной активности [7]. Одно из первых исследований уровня экспрессии маннозосвязывающего лектина при РЖ показало зависимость развития заболевания от полиморфизма гена *MBL*, что, вероятно, сказывается на генетической предрасположенности к этому виду онкологии, хотя это и не подтвердилось по результатам метаанализа [28]. Выраженная экспрессия MR в опухолях желудка являлась фактором неблагоприятного прогноза в китайском исследовании [28]. Экспрессия маннозосодержащих гликанов на макрофагах являлась благоприятной для пациентов, а экспрессия MR, наоборот, связана с неблагоприятным прогнозом, что указывает на наличие дополнительных факторов, которыми могут быть антигликановые антитела.

Антигликановые антитела

В организме человека существуют естественные антитела, которые являются частью врожденного иммунитета. Многие из этих антител направлены к гликанам [29], в том числе и к опухолеассоциированным Tn, TF, SiaTn, которые в избытке экспрессируются на опухолях желудочно-кишечного тракта [30]. Ранее нами были изучены профили антигликановых антител на представительной когорте из групп доноров и больных РЖ с помощью PGA (printed glycan array) [31]. Среди прочего обнаружено, что значимая разница между группами наблюдается по антителам класса М, направленным к производному α Man-R ($R = \text{NHCOCH}_2\text{NH}$; $p = 0,0038$), и антителам, направленным к дисахариду Man α 1-6Man β ($p = 0,0033$). При этом уровень IgM к дисахариду пациентов был ниже, чем у здоровых доноров, а к α Man-R — выше. Man α 1-6Man β — коровая часть N-цепей гликопротеинов, в норме скрыта бисектным GlcNAc, количество которого снижается при патологиях желудочно-кишечного тракта, оголяя коровую Man β . Было высказано

предположение о снижении надзорной функции естественных антител к Man β -содержащему дисахариду.

Материалы и методы

В исследование включены 235 пациентов с морфологически верифицированным РЖ (исследуемая группа) и 76 доноров (контрольная группа). Доля мужчин в 1-й группе составила 53 % ($n = 125$), во второй – 67 % ($n = 51$). Средний возраст пациентов на момент постановки диагноза – 61 год (22 больных были моложе 45 лет, 213 больных – старше 45 лет), доноров – 35 лет (моложе 45 лет – 68 человек, старше 45 лет – 8 человек). У 16 % больных ($n = 37$) заболевание диагностировано на I стадии, у 25 % ($n = 58$) – на II стадии, у 33 % ($n = 79$) – на III стадии и у 26 % ($n = 61$) – на IV стадии.

Для изучения антигликановых антител методом PGA у всех пациентов до начала противоопухолевого лечения проводили забор периферической крови с последующим выделением сыворотки крови. Периферическая кровь здоровых доноров предоставлена локальным биобанком. Добровольное информированное согласие получено от всех включенных в исследование больных и доноров.

Сбор образцов. Образцы сывороток крови собирали в вакуумные пробирки VACUETTE® объемом 4 мл, размером 13 × 75 мм с активатором свертывания. После выдерживания в течение 1 ч при +4 °C образцы центрифугировали в течение 10 мин при 2000 × g, полученную сыворотку аликвотили и хранили при –20 °C.

Анализ с помощью гликочипа. В работе использовали гликочип, содержащий 309 гликанов («Семиотик», Россия), который был напечатан, как описано О. Blixt и соавт. [32], с некоторыми изменениями. Гликочипы печатали с помощью бесконтактного робота sciFLEXARRAYER S5 (Scienion, Германия) из буфера для печати (300 мМ фосфат натрия, pH 8,5, содержащий 0,005 % Tween-20) на NHS-активированные слайды Slides H (Schott Nexterion, Германия), объем капли – 0,9 нл. Концентрация гликанов в буфере для печати была 20 мкМ. Все лиганды печатали в 10 повторях. Согласно протоколу производителя для блокировки оставшиеся после печати NHS-группы блокировали в 25 мМ этанолаmine в 100 мМ борате, содержащем 0,2 % Tween-20, pH 8,5, в течение 1,5 ч. Факт иммобилизации лигандов на активированные слайды подтверждали с помощью стандартной плазмы крови человека, а также набора растительных лектинов (данные не приведены).

Сыворотку крови разбавляли 1:15 в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1 % Tween-20 (0,15 М, PBS 0,1 %, pH 7,4) и 1 % BSA, после чего наносили на гликочип (предварительно выдержанный в течение 15 мин в PBS 0,1 %) и инкубировали при повышенной влажности в течение 1 ч при 37 °C. Чип промы-

вали PBS 0,05 % и инкубировали с антителами козы, узнающими IgG человека, меченными Alexa647 (разбавление 1:800 в PBS 0,1 %, содержащем 1 % BSA) и IgM человека, меченными Cy3 (разбавление 1:1000 в PBS 0,1 %, содержащем 1 % BSA) (Jackson ImmunoResearch, США), в течение 1 ч при 37 °C. Чип промывали PBS 0,05 % и деионизованной водой, высушивали центрифугированием. Флуоресцентные сигналы, выраженные в относительных флуоресцентных единицах (RFU) и отражающие уровень антител, считывали с помощью флуоресцентного сканера микрочипов InnoScan 1100 AL (Innopsys, Франция) с разрешением 10 мкм. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения ScanArray Express 4.0 (метод фиксированных колец) и Microsoft Excel. Для последующего статистического анализа использовали медиану 10 повторных измерений и отклонение медианы.

Статистический анализ. Межгрупповые сравнения проводили, используя U-тест Манна–Уитни с помощью программного обеспечения SPSS версии 17.0 (США). Значимыми считали различия, если величина p была меньше, чем 0,05.

Собственные результаты

В исследование были включены 235 пациентов с морфологически верифицированным раком желудка (исследуемая группа) и 76 доноров (контрольная группа), которых делили по возрасту (моложе и старше 45 лет). Анализ профиля антигликановых антител выполняли с помощью гликочипа (PGA) и проводили сравнение полученных результатов в различных группах. Поскольку ведущую роль в естественной защите организма играют антитела класса M, то далее рассматривали только IgM. В таблице и на рисунке приведены результаты измерений уровня IgM к Man β -содержащим гликанам.

Как видно из таблицы, уровень антигликановых антител к Man β и Man β 1-4GlcNAc β в общей группе больных был достоверно ниже, чем у доноров ($p = 0,0001$ и $0,0075$ соответственно). Для оценки влияния возраста на уровни антигликановых антител у больных РЖ и доноров мы разделили обе группы на 2 подгруппы – до и после 45 лет. В группе до 45 лет достоверные различия по уровням антигликановых антител к Man β сохранялись (у 68 доноров выше, чем у 22 больных), в то время как достоверных различий по уровням антигликановых антител к Man β 1-4GlcNAc β не наблюдалось (см. таблицу и рисунок). При сравнении групп больных и доноров старше 45 лет ($n = 213$ и $n = 8$ соответственно) уровни антител Man β и Man β 1-4GlcNAc β были достоверно выше только у доноров (см. таблицу и рисунок).

Ведущим естественным фактором, влияющим на концентрацию антигликановых антител у человека,

Медиана RFU уровня антител класса М к Man β и к Man β 1-4GlcNAc β в образцах сыворотки крови больных и здоровых доноров до и после 45 лет

RFU level median of M class antibodies to Man β and Man β 1-4GlcNAc β in blood serum samples of patients and healthy donors under and over the age of 45

Гликан Glycan	Медиана RFU* (MAD**) Median RFU* (MAD**)		p
	Пациенты (n = 235) Patients (n = 235)	Доноры (n = 76) Donors (n = 76)	
Man β	3018 (257)	5590 (443)	0,0001
Man β 1-4GlcNAc β	3940 (291)	6375 (445)	0,0075
<45 лет <45 years	Пациенты (n = 22) Patients (n = 22)	Доноры (n = 68) Donors (n = 68)	—
Man β	3563 (339)	6818 (497)	0,0331
Man β 1-4GlcNAc β	7382 (444)	6791 (490)	0,4851
>45 лет >45 years	Пациенты (n = 213) Patients (n = 213)	Доноры (n = 8) Donors (n = 8)	—
Man β	688 (71)	2819 (245)	0,0026
Man β 1-4GlcNAc β	1366 (176)	3796 (283)	0,0005

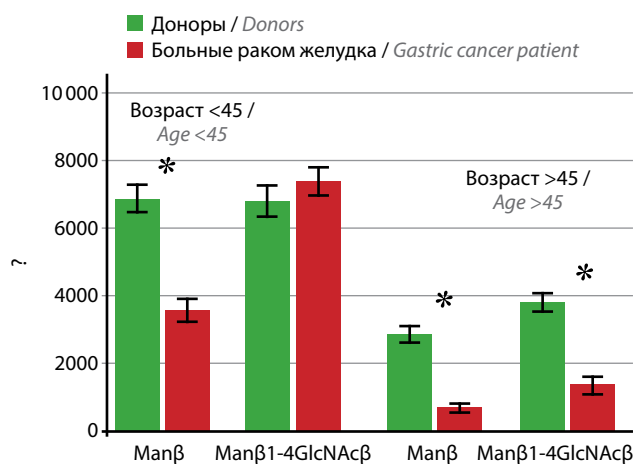
*RFU — относительные единицы флуоресценции, отражающие уровень антител; **MAD — абсолютное отклонение медианы.

*RFU — relative fluorescence units reflecting the level of antibodies; **MAD — median absolute deviation.

Примечание. Жирным выделены p < 0,05.

Note. Bold indicates p < 0,05.

является не только возраст, но и пол, однако, учитывая малочисленность выборки здоровых доноров, проведение более детального анализа не представлялось возможным. Также отметим, что анализ проводился без учета поправки на множественность сравнений.



Уровни антител (выраженные в RFU) к Man β -содержащим гликанам в группах доноров и пациентов с РЖ в возрасте до 45 и после 45 лет. *p < 0,05

Antibody levels to Man β -containing glycan in groups of donors and patients with gastric cancer under and over the age of 45. *p < 0,05

Заключение

Врожденные антитела класса IgM, продуцируемые В1-клетками, — это особая категория антител, которые характеризуются полиреактивностью и отсутствием V(D)J-рекомбинации по сравнению с антителами, продуцируемыми В2-лимфоцитами. Более того, появление врожденных антител не связано с иммунизацией. Аберрантное гликозилирование, заключающееся, как правило, в укорочении углеводных цепочек на мембране опухолевых клеток, — частое явление у больных РЖ и колоректальным раком [2]. В процессе нарушения гликозилирования при опухолевой прогрессии на поверхности клеток появляются опухолеассоциированные гликаны, такие как STn, TF, являющиеся коровыми структурами обычных муциновых О-цепей, не подвергшиеся дальнейшей элонгации. У здорового индивидуума измененные олигосахариды распознаются врожденными антителами, инициируя элиминацию постоянно появляющихся трансформированных клеток (функция надзора). При этом у пациентов с онкологическими заболеваниями, в том числе желудочно-кишечного тракта, уровень антител к аберрантным гликанам часто снижен [30].

В нашей работе у больных РЖ мы выявили дефицит антигликановых антител к Man β и Man β 1-4GlcNAc β — коровым фрагментам N-цепей гликопротеинов, причем с возрастом дефицит нарастал. Такие гликаны,

по-видимому, можно отнести к опухолеассоциированным. Обнаруженный низкий уровень антиманнозных IgM у больных РЖ подтверждает наши более ранние сообщения [31, 33], а также согласуется с данными других исследователей о дефиците врожденного звена иммунитета, связанного с маннозой, при этой патологии [26].

Представленные данные в совокупности позволяют предположить, что пациенты с РЖ испытывают дефицит естественного иммунитета, что приводит к нарушению элиминации опухолевых клеток, которое можно скорректировать с помощью специфических врожденных иммуноглобулинов.

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

1. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 countries. Доступно по: <https://gco.iarc.fr/>
2. Ferreira J., Magalhães A., Gomes J. et al. Protein glycosylation in gastric and colorectal cancers: Toward cancer detection and targeted therapeutics. *Cancer Lett* 2017;387:32–45. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.01.044
3. Hakomori S., Kannagi R. Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. *J Natl Cancer Inst* 1983;71(2):231–51.
4. Kannagi R., Yin J., Miyazaki K. et al. Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants – Hakomori's concepts revisited. *Biochim Biophys Acta* 2008;1780(3):525–31. DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.10.007
5. Pinho S.S., Reis C.A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015;15(9):540–55. DOI: 10.1038/nrc3982
6. Engering A., Cella M., Fluittsma D. et al. Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 1997;417:183–7. DOI: 10.1007/978-1-4757-9966-8_31
7. Scorza M., Liguori R., Elce A. et al. Biological role of mannose binding lectin: From newborns to centenarians. *Clin Chim Acta* 2015;451(Pt A):78–81. DOI: 10.1016/j.cca.2015.03.007
8. Gonzalez P.S., O'Prey J., Cardaci S. et al. Mannose impairs tumour growth and enhances chemotherapy. *Nature* 2018;563(7733):719–23. DOI: 10.1038/s41586-018-0729-3
9. Gu J., Liang D., Pierzynski J.A. et al. D-mannose: a novel prognostic biomarker for patients with esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis* 2017;38(2):162–7. DOI: 10.1093/carcin/bgw207
10. Sanchez-Espiridion B., Liang D., Ajani J.A. et al. Identification of serum markers of esophageal adenocarcinoma by global and targeted metabolic profiling. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2015;13:1730–7. DOI: 10.1016/j.cgh.2015.05.023
11. Ytting H., Christensen I.J., Jensenius J.C. Preoperative mannan-binding lectin pathway and prognosis in colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:265–72. DOI: 10.1007/s00262-004-0594-9
12. Sha J., Cao D., Cui R. et al. Mannose Impairs Lung Adenocarcinoma Growth and Enhances the Sensitivity of A549 Cells to Carboplatin. *Cancer Manag Res* 2020;12:11077–83. DOI: 10.2147/CMAR.S278673
13. Fan Z., Wang Y., Xiang S. et al. Dual-self-recognizing, stimulus-responsive and carrier-free methotrexate-mannose conjugate nanoparticles with highly synergistic chemotherapeutic effects. *J Mater Chem B* 2020;8(9):1922–34. DOI: 10.1039/d0tb00049c
14. Zhang Q., Cai Y., Li Q.Y. et al. Targeted delivery of a mannose-conjugated BODIPY photosensitizer by nanomicelles for photodynamic breast cancer therapy. *Chemistry* 2017;23(57):14307–15. DOI: 10.1002/chem.201702935
15. Bouffard E., Mauriello Jimenez C., El Cheikh K. et al. Efficient photodynamic therapy of prostate cancer cells through an improved targeting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *Int J Mol Sci* 2019;20(11):2809. DOI: 10.3390/ijms20112809
16. Sheikh H., Yarwood H., Ashworth A. et al. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *J Cell Sci* 2000;113(Pt 6):1021–32. DOI: 10.1242/jcs.113.6.1021
17. Martinez-Pomares L. The mannose receptor. *J Leukoc Biol* 2012;92(6):1177–86. DOI: 10.1189/jlb.0512231
18. Liu D.R., Guan Q.L., Gao M.T. et al. Mannose receptor as a potential biomarker for gastric cancer: a pilot study. *Int J Biol Markers* 2017;32(3):278–83. DOI: 10.5301/ijbm.5000244
19. Liu S.S., Gao Y., Yin S.P. et al. Expression of Narcissus pseudonarcissus lectin and mannose receptor positive macrophages predict progression and prognosis of patients with gastric cancer. *Transl Cancer Res* 2020;9(10):5979–93. DOI: 10.21037/tcr-20-1459
20. Ding D., Song Y., Yao Y. et al. Preoperative serum macrophage activated biomarkers soluble mannose receptor (sMR) and soluble haemoglobin scavenger receptor (sCD163), as novel markers for the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Oncol Lett* 2017;14(3):2982–90. DOI: 10.3892/ol.2017.6547
21. Ding D., Yao Y., Yang C. et al. Identification of mannose receptor and CD163 as novel biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2018;21(3):689–700. DOI: 10.3233/CBM-170796
22. Zhang H., Wang X., Shen Z. et al. Infiltration of diametrically polarized macrophages predicts overall survival of patients with gastric cancer after surgical resection. *Gastric Cancer* 2015;18(4):740–50. DOI: 10.1007/s10120-014-0422-7
23. Riih  M.R., Puolakkainen P.A. Tumor-associated macrophages (TAMs) as biomarkers for gastric cancer: A review. *Chronic Dis Transl Med* 2018;4(3):156–63. DOI: 10.1016/j.cdtm.2018.07.001
24. Dommett R.M., Klein N., Turner M.W. Mannose-binding lectin in innate immunity: past, present and future. *Tissue Antigens* 2006;68(3):193–209. DOI: 10.1111/j.1399-0039.2006.00649.x
25. Turner M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17(11):532–40. DOI: 10.1016/0167-5699(96)10062-1
26. Baccarelli A., Hou L., Chen J. et al. Mannose-binding lectin-2 genetic variation and stomach cancer risk. *Int J Cancer* 2006;119:1970–5. DOI: 10.1002/ijc.22075
27. Wang F.Y., Tahara T., Arisawa T. et al. Mannan-binding lectin (MBL) polymorphism and gastric cancer risk in Japanese population. *Dig Dis Sci* 2008;53(11):2904–8. DOI: 10.1007/s10620-008-0249-3
28. Xie Z., Wang B., Chai Y. et al. Estimation of associations between 10 common gene polymorphisms and gastric cancer: evidence from a meta-analysis. *J Clin Pathol* 2020;73(6):318–21. DOI: 10.1136/jclinpath-2019-206189

29. Huflejt M.E., Vuskovic M., Vasiliu D. et al. Anti-carbohydrate antibodies of normal sera: findings, surprises and challenges. *Mol Immunol* 2009;46(15):3037–49. DOI: 10.1016/j.molimm.2009.06.010
30. Smorodin E.P., Sergeyev B.L., Kurtenkov O.A. The characterization of IgG antibodies to GalNAc beta-terminated glycans of gastric cancer survivors. *Exp Oncol* 2014;36(1):38–43. PMID: 24691283
31. Shilova N., Nikulin M., Navakovskiy M. et al. Antibodies to α MAN in gastric cancer. *Haematopoiesis Immunology* 2021;19(1):30–6.
32. Blixt O., Head S., Mondala T. et al. Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(49):17033–8. DOI: 0.1073/pnas.0407902101
33. Tupitsyn N. Immunological concept of cancer prevention. *Haematopoiesis Immunology* 2019;17(2):14–32.

Вклад авторов

М.П. Никулин, Н.В. Шилова: обзор публикаций по теме статьи, разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

А.Д. Липатников: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

А.В. Семьянихина: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

И.С. Стилиди: административная поддержка; редактирование рукописи;

Н.В. Бовин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Н.Н. Тупицын: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи, административная поддержка.

Author's contributions

M.P. Nikulin, N.V. Shilova: review of publications on the topic of the article, research design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

A.D. Lipatnikov: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

A.V. Semyanikhina: review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

I.S. Stilidi: administrative support; editing of the article;

N.V. Bovin: research design development, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript;

N.N. Tupitsyn: research design development, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript, administrative support.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.П. Никулин / M.P. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-9608-4696>

Н.В. Шилова / N.V. Shilova: <https://orcid.org/0000-0001-6003-071X>

А.Д. Липатников / A.D. Lipatnikov: <https://orcid.org/0000-0003-2925-9924>

А.В. Семьянихина / A.V. Semyanikhina: <https://orcid.org/0000-0001-8783-8874>

И.С. Стилиди / I.S. Stilidi: <https://orcid.org/0000-0002-5229-8203>

Н.В. Бовин / N.V. Bovin: <https://orcid.org/0000-0001-8669-4477>

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. Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 22-24-00398.

Sponsorship. The study was supported by the RGNF grant No. 22-24-00398.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. The study protocol was approved by the ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. All the patients signed the informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 21.04.2023. Принята в печать: 12.07.2023

Article received: 21.04.2023. Accepted for publication: 12.07.2023

мРНК гена *OY-TES-1* в периферической крови и опухоли при колоректальном раке

Н.Р. Хилал^{1,2}, Д.В. Новиков^{1,3}, В.Н. Якимов¹, Р.Г. Пегов⁴, В.В. Новиков^{1,3}

¹ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, пр-кт Гагарина, 23;

²ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; Россия, 603000 Нижний Новгород, площадь Минина и Пожарского, 10/1;

³ФГБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора; Россия, 603022 Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71;

⁴Нижегородский областной клинический онкологический диспансер; Россия, 603093 Нижний Новгород, ул. Деловая, 11/1

Контакты: Надежда Риядовна Хилал nadia.hilal@hotmail.com

Введение. Одним из раково-тестикулярных генов является ген *OY-TES-1*, кодирующий проакрозинсвязывающий белок. Известно об экспрессии этого гена в опухолевых клетках.

Цель исследования – определение частоты обнаружения матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) *OY-TES-1* в периферической крови и опухолевых очагах больных колоректальным раком (КРР) в сопоставлении с клиническими особенностями течения заболевания для оценки потенциальной мониторинговой значимости данного показателя.

Материалы и методы. Использован метод определения мРНК *OY-TES-1* на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, и проведена оценка частоты встречаемости мРНК *OY-TES-1* в периферической крови и опухолевых очагах 66 больных КРР, а также в крови здоровых волонтеров с помощью построения таблиц сопряженности, использования критерия χ^2 и точного критерия Фишера.

Результаты. В периферической крови здоровых волонтеров мРНК *OY-TES-1* не обнаруживалась. В крови больных КРР мРНК *OY-TES-1* выявлена в 13,6 % случаев. В опухолях она обнаруживалась в 60,6 % случаев. В крови и опухолевых очагах больных КРР мРНК *OY-TES-1* выявлялась статистически значимо чаще на III и IV стадиях, чем на I и II стадиях (в 11,0 и 4,5 раза соответственно), а также многократно чаще при опухолях с низкой степенью дифференцировки, чем при высокодифференцированных опухолях. У больных КРР мРНК *OY-TES-1* в опухолях при метастазах в органах и лимфатических узлах обнаруживалась многократно чаще, чем при их отсутствии (в 16,4 и 17,4 раза соответственно).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии мРНК гена *OY-TES-1* в крови здоровых лиц и появлении мРНК гена *OY-TES-1* в крови больных КРР. Показана возможность использования теста на наличие в крови мРНК гена *OY-TES-1* в качестве дополнительного информативного мониторингового показателя при КРР.

Ключевые слова: *OY-TES-1*, раково-тестикулярные гены, колоректальный рак, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

Для цитирования: Хилал Н.Р., Новиков Д.В., Якимов В.Н. и др. мРНК гена *OY-TES-1* в периферической крови и опухоли при колоректальном раке. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):28–35. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-28-35

mRNA of the *OY-TES-1* gene in peripheral blood and tumors in colorectal cancer

Nadezhda R. Hilal^{1,2}, Dmitry V. Novikov^{1,3}, Vasily N. Yakimov¹, Roman G. Pegov⁴, Viktor V. Novikov^{1,3}

¹National Research N.I. Lobachevsky Nizhgorodsky State University; 23 Gagarin ave., Nizhny Novgorod 603022, Russia;

²Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 10/1 Minin and Pozharsky sq., Nizhny Novgorod 603000, Russia;

³Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod 603022, Russia;

⁴Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncology Center; 11/1 Delovaya St., Nizhny Novgorod 603093, Russia

Contacts: Nadezhda Riyadovna Hilal nadia.hilal@hotmail.com

Background. One of the testicular cancer genes is the *OY-TES-1* gene, which encodes a proacrosin-binding protein. This gene is known to be expressed in tumor cells.

Aim. To determinate the detection frequency of *OY-TES-1* matrix ribonucleic acid (mRNA) in the peripheral blood and tumor of patients with colorectal cancer (CRC) in comparison with the clinical features of the course of a disease in order to assess the potential monitoring significance of this indicator.

Materials and methods. A method for determining the level of *OY-TES-1* mRNA based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The detection frequency of mRNA *OY-TES-1* gene in blood and tumor samples of 66 patients with CRC, as well as the blood of healthy volunteers, was evaluated.

Results. In the peripheral blood of healthy volunteers, no *OY-TES-1* mRNA was detected. In the blood of CRC patients, *OY-TES-1* mRNA was detected in 13.6 % of cases. In tumors, it was found in 60,6 % of cases. *OY-TES-1* mRNA in the blood and in tumor of patients with CRC was detected statistically significantly more often at stages III and IV than at stages I and II (11,0 and 4,5 times, respectively), and also many times more often in tumors with a low degree of differentiation than with highly differentiated tumors. In patients with CRC, the *OY-TES-1* mRNA in tumors with metastases in organs and lymph nodes was detected many times more often than in tumors without any metastases (by 16,4 and 17,4 times respectively).

Conclusion. The data obtained indicate the absence of mRNA *OY-TES-1* gene in the blood of healthy individuals, the appearance of mRNA *OY-TES-1* gene in the blood of CRC patients, and the possibility of using the detection of mRNA *OY-TES-1* gene in the blood as an additional informative monitoring marker for colorectal cancer.

Keywords: *OY-TES-1*, cancer-testis genes, expression level, colorectal cancer, reverse transcription polymerase chain reaction

For citation: Hilal N.R., Novikov D.V., Yakimov V.N. et al. mRNA of the *OY-TES-1* gene in peripheral blood and tumors in colorectal cancer. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3): 28–35. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-28-35

Введение

Раково-тестикулярные гены (cancer/testis, CT) представляют собой группу генов, экспрессия которых в норме характерна только для репродуктивных тканей (тестикул), эмбриональных тканей и стволовых клеток. При злокачественной трансформации клеток и тканей повышается экспрессия некоторых CT-генов, локализованных на X-хромосоме [1]. При тяжелых стадиях опухоли увеличивается спектр экспрессируемых CT-генов и уровень их экспрессии. Наблюдается сильная вариация в уровнях экспрессии CT-генов в зависимости от типа опухоли. При колоректальном раке (КРР) повышается экспрессия ряда CT-генов, уровень которой зависит от степени дифференцировки опухоли и наличия метастазов. Экспрессия некоторых CT-генов, таких как *MAGE-C1* и *XAGE-1*, ассоциируется с благоприятным прогнозом КРР, а например *MAGE-A (1-6)* и *SSX1*, 2, 4 и др. — с плохим прогнозом КРР [2, 3].

Одним из новых CT-генов, информативных и перспективных для мониторинга КРР, является ген *OY-TES-1*, известный под названием акрозинсвязывающий белок (ACRBP). В норме матричная рибонуклеиновая кислота (мРНК) *OY-TES-1* экспрессируется в сперматогониях и яичниках, участвуя в сперматогенезе и оплодотворении [4]. В соматических тканях были обнаружены лишь следы мРНК *OY-TES-1*, тогда как в различных опухолях мРНК этого гена обнаруживалась с высокой частотой. Изучена экспрессия *OY-TES-1* в мезенхимальных стволовых клетках [5], в клетках гепатоцеллюлярной

карциномы [6], при раке яичников [7], раке молочной железы [8], показано влияние *OY-TES-1* на процессы клеточного роста, клеточную миграцию, апоптоз, митоз и пролиферацию раковых клеток [5–7]. Иммуногистохимические исследования (ИГХ) и метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) продемонстрировали полное отсутствие экспрессии *OY-TES-1* в тканях здорового кишечника, здоровой печени и циррозной печени [6, 9]. Опубликованы всего 2 работы по изучению экспрессии *OY-TES-1* при КРР. Показана зависимость между экспрессией гена *OY-TES-1* и степенью опухолевой инвазии в образцах КРР [9]. Нокдаун гена *OY-TES-1* способствовал уменьшению канцерогенности опухоли и повышению степени дифференцировки клеток [10]. Однако при КРР осталась неизученной связь между мРНК *OY-TES-1* и клиническими характеристиками течения заболевания. Неясно также, присутствует ли мРНК *OY-TES-1* в периферической крови больных и как это связано со стадией развития опухоли, степенью дифференцировки и локализацией опухоли, наличием метастазов.

Цель настоящей работы — определение частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* в периферической крови и опухолевых очагах больных КРР в сопоставлении с клиническими особенностями течения заболевания для оценки потенциальной мониторинговой значимости данного показателя.

Материалы и методы

Материалом для исследований послужили образцы периферической крови и опухоли 66 больных КРР,

поступивших на лечение в областной онкологический диспансер г. Нижнего Новгорода, и образцы периферической крови 5 здоровых волонтеров. Кли-

нические данные больных КРР и патологические характеристики исследованных образцов приведены в табл. 1.

Таблица 1. Частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и крови больных КРР

Table 1. Frequency of *OY-TES-1* mRNA detection in tumor and blood samples of CRC patients

Параметр Parameter		Абсолютное и относительное (%) количество образцов Absolute and relative (%) number of samples	Частота обнаружения мРНК гена <i>OY-TES-1</i> (%) Frequency detection of mRNA <i>OY-TES-1</i> gene (%)	
			Опухолевый очаг Tumor	Кровь Blood
Все пациенты/All patients		66 (100,0)	60,6	13,6
Возраст, лет Age, years	<55	16 (24,0)	58,0	25,0
	55–65	23 (35,0)	59,0	7,0
	≥65	27 (41,0)	64,0	16,0
Пол Gender	Мужской Male	29 (44,0)	72,4	17,2
	Женский/ Female	37 (56,0)	51,3	10,8
Локализация опухоли Tumor localization	Ампулярный отдел прямой кишки Ampulla of the rectum	34 (51,5)	59,0	12,0
	Сигмовидная кишка Sigmoid colon	16 (24,2)	58,0	17,0
	Ободочная кишка Large intestine	10 (15,1)	70,0	10,0
	Слепая кишка Cecum	6 (9,2)	60,0	10,0
Стадия заболевания Stage of the disease	I–II	24 (36,1)	8,0	4,3
	III–IV	42 (63,9)	88,0*	18,6
Степень дифференцировки Differentiation degree	Высокая High	5 (7,6)	20,0	0,0
	Умеренная Moderate	42 (63,6)	60,0**	7,1
	Низкая Low	19 (28,8)	73,6**	31,5
Противоопухолевая терапия Anticancer therapy	После лучевой, химио- или комбинированной терапии After radiation, chemo- or combination therapy	15 (22,5)	50,0	17,0
	Без противоопухолевой терапии Without anticancer therapy	51 (77,5)	77,0	13,0

*Статистически значимые различия по сравнению с опухолевыми очагами на ранних (I+II) стадиях ($p < 0,05$). **Статистически значимые различия в частоте обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах по сравнению с высокодифференцированной опухолью ($p < 0,05$).

*Statistically significant differences compared with tumor at early (I+II) stages ($p < 0,05$). **Statistically significant differences in the detection frequency of mRNA of the *OY-TES-1* gene in tumor in comparison with a highly differentiated tumor ($p < 0,05$).

Кроме того, учтены данные о противоопухолевой терапии, которую получили 15 (22,5 %) из 66 пациентов. Забор крови у больных ККР проводили до операции, а образцы опухоли были получены при резекции опухоли. Из образцов периферической крови и опухолевых очагов выделяли суммарную РНК методом фенол-хлороформной экстракции [11]. Для удаления контаминирующей геномной ДНК полученный препарат дополнительно обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific Inc., США) согласно рекомендациям производителя. Затем образцы выделенной РНК хранили при -20°C до начала постановки ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). На основе данных о нуклеотидной последовательности, предоставленных ресурсом <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/> в разделе nucleotide под регистрационным номером NM_032489.3, а также с помощью пакета программ Lasergene (США) сконструированы специфические праймеры для определения мРНК гена *OY-TES-1* (табл. 2).

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности использованных праймеров

Table 2. Nucleotide sequences of primers used

мРНК mRNA	Название праймера Primer name	Нуклеотидная последовательность праймера (5'–3') Nucleotide sequence of primer (5'–3')
<i>HPRT</i>	F	CTGAAGAGCTATTGTAATGA
	R	TTATATCCAACACTTCGTGG
<i>OY-TES-1</i>	OY-F	TCCTTggTTTCgggAAgTCggTCTg
	OY-R	CggAAggTgTCCCgCATgAgATgTC

При составлении олигонуклеотидных последовательностей учтены длины интронных участков. Для расчета температуры отжига праймеров принимали за исходную температуру, рассчитанную с помощью программы Oligo Calculator V10 (Россия) и впоследствии оптимизированную опытным путем. Праймеры для гена *OY-TES-1* синтезировали в компании ЗАО «Синтол» (Россия). Сконструированные праймеры использовали в постановке ОТ-ПЦР с целью синтеза и амплификации кДНК гена *OY-TES-1* в образцах крови и опухоли больных ККР. Для стандартизации количества кДНК матрицы, полученной после реакции ОТ, и проверки специфичности ПЦР использовали ген «домашнего хозяйства» *HPRT* (Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase), присутствующий во всех клетках человека (см. табл. 2). Пробы, содержащие мРНК *HPRT*, использовали для детекции мРНК *OY-TES-1* методом однораундовой ПЦР. Реакцию ПЦР проводили в объеме 24 мкл на микропробирку (23 мкл реакционной смеси, 1 мкл



Рис. 1. Электрофореграмма с результатами постановки полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией: 1 – образец крови, содержащий мРНК гена *OY-TES-1*; 2, 3 – образцы крови, в которых мРНК *OY-TES-1* не обнаружена; 4 – маркер длины фрагментов от 400 до 1000 п. н.

Fig. 1. Electropherogram with the results of reverse transcription polymerase chain reaction: 1 – blood sample containing *OY-TES-1* mRNA; 2, 3 – blood samples in which *OY-TES-1* mRNA is not detected; 4 – fragment length marker from 400 to 1000 bp.

кДНК). Полученную реакционную смесь перемешивали и центрифугировали, затем поверх смеси наносили 1–2 капли минерального масла. Далее в амплификаторе «Терцик» (ЗАО «НПФ «ДНК-Технология», Россия) проводили амплификации со следующими условиями: 94°C – 1 мин (предварительная денатурация с использованием Taq Polymerase), 40 циклов (94°C – 30 сек, 60°C – 30 сек, 72°C – 40 сек, 72°C – 5 мин). Детекцию результатов ОТ-ПЦР осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле (1,5 %) в присутствии бромид этидия в концентрации 5 мкг/мл. Электрофореграмма результатов детекции мРНК *OY-TES-1* представлена на рис. 1.

Расчетная длина продукта ПЦР составила 421 п. н. Специфичность реакции подтверждали путем определения первичной структуры полученных фрагментов кДНК на генетическом анализаторе ABIPrism 3130 (Applied Biosystems, США) с использованием наборов реагентов DNA Extraction Kit (Fermentas, Латвия) и Big Dye Terminator (Applied Biosystems, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 8.0. Обнаружение мРНК гена *OY-TES-1* оценивали как качественный признак – «есть» или «нет». Для анализа качественных признаков построены и проанализированы таблицы сопряженности. Для сравнения частоты встречаемости гена *OY-TES-1* и проверки наличия статистической взаимосвязи между относительной частотой встречаемости гена *OY-TES-1* и клиническими показателями больных ККР применяли критерий χ^2 и точный критерий Фишера. Анализ ассоциации 2 качественных признаков сводили к проверке гипотезы о независимости признаков. После построения таблиц сопряженности проводили их анализ и вычисляли меры ассоциации (сопряженности). Для статистически значимо связанных признаков проведен попарный анализ и оценена сила связи между 2 зависящими признаками с помощью коэффициента Крамера (от 0 до 1). Все виды статистического анализа выполнены

на уровне значимости 5 %, т. е. нуль-гипотеза отвергалась при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и периферической крови 66 больных КРР до резекции опухоли показал, что мРНК гена *OY-TES-1* чаще обнаруживалась в опухолевых очагах по сравнению с образцами крови (60,6 и 13,6 % соответственно). Тандемное обнаружение мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухоли и крови наблюдали у 10,6 % больных. В крови здоровых волонтеров мРНК *OY-TES-1* не обнаруживали. Статистически значимой связи между полом пациентов и частотой обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* не установлено ($p > 0,05$). Тем не менее наблюдали выраженную тенденцию к повышению частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и крови у мужчин по сравнению с женщинами. Статистически значимых изменений в частоте обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухолевых очагов и крови в зависимости от возраста не выявлено ($p > 0,05$). Однако наблюдали тенденцию к снижению частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в крови при увеличении возраста больных (см. табл. 1).

При исследовании связи между частотой выявления мРНК *OY-TES-1* и локализацией опухоли установлено, что самая высокая частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* зафиксирована в образцах опухоли ободочной кишки (70,0 %), а самая низкая частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* — в образцах опухоли сигмовидного и ампулярного отделов кишки (58,0 и 59,0 % соответственно). Однако статистически значимая связь между частотой обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* и локализацией опухоли отсутствует ($p > 0,05$). В образцах периферической крови больных КРР зафиксирована сходная частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* при локализации опухоли в сигмовидной, слепой, ободочной кишке и ампулярном отделе прямой кишки.

Оценка частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в зависимости от стадии заболевания показала, что в опухолевых очагах мРНК гена *OY-TES-1* статистически значимо обнаруживали в 11 раз чаще на поздних (III+IV) стадиях опухоли по сравнению с ранними (I+II) стадиями ($p < 0,0001$), но частота обнаружения их мРНК в образцах крови имела лишь тенденцию к повышению ($p > 0,05$) (см. табл. 1). Повышение стадии развития опухоли было сопряжено с повышением частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухолевых очагов больных КРР. Значение коэффициента Крамера было равно 0,61 для гена *OY-TES-1*, что соответствует средней силе связи.

При сравнении частот обнаружения мРНК *OY-TES-1* в опухолях с разной степенью дифференцировки кле-

ток было показано, что мРНК гена *OY-TES-1* полностью отсутствует в периферической крови больных КРР с высокой степенью дифференцировки (0 %), но с уменьшением степени дифференцировки опухоли частота обнаружения мРНК этого гена в крови имеет тенденцию к повышению от 0 до 7,1 % в умеренно-дифференцированных и от 0 до 31,5 % в низко-дифференцированных опухолевых образцах ($p > 0,05$). В образцах опухоли больных КРР наблюдали статистически значимое повышение частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* — до 73,6 % ($p = 0,023$) — при снижении степени дифференцировки (см. табл. 1). Снижение степени дифференцировки опухоли было сопряжено с повышением частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах крови больных КРР. Значение коэффициента Крамера для гена *OY-TES-1* было равно 0,33, что соответствует слабой силе связи.

У больных КРР без метастазов наблюдали низкую частоту обнаружения мРНК *OY-TES-1* как в опухолевых очагах, так и в образцах крови (около 5 % случаев). Тестирование опухолевых очагов показало более высокую частоту выявления мРНК *OY-TES-1* как при метастазах в органах (в 16,5 раза по сравнению с отсутствием метастазов, $p < 0,0001$), так и при метастазах в лимфатических узлах (в 17,4 раза по сравнению с отсутствием метастазов, $p < 0,0001$). В периферической крови наблюдалась лишь тенденция к повышению частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* у больных с метастазами в органах по сравнению с больными без метастазов ($p > 0,05$). При наличии метастазов в лимфатических узлах мРНК *OY-TES-1* не выявлялась (рис. 2).

Анализ связи между обнаружением мРНК *OY-TES-1* и характером метастазирования показал, что наличие метастазов в лимфатических узлах сопряжено с повышением частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в образцах опухолевых очагов больных КРР. С помощью коэффициента Крамера была определена сила связи между обнаружением мРНК гена *OY-TES-1* и характером метастазирования. Коэффициент Крамера для гена *OY-TES-1* был равен 0,75, что соответствует сильной связи.

Кроме того, в опухолевых очагах больных КРР, получивших противоопухолевую терапию (лучевую, химио- или комбинированную химиолучевую терапию), частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* имела тенденцию к снижению по сравнению с частотой обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* у больных, не получивших противоопухолевую терапию ($p > 0,05$). Обратная ситуация наблюдалась в образцах периферической крови. Так, у больных, получивших противоопухолевую терапию (лучевую, химио- или комбинированную химиолучевую терапию), частота обнаружения гена *OY-TES-1* имела тенденцию к повышению по сравнению с частотой обнаружения

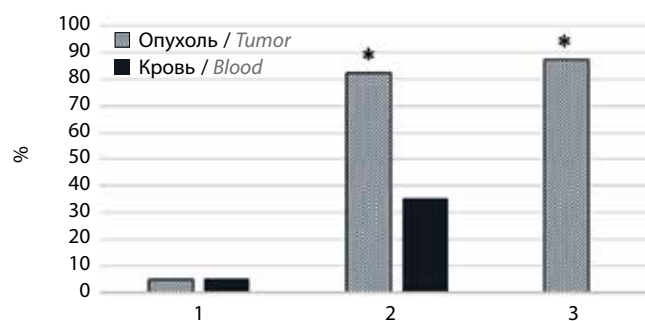


Рис. 2. Частота обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах и крови при наличии и отсутствии метастазов: 1 – отсутствие метастазов; 2 – метастазы в органы; 3 – метастазы в лимфатические узлы.

*Статистически значимые различия в частоте обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в опухолевых очагах по сравнению с больными, не имеющими метастазов ($p < 0,05$).

Fig. 2. Detection frequency of *OY-TES-1* mRNA in tumor and blood in the presence and absence of metastases: 1 – absence of metastases; 2 – metastases to organs; 3 – metastases to lymph nodes.

*Statistically significant differences in the detection frequency of mRNA of the *OY-TES-1* gene in tumor as compared with patients without metastases ($p < 0,05$).

мРНК этого гена у больных, не получивших никакой противоопухолевой терапии ($p > 0,05$) (см. табл. 1).

Обсуждение

Ранее было показано, что мРНК *OY-TES-1* обнаруживается при КРР в опухолевых клетках. Полученные нами результаты соответствуют данным L. Vin и соавт., которые обнаружили мРНК *OY-TES-1* в опухолях больных КРР в 73,3 % случаев [9]. Проведенное нами сравнение частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* у больных КРР с разной степенью тяжести болезни показало, что на поздних стадиях развития опухоли и при низкодифференцированных опухолях она может достигать 88 %. Метастазирующие опухоли также характеризуются высокой частотой экспрессии мРНК *OY-TES-1*, которая была на порядок выше, чем у больных КРР без метастазов.

Кроме того, продемонстрировано наличие мРНК *OY-TES-1* не только в опухоли, но и в крови больных КРР. Частота выявления мРНК *OY-TES-1* в периферической крови была значительно ниже, чем в опухолевых очагах. Однако у каждого 3-го больного КРР с метастазами обнаруживалась мРНК *OY-TES-1*. Чаще всего ее находили в крови при одновременном выявлении в опухоли. Но в 2 случаях мРНК *OY-TES-1* обнаружили только в крови, что, вероятно, связано с высокой гетерогенностью опухолей по экспрессии гена *OY-TES-1*, и взятый для анализа участок опухоли мог не содержать клеток, экспрессирующих *OY-TES-1*. Сходные случаи известны для других раковоассоциированных генов [1]. Выход мРНК *OY-TES-1* в кровь

может быть связан с разрушением части опухолевых клеток в процессе опухолевого роста или с секретацией опухолевыми клетками внеклеточных везикул, несущих мРНК. Заметим, что противоопухолевая терапия приводила в наших наблюдениях к тенденции к снижению частоты встречаемости мРНК *OY-TES-1* в опухолевых очагах и тенденции к повышению частоты ее обнаружения в периферической крови больных.

Ранее L. Vin и соавт. [9] провели сравнение частоты обнаружения мРНК *OY-TES-1* с ИГХ-определением белка *OY-TES-1* в опухолевой ткани и показали, что белок выявляется только в 44 % проб, положительных по мРНК *OY-TES-1* (20 из 45 проб). Это свидетельствует о более высокой чувствительности ПЦР по сравнению с ИГХ-определением *OY-TES-1*. Тем не менее по мере повышения тяжести заболевания наблюдалось увеличение частоты экспрессии белка *OY-TES-1*, сходное с увеличением частоты встречаемости мРНК *OY-TES-1*, зарегистрированным в нашей работе.

При исследовании связи между частотой выявления мРНК *OY-TES-1* и локализацией опухоли обнаружена тенденция к повышению исследованного показателя при опухоли ободочной кишки по сравнению с другими отделами кишечника. Известно, что опухоли разной локализации отличаются между собой по мутационному статусу генов и экспрессионному профилю [12–14]. Возможно также, что выявленная тенденция связана с особенностями микрофлоры различных отделов кишечника, что может повышать злокачественность опухоли [15, 16] и проявляться в тенденции к увеличению частоты выявления в опухолевых клетках мРНК гена *OY-TES-1*.

Результаты сопоставления частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в крови и опухоли больных, получавших комбинированную противоопухолевую терапию, и больных, не получавших никакой противоопухолевой терапии, позволяют предположить, что противоопухолевая терапия может привести к транскрипционной активации и индукции экспрессии мРНК гена *OY-TES-1* [17]. Ранее было показано, что получение химиотерапии улучшает выживаемость больных немелкоклеточным раком легкого, в чьих опухолевых образцах была обнаружена мРНК СТ-генов [18]. Следовательно, можно предположить, что наличие мРНК гена *OY-TES-1* в крови больных КРР, прошедших курсы химиотерапии, также является благоприятным признаком.

Статистический анализ полученных результатов продемонстрировал значимую связь между частотой выявления мРНК *OY-TES-1*, стадией развития опухоли, степенью дифференцировки опухоли и характером метастазирования у больных КРР. Это позволяет рассматривать факт обнаружения мРНК гена

OY-TES-1 при КРР как возможный маркер неблагоприятного прогноза течения заболевания.

Заключение

Определение мРНК *OY-TES-1* методом ОТ-ПЦР показало ее присутствие как в опухолях, так и в периферической крови больных КРР. Установлена значимая связь между частотой выявления мРНК *OY-TES-1* и стадией развития опухоли, степенью диф-

ференцировки опухоли и характером метастазирования у больных КРР. Кроме того, повышение или понижение частоты обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* в крови может указывать на локализацию метастазов (в органах и лимфатических узлах соответственно). Это позволяет рассматривать факт обнаружения мРНК гена *OY-TES-1* при КРР как возможный маркер неблагоприятного прогноза течения заболевания.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Liu W-S. Mammalian Sex Chromosome Structure, Gene Content, and Function in Male Fertility. *Annu Rev Anim Biosci* 2019;15(7):103–24. DOI: 10.1146/annurev-animal-020518-115332
- Голышко П.В., Новиков Д.В., Ананьев С.В. и др. Раково-тестикулярные гены в крови и опухоли больных колоректальным раком. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):19–24. DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-1-19-24 Golyshko P.V., Novikov D.V., Ananiev S.V. et al. Cancer-testicular genes in the blood and tumors of patients with colorectal cancer. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(1):19–24. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2015-14-1-19-24.
- Gu L., Sang M., Yin D. et al. MAGE-A gene expression in peripheral blood serves as a poor prognostic marker for patients with lung cancer. *Thorac Cancer* 2018;9(4):431–8. DOI: 10.1111/1759-7714.12571
- Kanemori Y., Ryu J.H., Sudo M. et al. Two functional forms of ACRBP/sp32 are produced by pre-mRNA alternative splicing in the mouse. *Biol Reprod* 2013;88:105. DOI: 10.1095/biolreprod.112.107425
- Cen Y.H., Guo W.W., Luo B. et al. Knockdown of OY-TES-1 by RNAi causes cell cycle arrest and migration decrease in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2012;36:917–22. DOI: 10.1042/CBI20120037
- Bin L., Xiang Y., Jing L. et al. Cancer-testis Antigen OY-TES-1 Expression and Immunogenicity in Hepatocellular Carcinoma. *Current Medical Science* 2020;40:719–28. DOI: 10.1007/s11596-020-2241-x
- Lin L., Nong W., Luo B. et al. Cancer-testis antigen ACRBP expression and serum immunoreactivity in ovarian cancer: its association with prognosis. *Immunity, Inflammation and Disease* 2021;9(4):1759–70. DOI: 10.1002/iid3.534
- Kazemi-oula G., Ghafouri-Fard S., Mobasheri M.B. et al. Upregulation of RHOXF2 and ODF4 Expression in Breast Cancer Tissues. *Cell Journal* 2015;17:471–7. DOI:10.22074/CELLJ.2015.8
- Bin L., Xiang Y., Rong F. et al. Cancer testis antigen OY-TES-1 expression and serum immunogenicity in colorectal cancer: its relationship to clinicopathological parameters. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6(12):2835–45.
- Хилал Н.Р., Новиков Д.В., Новиков В.В., Караулов А.В. Раково-тестикулярные гены при раке толстой кишки. *Терапевтический архив* 2017;113–7. DOI: 10.17116/terarkh2017895113-117
- Hilal N.R., Novikov D.V., Novikov V.V., Karaulov A.V. Cancer-testicular genes in colon cancer. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2017;113–7. (In Russ.). DOI: 10.17116/terarkh2017895113-117
- Калугин А.В., Новиков Д.В., Мамаева М.Е. и др. Присутствие мРНК раково-тестикулярных генов в опухоли и периферической крови больных раком эндометрия. *Российский биотерапевтический журнал* 2022;21(2):33–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39 Kalugin A.V., Novikov D.V., Mamaeva M.E. et al. Cancer-testis genes mRNA presence in tumor lesion and peripheral blood of endometrial cancer patients. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2022;21(2):33–9. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2022-21-2-33-39
- Maus M.K., Hanna D.L., Stephens C.L. et al. Distinct gene expression profiles of proximal and distal colorectal cancer: implications for cytotoxic and targeted therapy. *Pharmacogenomics J* 2015;15(4):354–62. DOI: 10.1038/tpj.2014.73
- Birkenkamp-Demtroder K., Olesen S.H., Sorensen F.B. et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005;54(3):374–84. DOI: 10.1136/gut.2003.036848
- Missiaglia E., Jacobs B., D'Ario G. et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features. *Ann Oncol* 2014;25(10):1995–2001. DOI: 10.1093/annonc/mdu275
- Xu S.Z., Ding Z.J., Zhang S.F. et al. Propensity score matching-based analysis of short-term outcomes of Laparoscopic-assisted Natural Orifice Specimen Extraction for left colorectal cancer radical resection. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2016;96(20):1578–81. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.20.007
- Dejea C.M., Wick E.C., Hechenbleikner E.M. et al. Microbiota organization is a distinct feature of proximal colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(51):18321–6. DOI: 10.1073/pnas.1406199111
- Almutairi M.H., Alrubie T.M., Almutairi B.O. et al. The Expression Patterns of Human Cancer-Testis Genes Are Induced through Epigenetic Drugs in Colon Cancer Cells. *Pharmaceutical* 2022;15(11):1319. DOI: 10.3390/ph15111319
- Thomas J., Starmans M.H.W., Yao-Tsang C. et al. The Role of Cancer-Testis Antigens as Predictive and Prognostic Markers in Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One* 2013;8(7):e67876. DOI: 10.1371/journal.pone.0067876

Вклад авторов

Н.Р. Хилал: написание текста рукописи, получение данных для анализа, статистический анализ полученных данных, обзор публикаций по теме статьи;

Д.В. Новиков: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

В.Н. Якимов: статистический анализ полученных данных;

Р.Г. Пегов: сбор биологического материала;

В.В. Новиков: разработка дизайна исследования, редактирование текста рукописи.

Author's contributions

N.R. Hilal: writing the text of the manuscript, obtaining data for analysis, statistical analysis of the obtained data, review of publications on the topic of the article;

D.V. Novikov: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;

V.N. Yakimov: statistical analysis of the data obtained;

R.G. Pegov: collection of biological material;

V.V. Novikov: research design development, manuscript editing.

ORCID авторов /ORCID of authors

Н.Р. Хилал / N.R. Hilal: <https://orcid.org/0000-0001-8367-6118>

Д.В. Новиков / D.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

В.Н. Якимов / V.N. Yakimov: <https://orcid.org/0000-0001-7150-7851>

Р.Г. Пегов / R.G. Pegov: <https://orcid.org/0000-0003-1614-9347>

В.В. Новиков / V.V. Novikov: <https://orcid.org/0000-0002-2449-7213>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients signed informed consent to participate in the study.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 15.02.2023. Принята в печать: 12.07.2023

Article received: 15.02.2023. Accepted for publication: 12.07.2023

Определение статуса микросателлитной нестабильности в опухолях больных эндометриодной аденокарциномой яичников и/или тела матки

А.С. Анискина¹, Ю.Г. Паяниди¹, А.М. Строганова¹, И.В. Манина², К.И. Жордания¹

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

²ООО «Институт аллергологии и клинической иммунологии»; Россия, 123104 Москва, ул. Малая Бронная, 20, стр. 1

Контакты: Юлия Геннадьевна Паяниди paian-u@yandex.ru

Введение. Первично-множественные злокачественные новообразования женских половых органов – редко встречающаяся патология. Однако за последние десятилетия в онкологии возрос интерес к изучению данного феномена. Особенно это касается вопросов диагностики синхронной эндометриодной аденокарциномы яичников и тела матки, которые гистогенетически относятся к одному и тому же зародышевому листку и имеют одинаковое гистологическое строение. До недавнего времени в этих случаях клиницисты опирались только на морфологическое исследование, но с развитием молекулярно-генетических технологий появились и новые возможности в диагностике.

Цель исследования – определение статуса микросателлитной нестабильности (MSI) в опухолях больных эндометриодной аденокарциномой яичников и/или тела матки.

Материалы и методы. Проведено пилотное ретроспективное молекулярно-генетическое исследование ($n = 48$) – определение статуса MSI в опухолях яичников и/или тела матки: 33 больных солитарным эндометриодным раком яичников и 15 больных синхронной эндометриодной аденокарциномой яичников и тела матки. Определение статуса MSI проводили методом полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом на приборе ABI PRISM 3500 (8 capillaries, Applied Biosystems). ДНК выделяли из парафиновых блоков операционного материала с использованием набора реагентов «ДНКсорб В» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкции производителя. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на приборе Qubit 2.0 (Life Technologies, США). Полученные данные анализировали с помощью программы GeneMapper (Thermo Fisher, США). В случае полиморфности 2 и более маркеров регистрировали микросателлитную нестабильность высокого уровня (MSI-H).

Результаты. При солитарном эндометриодном раке ($n = 33$) частота встречаемости MSI-H составила 12,1 % (4 случая), а при синхронных опухолях яичников и тела матки ($n = 15$) частота MSI-H – 20 % (3 случая). При этом встречались только случаи сочетания эндометриодных гистотипов рака яичников и тела матки с тождественным статусом MSI. Таким образом, частота встречаемости MSI-H при синхронной эндометриодной аденокарциноме яичников и тела матки (20 %) сопоставима с частотой встречаемости при солитарном раке эндометрия.

Заключение. Наше пилотное исследование стало важным дополнением опубликованных ранее материалов, поскольку позволило уточнить клональное происхождение опухолей у больных эндометриодной аденокарциномой яичников и тела матки, что может повлиять на стратификацию лечебной тактики этой категории пациентов.

Ключевые слова: полинеоплазия, эндометриодная аденокарцинома, микросателлитная нестабильность, рак яичников, рак эндометрия

Для цитирования: Анискина А.С., Паяниди Ю.Г., Строганова А.М. и др. Определение статуса микросателлитной нестабильности в опухолях больных эндометриодной аденокарциномой яичников и/или тела матки. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):36–42. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-36-42

Detection of a status of microsatellite instability in tumors of patients with endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and/or of uterine corpus

Anastasiia S. Aniskina¹, Julia G. Payanidi¹, Anna M. Stroganova¹, Irina V. Manina², Kirill I. Zhordania¹

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

²Limited Liability Company Institute of Allergology and Clinical Immunology of the Russian Federation; Bld. 1, 20 Malaya Bronnaya St., Moscow 123104, Russia

Contacts: Julia G. Payanidi paian-u@yandex.ru

Introduction. Multiple primary malignant neoplasms of female reproductive organs are a rare pathology. However, over the past decades, there has been an upsurge of interest in the study of this phenomenon in oncology. This is particularly the case for the diagnosis of synchronous endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and uterine corpus, which histogenetically belong to the same germ layer and have similar histological structure. Until recently, clinicians relied only on morphological examination in these cases, but with the development of molecular genetic technologies, new diagnostic possibilities have emerged.

Aim. Is the detection of the status of microsatellite instability in tumors of patients with endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and/or uterine corpus.

Materials and Methods. A pilot retrospective molecular genetic study ($n = 48$) was conducted to determine the status of microsatellite instability (MSI) in the tumors of the ovaries and/or uterine corpus: it involved 33 patients with solitary endometrioid ovarian cancer and 15 patients with synchronous endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and uterine corpus. Microsatellite instability status was detected using PCR method with subsequent fragment analysis performed on ABI PRISM 3500 genetic analyzer (8 capillaries, Applied Biosystems). DNA was isolated from paraffin blocks of surgical specimens using DNAsorb B extraction kit (AmpliSens, Russia), according to the manufacturer's manual. DNA concentration was estimated fluorometrically using Qubit 2.0 (Life Technologies, USA). The obtained data were analyzed using GeneMapper program (Thermo Fisher, USA). In case of polymorphism of two and more markers high-level microsatellite instability (MSI-H) was observed.

Results. The incidence of MSI-H in solitary endometrioid ovarian cancer ($n = 33$) was 12,1 % (4 cases), while in synchronous ovarian and uterine corpus tumors ($n = 15$) MSI-H incidence made up 20 % ($n = 3$). Herewith, there have been only cases of a combination of endometrioid histotypes of ovarian and endometrial cancer with identical status of microsatellite instability. Thus, the incidence of MSI-H in synchronous endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and uterine corpus (20 %) is comparable to that in solitary endometrial cancer.

Conclusion. Our pilot study became a significant complement to the previously published materials, as it allowed to confirm the clonal origin of tumors in patients with endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and uterine corpus, that can affect the stratification of treatment strategy for this category of patients.

Keywords: polyneoplasia, endometrioid adenocarcinoma, microsatellite instability, ovarian cancer, endometrial cancer

For citation: Aniskina A.S., Payanidi J.G., Stroganova A.M. et al. Detection of a status of microsatellite instability in tumors of patients with endometrioid adenocarcinoma of the ovaries and/or of uterine corpus. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):36–42. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-36-42

Введение

Микросателлитная нестабильность (MSI) высокого уровня (MSI-H) диагностируется при многих злокачественных новообразованиях, в том числе и при онкогинекологических заболеваниях. R. Bonneville и соавт. показали то, что MSI-H в опухолях имеют более чем 30 % больных раком эндометрия [1]. MSI выявляется и при других гинекологических злокачественных новообразованиях, таких как аденокарцинома яичников. Кроме того, описаны случаи карциномы матки, плоскоклеточного рака шейки матки с MSI-H [1].

Микросателлитная нестабильность высокого уровня — это проявление нарушения функциониро-

вания системы репарации неправильно спаренных нуклеотидов (dMMR). В результате dMMR наблюдаются мутации в различных генах с микросателлитными повторами, которые, как полагают, являются факторами, увеличивающими риск развития злокачественных опухолей. М. Kawaguchi и соавт., проанализировав мутации, обнаруженные у 22 больных спорадическим раком эндометрия с MSI-H, предложили каскадную этиологию канцерогенеза, при которой гены с мутациями в микросателлитных повторах могут усиливать геномную нестабильность и вызывать накопление мутаций и дефектов других генов, связанных с канцерогенезом [2]. Идентификация этих генов важна для выявления и лечения

онкогинекологической патологии, обусловленной dMMR/MSI.

Мутационная нагрузка и гены-мишени отличаются между различными типами злокачественных опухолей с dMMR/MSI. Установлено, что гены, мутации в которых выявляются при раке толстой кишки и желудка, имеют низкую частоту мутаций при онкогинекологических заболеваниях. В частности, было отмечено, что мутации в генах *BRAF*, *TGF β RII* и *BCL-10* часто встречаются при колоректальном раке и раке желудка, но редко — при раке эндометрия или раке яичников [3–7]. Однако у 40 % пациентов с раком эндометрия обнаруживаются мутации в гене *JAK1*, а у больных колоректальным раком — менее чем в 10 % наблюдений [8]. Более того, Y.K. Wang и соавт. показали, что в 50 % случаев эндометриоидного рака с MSI выявлялись мутации в гене *RPL22*, в отличие от гена *TP53*, мутации в котором были отмечены в 40 % случаев эндометриоидных опухолей с отсутствием MSI [9].

Необходимо подчеркнуть, что рак эндометрия с позиции статуса MSI представляет собой самую изученную нозологию среди всех онкогинекологических заболеваний. Приблизительно в 30 % наблюдений канцерогенез рака эндометрия связан с dMMR, а тестирование dMMR при этой патологии стало уже рутинным. В 5–10 % случаев дефицит системы MMR обусловлен герминальными мутациями в генах репарации неспаренных оснований *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. Герминальные мутации в этих генах связаны с повышенным риском развития рака эндометрия и яичников наряду со злокачественными новообразованиями толстой кишки, желудка, мочевыводящих путей и головного мозга [10].

Определение dMMR/MSI при онкогинекологических заболеваниях важно для выяснения механизмов развития и прогрессирования опухоли, а также для диагностики и определения терапевтической тактики.

Цель исследования — определение статуса MSI в опухолях больных эндометриоидной аденокарциномой яичников и/или тела матки.

Материалы и методы

Было проведено ретроспективное молекулярно-генетическое исследование ($n = 48$) — определение статуса MSI в опухолях яичников и/или тела матки: 33 больных солитарным эндометриоидным раком яичников (ЭРЯ) и 15 больных синхронной эндометриоидной аденокарциномой яичников и тела матки.

Определение статуса MSI проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим фрагментным анализом на приборе ABI PRISM 3500 (8 capillaries, Applied Biosystems).

ДНК выделяли из парафиновых блоков операционного материала с использованием набора реагентов «ДНКсорб В» («АмплиСенс», Россия) согласно ин-

струкции производителя. Концентрацию ДНК измеряли флуориметрически на приборе Qubit® 2.0 (Life Technologies, США).

Для определения статуса MSI использовали панель из 5 квазимономорфных микросателлитных локусов (NR21, NR24, NR27, BAT25, BAT26). Мультиплексную ПЦР проводили с соблюдением следующих условий: начальная денатурация — 5 мин при 95 °C, затем 35 циклов (денатурация по 15 с при 95 °C, отжиг при 57 °C, элонгация при 72 °C) и заключительная элонгация 60 с при 72 °C. Диапазон длин нормальных ПЦР-продуктов составлял от 93 до 182 пар нуклеотидов. Флуоресцентно меченный ПЦР-продукт, смешанный с Hi-Di формамидом, маркером длин GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard (Thermo Fisher, США) загружали в генетический анализатор ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США). Запуск осуществляли по протоколу производителя. Полученные данные анализировали с помощью программы GeneMapper (Thermo Fisher, США). В случае полиморфности двух и более маркеров регистрировали MSI-H.

Результаты

Среди 48 исследованных образцов овариальной карциномы в 7 (14,6 %) случаях выявлена MSI-H (рис. 1), в 1 (2,1 %) случае — микросателлитная нестабильность низкого уровня (MSI-L) и в 40 (83,3 %) случаях — отсутствие признаков микросателлитно стабильной опухоли (MSS) (рис. 2). Из 15 образцов карциномы тела матки: в 12 (80,0 %) образцах отсутствовали признаки MSS, в 3 (20,0 %) была выявлена MSI-H. Среди 7 случаев MSI-H-опухолей яичников в 4 (57,1 %) наблюдался солитарный ЭРЯ; а в 3 (42,9 %) случаях эндометриоидная аденокарцинома яичников сочеталась с эндометриоидной аденокарциномой тела матки MSI-H. Среди больных с MSS или MSI-L ($n = 41$) в 28 случаях обнаружен солитарный ЭРЯ, а в 11 случаях эндометриоидная аденокарцинома яичников сочеталась с эндометриоидной аденокарциномой тела матки (в 10 случаях синхронно, а в 1 — метакронно), в 1 случае ЭРЯ сочетался с метакронным раком молочной железы, и в 1 случае имелись сочетанные первично-множественные злокачественные опухоли (ПМЗО): синхронные эндометриоидные аденокарциномы яичников и тела матки и метакронный светлоклеточный рак почки.

В 4 (57,1 %) из 7 случаев MSI-H-ЭРЯ при гистологическом исследовании операционного материала имелись указания на аденомиоз. В 6 (85,7 %) из 7 случаев заболевание было выявлено на ранних стадиях: IA-стадия — в 3 (42,9 %) случаях; на стадии IC1, IC3 и IV приходилось по 1 (14,3 %) случаю. Только в 1 (14,3 %) наблюдении был ЭРЯ IIIA2-стадии. Кроме того, у 5 (71,4 %) больных был выявлен ЭРЯ low-grade, у 2 (28,6 %) — high-grade.

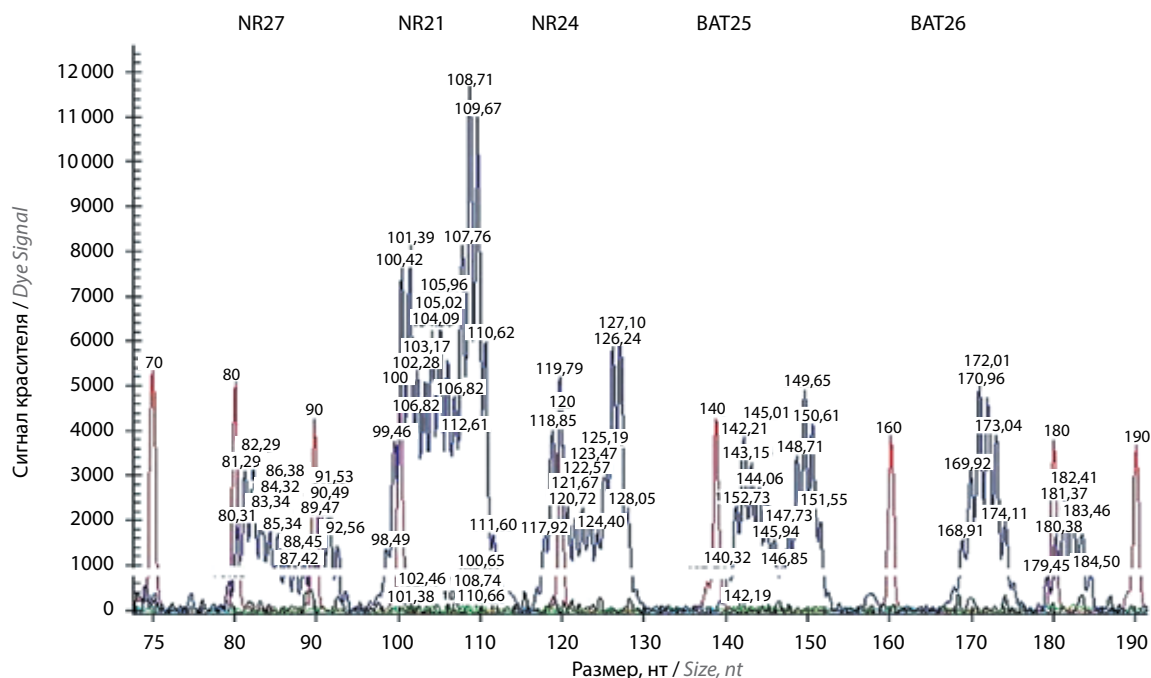


Рис. 1. Микросателлитно нестабильная опухоль (MSI-H). Панель маркеров Bethesda, состоящая из 5 мононуклеотидных повторов: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27

Fig. 1. Microsatellite unstable tumor (MSI-H). Panel of marker Bethesda, consisting of 5 mononucleotide repeats: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27

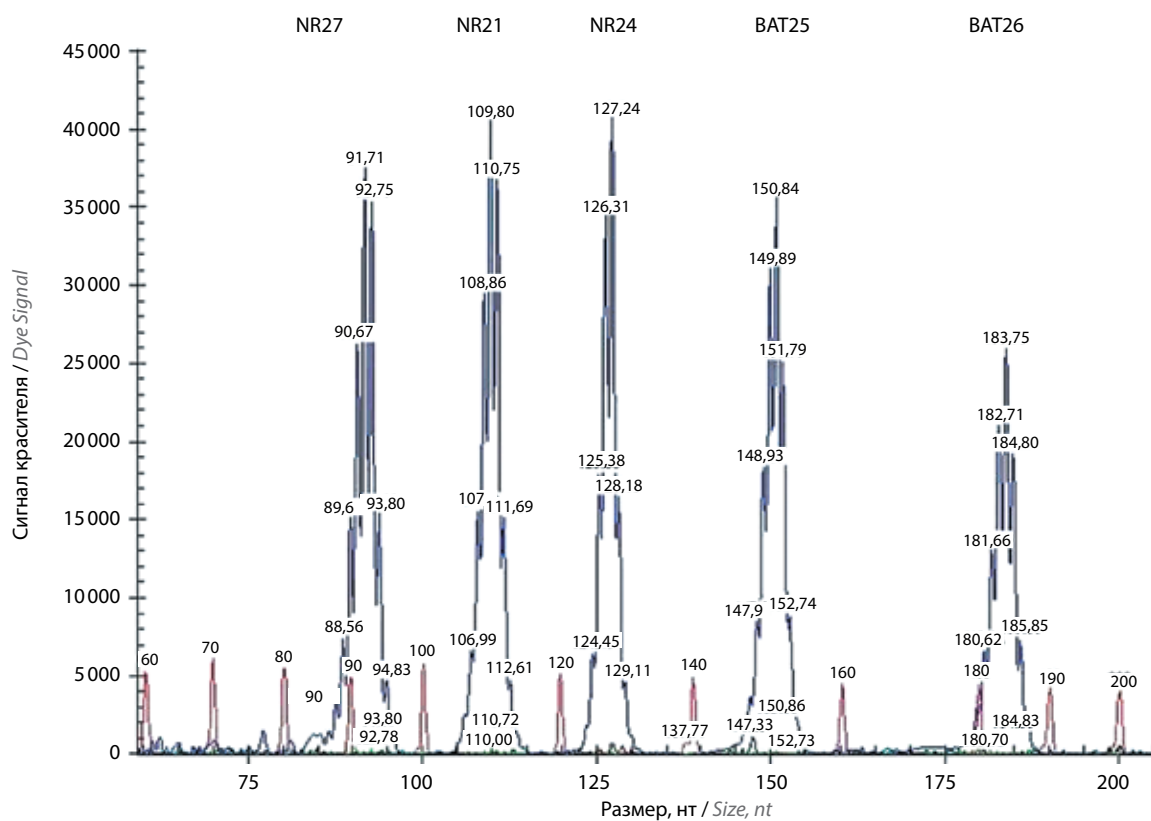


Рис. 2. Микросателлитно стабильная опухоль (MSS). Панель маркеров Bethesda, состоящая из 5 мононуклеотидных повторов: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27

Fig. 2. Microsatellite stable (MSS). Panel of marker Bethesda, consisting of 5 mononucleotide repeats: BAT25, BAT26, NR21, NR24, NR27

При подгрупповом анализе получены практически сопоставимые данные о частоте выявления MSI-H, MSI-L или MSS-статуса опухоли яичников ($p = 0,798$) (табл. 1).

Таблица 1. Статус MSI в опухолях яичников при солитарном ЭРЯ и ПМЗО

Table 1. MSI status in ovarian tumors in solitary endometrioid ovarian cancer and in multiple primary malignant tumors

Статус MSI MSI status	ЭРЯ, n (%) EOC, n (%)	ПМЗО, n (%) MPMT, n (%)
MSS	28 (84,4)	12 (80)
MSI-L	1 (3,1)	0
MSI-H	4 (12,1)	3 (20)
Всего Total	33 (100)	15 (100)

Примечание. ЭРЯ — эндометриоидный рак яичников; ПМЗО — первично-множественные злокачественные опухоли

Note. EOC — endometrioid ovarian cancer; MPMT — multiple primary malignant tumors

При анализе сочетаний статуса MSI при ПМЗО в опухолях яичников и тела матки получены следующие данные (табл. 2).

Таблица 2. Статус MSI в опухолях яичников и тела матки при ПМЗО

Table 2. MSI status in the tumors of the ovaries and uterine corpus in multiple primary malignant tumors

Статус MSI MSI status		Карцинома тела матки Uterine corpus carcinoma		
		MSI-статус не определен MSI status not identified	MSS	MSI-H
Эндометриоидный рак яичников Endometrioid ovarian cancer	MSS	0	12	0
	MSI-H		0	3

Таким образом, при солитарном ЭРЯ ($n = 33$) частота встречаемости MSI-H составила 12,1 % (4 случая), а при синхронных опухолях яичников и тела матки ($n = 15$) — 20 % (3 случая). При этом встречались только случаи сочетания эндометриоидных гистотипов рака яичников и тела матки с тождественным статусом MSI.

Обсуждение

Изучение статуса MSI имеет большое практическое значение, поскольку нарушение репарации

MMR из-за наследственных (герминальных) или соматических мутаций может приводить к изменениям, в частности, в последовательностях микросателлитных повторов, вызывающих MSI. Известно, что MSI-H связана с высокой частотой мутаций, которые обнаруживаются в опухолях с дефектной системой репарации MMR [11]. Нарушение MMR может быть вызвано как генетическими, так и эпигенетическими механизмами. Лица с герминальными мутациями в генах *MMR* имеют повышенный риск развития определенных опухолей. В качестве примера можно привести синдром Линча. Потеря второго аллеля (потеря гетерозиготности (LOH)) из-за соматической мутации или эпигенетических событий еще больше усугубляет дисфункцию клеток и приводит к онкогенезу [3]. Тем не менее исследователями установлено, что в некоторых случаях гены *MMR* в зависимости от типа гена и типа мутации могут проявлять онкогенное влияние по доминантному принципу. Считают также, что инактивацию системы MMR вызывают эпигенетические изменения, такие как метилирование *MLH1*, и запускают возникновение рака [12].

S.B. Simpkins и соавт. показали, что 77 % спорадических случаев рака эндометрия имели MSI из-за метилированного промотора *MLH1* [13]. Кроме того, мутации в генах *MMR* являются 2-й по значимости причиной наследственного рака яичников, на долю которого приходится 10–15 % случаев [14], что в основном связывают с генами *MLH1* или *MSH2*. В исследовании 2006 г. сообщалось о том, что у пациенток с синдромом Линча с мутацией *MSH6* риск возникновения рака яичников в течение жизни составлял 33 % [15]. Однако эти исследования ограничены размером выборки, изучаемой популяцией и методами исследования, в результате чего точный уровень риска до сих пор неизвестен [16]. Исследование C.R. Espenschied и соавт., в котором изучали больных с синдромом Линча с помощью мультигеновой панели, показало, что из 528 пациенток с мутациями MMR у 11,9 % был рак молочной железы, а у 27,3 % — колоректальный рак, причем мутации *MSH6* и *PMS2* встречались чаще, чем мутации *MLH1* и *MSH2* [17]. Несмотря на то, что клинические исследования, оценивающие риск развития рака молочной железы у больных с dMMR/MSI, не являются окончательными, было высказано предположение о том, что риск возникновения рака молочной железы может варьироваться в зависимости от гена [18]. Так, было обнаружено, что мутации в генах *MSH6* и *PMS2* увеличивают риск возникновения рака молочной железы на 30 и 35 % соответственно [18].

Особый интерес, на наш взгляд, заслуживает исследование I. Sakamoto и соавт., проведенное в 2023 г., где с помощью микросателлитного анализа авторы пытались выяснить геномное происхождение синхронного

рака яичников и рака эндометрия [19]. Ранее в нескольких исследованиях сообщалось о том, что дефицит MMR был наиболее частым при раке эндометрия (20–30 %), тогда как при раке яичников это было редкостью (0,5–12 %) [1, 20, 21]. В текущем исследовании частота встречаемости MSI-H при синхронных опухолях яичников и эндометрия составила 24 %, что сопоставимо с частотой рака эндометрия, на основании чего авторы пришли к выводу о том, что синхронные эндометриодные аденокарциномы яичников и тела матки с MSI-H, вероятно, являются метастазами рака эндометрия в яичниках, а не ПМЗО [19]. Так же и в нашей работе: при солитарном ЭРЯ частота встречаемости MSI-H составила 12,1 %, а при синхронной эндометриодной аденокарциноме яичников и тела матки – 20 %, что сопоставимо с частотой встречаемости при солитарном раке эндометрия.

Кроме того, некоторые эксперты утверждают, что частота встречаемости MSI-H при синхронных карциномах яичников и тела матки может быть выше, чем при солитарном раке эндометрия. У таких пациенток могут быть хорошие шансы при применении иммунотерапии.

Заключение

До недавнего времени в клинической практике выявляли опухоли с дефицитом MMR и/или MSI-H, обусловленными герминальными мутациями в генах системы MMR, поскольку у таких больных повышен риск развития ПМЗО, связанных с синдромом Линча. Кроме того, выявление пациентов с синдромом Линча позволяет проводить генетическое тестирова-

ние и разрабатывать стратегии профилактики рака у кровных родственников.

Недавние достижения в иммунотерапии злокачественных опухолей добавили новые возможности лечения dMMR/MSI-заболеваний. Иммунотерапия антителами против PD-1 в настоящее время включена в международные клинические рекомендации для первой линии терапии рака тела матки с дефицитом MMR или MSI-H. Вместе с тем выживаемость и ответ на лечение при других онкогинекологических заболеваниях, связанных с дефектом MMR, еще недостаточно изучены. Более того, согласно отечественным и международным клиническим рекомендациям при одновременном поражении эндометриодной аденокарциномой тела матки и яичников/малого таза на фоне эндометриоза опухоли следует трактовать как первично-множественные, что противоречит результатам нашего исследования, а также данным I. Sakamoto и соавт. [19]. Необходимо подчеркнуть, что сегодня число работ, посвященных вопросам полинеоплазии, невелико, а проведенное нами пилотное исследование является важным дополнением к опубликованным ранее материалам [22], поскольку оно позволило уточнить клональное происхождение опухолей у больных эндометриодной аденокарциномой яичников и тела матки. Это может повлиять на стратификацию лечебной тактики этой категории пациенток и, как следствие, приведет к улучшению их выживаемости, снижению смертности. Таким образом, существует необходимость продолжать научные поиски и разработки новых маркерных панелей, специфичных для онкогинекологической патологии, которые можно использовать для эффективной диагностики, скрининга и лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bonneville R., Krook M.A., Kautto E.A. et al. Landscape of microsatellite instability across 39 cancer types. *JCO Precis Oncol* 2017;2017:PO.17.00073. DOI: 10.1200/PO.17.00073
- Kawaguchi M., Banno K., Yanokura M. et al. Analysis of candidate target genes for mononucleotide repeat mutation in microsatellite instability-high (MSI-H) endometrial cancer. *Int J Oncol* 2009;35:977–82. DOI: 10.3892/ijo_00000411
- Cortes-Ciriano I., Lee S., Park W.-Y. et al. A molecular portrait of microsatellite instability across multiple cancers. *Nat Commun* 2017;8:15180. DOI: 10.1038/ncomms15180
- Alvi A.J., Rader J.S., Brogini M. et al. Microsatellite instability and mutational analysis of transforming growth factor β receptor type II gene (TGF β R2) in sporadic ovarian cancer. *Mol Pathol* 2001;54(4):240–3. DOI: 10.1136/mp.54.4.240
- Metcalfe A.M., Spurdle A.B. Endometrial tumour BRAF mutations and MLH1 promoter methylation as predictors of germline mismatch repair gene mutation status: A literature review. *Fam Cancer* 2014;13(1):1–12. DOI: 10.1007/s10689-013-9671-6
- Johannsdottir J.T., Jonasson J.G., Bergthorsson J.T. et al. The effect of mismatch repair deficiency on tumourigenesis; microsatellite instability affecting genes containing short repeated sequences. *Int J Oncol* 2000;16(1):133–42. DOI: 10.3892/ijo.16.1.133
- Codegoni A.M., Bertoni F., Colella G. et al. Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer. *Oncol Res* 1999;11(7):297–301. PMID: 10757443
- Albacker L.A., Wu J., Smith P. et al. Loss of function JAK1 mutations occur at high frequency in cancers with microsatellite instability and are suggestive of immune evasion. *PLoS ONE* 2017;12(11):e0176181. DOI: 10.1371/journal.pone.0176181
- Wang Y.K., Bashashati A., Anglesio M.S. et al. Genomic consequences of aberrant DNA repair mechanisms stratify ovarian cancer histotypes. *Nat Genet* 2017;49(6):856–65. DOI: 10.1038/ng.3849
- Паяниди Ю.Г., Жордания К.И., Сельчук В.Ю. и др. Хирургическая тактика в лечении больных при синдроме Линча. *Онкогинекология* 2014;1:19–25. Payanidi J.G., Zhordania K.I., Seljchuk V.Yu. et al. Surgical tactics for the treatment of patients with lynch syndrome. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2014;1:19–25. (In Russ.)

11. Li G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 2008;18(1):85–98. DOI: 10.1038/cr.2007.115
12. Shilpa V., Rahul B., Premalata C.S. et al. Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. *Genomics* 2014;104(4):257–63. DOI: 10.1016/j.ygeno.2014.08.016
13. Simpkins S.B., Bocker T., Swisher E.M. et al. MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 1999;8(4):661–6. DOI: 10.1093/hmg/8.4.661
14. Moreira L., Balaguer F., Lindor N. et al. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* 2012;308(15):1555–65. DOI: 10.1001/jama.2012.13088
15. Cederquist K., Emanuelsson M., Wiklund F. et al. Two Swedish founder MSH6 mutations, one nonsense and one missense, conferring high cumulative risk of Lynch syndrome. *Clin Genet* 2005;68(6):533–41. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2005.00537.x
16. Pal T., Permuth-Wey J., Sellers T.A. A review of the clinical relevance of mismatch-repair deficiency in ovarian cancer. *Cancer* 2008;113(4):733–42. DOI: 10.1002/cncr.23601
17. Espenschied C.R., LaDuca H., Li S. et al. Multigene panel testing provides a new perspective on Lynch syndrome. *JCO* 2017;35(22):2568–75. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.9260
18. Roberts M.E., Jackson S.A., Susswein L.R. et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med* 2018;20(10):1167–74. DOI: 10.1038/gim.2017.254
19. Sakamoto I., Hirotsu Y., Amemiya K. et al. Elucidation of genomic origin of synchronous endometrial and ovarian cancer (SEO) by genomic and microsatellite analysis. *J Gynecol Oncol* 2023;34(1):e6. DOI: 10.3802/jgo.2023.34.e6
20. Le D.T., Durham J.N., Smith K.N. et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017;357(6349):409–13. DOI: 10.1126/science.aan6733
21. Hause R.J., Pritchard C.C., Shendure J., Salipante S.J. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. *Nat Med* 2016;22(11):1342–50. DOI: 10.1038/nm.4191
22. Паяниди Ю.Г., Жордания К.И., Логинов В.И. и др. Эндометриоз и канцерогенез яичников. *Онкогинекология* 2017;2:29–36. Payanidi J.G., Zhordania K.I., Loginov V.I. et al. Endometriosis and carcinogenesis of the ovary. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2017;2:29–36. (In Russ.)

Вклад авторов

А.С. Анискина, Ю.Г. Паяниди, А.М. Строганова, И.В. Манина, К.И. Жордания: сбор данных и участие в написании текста статьи.

Author's contributions

A.S. Aniskina, J.G. Payanidi, A.M. Stroganova, I.V. Manina, K.I. Zhordania: data collection and participation in writing the text of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.С. Анискина / A.S. Aniskina: <https://orcid.org/0009-0005-1032-2905>

Ю.Г. Паяниди / J.G. Payanidi: <https://orcid.org/0000-0001-5704-1004>

А.М. Строганова / A.M. Stroganova: <https://orcid.org/0000-0002-7297-5240>

И.В. Манина / I.V. Manina: <https://orcid.org/0000-0002-4674-5484>

К.И. Жордания / K.I. Zhordania: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3710>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients signed informed consent to participate in the study.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 05.06.2023. Принята к публикации: 15.08.2023

Article received: 05.06.2023. Accepted for publication: 15.08.2023

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-43-50>

Изменение концентрации метаболитов в моче как малоинвазивный маркер серозной аденокарциномы яичников

О.Н. Гуськова¹, И.А. Аллилуев¹, Е.В. Вереникина¹, В.В. Половодова¹, М.А. Рогозин¹, Т.Ю. Мягкова¹, М.Л. Адамян¹, О.Е. Женило¹, Н.М. Абдуллаева¹, М.Р. Цандекова², Н.Д. Ушакова¹, Д.С. Кутилин¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии» Минздрава России; Россия, 344037 Ростов-на-Дону, ул. 14-я линия, 63;

²ГБУЗ «Клинический онкологический диспансер № 1» Минздрава Краснодарского края; Россия, 350040 Краснодар, ул. Димитрова, 146

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

Введение. Приоритетной задачей онкогинекологии считается выявление рака яичников (РЯ) на максимально ранних стадиях, так как показатели 5-летней выживаемости значительно снижаются при прогрессировании заболевания. В настоящее время существует огромная потребность в более эффективных диагностических методах и подходах. В последние годы в прецизионной медицине все больше внимания уделяется жидкостной биопсии, поскольку она является минимально инвазивной и может повторяться многократно, что позволяет проводить мониторинг заболевания в режиме реального времени.

Цель исследования – изучение метаболомного профиля мочи пациентов с серозной карциномой яичников.

Материалы и методы. В работе для выполнения метаболомного анализа были отобраны 50 проб мочи пациенток с диагнозом «серозная карцинома яичников» и 20 проб условно здоровых индивидуумов. Для осаждения белков 300 мкл мочи смешивали с 600 мкл раствора ацетонитрила LC-MS (Merck, Германия) и метанола LC-MS (Merck, Германия) (соотношение 3:1). Хроматографическое разделение метаболитов проводили на хроматографе Vanquish Flex UHPLC System (Thermo Scientific, Германия). Хроматограф был сопряжен с масс-спектрометром Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific, Германия), имеющим электроспрейный источник ионизации. Хроматографическое разделение проводили на колонке Hypersil GOLD™ C18 (1,9 мкм, 10 × 2,1 мм), используя следующие элюенты: А – 0,1 % муравьиная кислота, В – ацетонитрил, содержащий 0,1 % муравьиной кислоты.

Результаты. В ходе исследования методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием суммарно идентифицировано 417 метаболитов различных классов. Показано, что в моче у пациенток с РЯ 14 метаболитов (кинуренин, фенилаланил-валин, лизофосфатидилхолин (18:3), лизофосфатидилхолин (18:2), аланил-лейцин, лизофосфатидилхолин (20:4), L-фенилаланин, фосфатидилинозитол (34:1), 5-метокситриптофан, 2-гидроксимиристиновая кислота, 3-оксохоловая кислота, лизофосфатидилхолин (14:0), индолакриловая кислота, лизофосфатидилсерин (20:4)) имеют значимо более высокую концентрацию по сравнению с условно здоровыми индивидуумами. Содержание 12 соединений, наоборот, понижено (L-бета-аспартил-L-фенилаланин, миристиновая кислота, деканоилкарнитин, аспартил-глицин, малонилкарнитин, 3-гидроксипутирилкарнитин, 3-метилксантин, 2,6-диметилгептаноилкарнитин, 3-оксододекановая кислота, N-ацетилпролин, L-октаноилкарнитин, каприлоилглицин). Это свидетельствует о значительном метаболомном дисбалансе у пациенток с РЯ.

Заключение. Проведенное исследование метаболомного профиля мочи методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием показало, что у пациенток с серозной карциномой яичников наблюдается дисбаланс в содержании некоторых жирных кислот и их производных, ацилкарнитинов, фосфолипидов, аминокислот и их производных, а также некоторых производных азотистых оснований. При этом 26 метаболитов с аномальной концентрацией в моче могут иметь определенный потенциал в качестве неинвазивных биомаркеров РЯ у женщин, относящихся к группам высокого риска.

Ключевые слова: метаболомный профиль, моча, высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, серозная аденокарцинома яичника

Для цитирования: Гуськова О.Н., Аллилуев И.А., Вереникина Е.В. и др. Изменение концентрации метаболитов в моче как малоинвазивный маркер серозной аденокарциномы яичников. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):43–50. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-43-50

Changes in urine metabolite concentration as a minimally invasive marker of ovarian serous adenocarcinoma

Olga N. Guskova¹, Ilya A. Alliluyev¹, Ekaterina V. Verenikina¹, Veronica V. Polovodova¹, Ark A. Rogozin¹, Tatiana Yu. Myagkova¹, Mary L. Adamyan¹, Oksana E. Zhenilo¹, Nina M. Abdullaeva¹, Marietta R. Tsandekova², Denis S. Kutilin¹

¹National Medical Research Oncology Center, Ministry of Health of Russia; 63 St. 14th Liniya, Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Clinical Oncological Dispensary No. 1; 146 Dimitrova St., Krasnodar 350040, Russia

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

Introduction. Detection of ovarian cancer (OC) at the earliest possible stages is a priority for gynecological oncology, since 5-year survival rates decrease significantly with the progression of the disease. Currently, there is a huge need for more effective diagnostic methods and approaches. In recent years, fluid biopsy has received increasing attention in precision medicine because it is minimally invasive and can be repeated many times, allowing for real-time disease monitoring.

Aim. Study of the urine metabolomic profile of patients with ovarian carcinoma.

Materials and methods. To perform metabolomic analysis, 50 urine samples from patients with a diagnosis of serous ovarian carcinoma and 20 samples from apparently healthy individuals were selected. For protein precipitation, 300 mkl of urine was mixed with 600 mkl of a solution of acetonitrile LC-MS (Merck, Germany) and methanol LC-MS (Merck, Germany) (3:1 ratio). Chromatographic separation of metabolites was performed on a Vanquish Flex UHPLC System chromatograph (Thermo Scientific, Germany). The chromatograph was coupled to an Orbitrap Exploris 480 mass spectrometer (Thermo Scientific, Germany) equipped with an electrospray ionization source. Chromatographic separation was carried out on a Hypersil GOLD™ C18 column (1.9 mkm, 10 × 2.1 mm) using the following eluents: A, 0.1 % formic acid; B, acetonitrile containing 0.1 % formic acid.

Results. A total of 417 metabolites of various classes were identified by HPLC-MS. It was shown that in the urine of patients with OC 14 metabolites (kynurenine, phenylalanyl-valine, lysophosphatidylcholine (18:3), lysophosphatidylcholine (18:2), alanyl-leucine, lysophosphatidylcholine (20:4), L-phenylalanine, phosphatidylinositol (34:1), 5-methoxytryptophan, 2-hydroxymyristic acid, 3-oxocholic acid, lysophosphatidylcholine (14:0), indoleacrylic acid, lysophosphatidylserine (20:4)) had a significantly higher concentration compared to apparently healthy individuals. The content of 12 compounds, on the contrary, was reduced (L-beta-aspartyl-L-phenylalanine, myristic acid, decanoylcarnitine, aspartyl-glycine, malonylcarnitine, 3-hydroxybutyrylcarnitine, 3-methylxanthine, 2,6-dimethylheptanoylcarnitine, 3-oxododecanoic acid, N-acetylproline, L-octanoylcarnitine, capryloylglycine). This indicates a significant metabolomic imbalance in patients with OC.

Conclusion. The metabolomic profile study of urine by UHPLC-MS showed that in patients with serous ovarian carcinoma there is an imbalance in the content of certain fatty acids and their derivatives, acylcarnitines, phospholipids, amino acids and their derivatives, as well as some derivatives of nitrogenous bases. At the same time, 26 metabolites with abnormal concentrations in urine may have some potential as non-invasive biomarkers of OC in women belonging to high-risk groups.

Keywords: metabolomic profile, urine, high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection, serous ovarian adenocarcinoma

For citation: Guskova O.N., Alliluyev I.A., Verenikina E.V. et al. Changes in urine metabolite concentration as a minimally invasive marker of ovarian serous adenocarcinoma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):43–50. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-43-50

Введение

Рак яичников (РЯ) — одно из наиболее агрессивных гинекологических злокачественных новообразований, практически не имеющее клинических проявлений до поздних стадий, когда обычно проявляются неспецифические симптомы, такие как вздутие живота, боли в области таза или живота или нарушения менструального цикла [1].

Несмотря на большую распространенность и высокую летальность, до сих пор не существует эффективных методов ранней диагностики РЯ. Именно поэтому у большинства пациенток диагноз устанавливается на III–IV стадиях, в результате чего пяти-

летняя выживаемость не превышает 30 %. В то же время уровень выживаемости пациенток, диагноз которым был установлен на I стадии заболевания, составляет более 90 % [2]. Показатели рецидива у пациенток с РЯ очень высоки. По данным литературы, у 85 % пациенток с таким заболеванием, которые достигли полной ремиссии после первой линии терапии, возникает рецидив [1].

Одной из задач современной онкогинекологии является поиск эффективных биомаркеров — объективно измеряемых соединений, изменение уровня которых может быть использовано для ранней диагностики и прогнозирования успешности планируемого

лечения. Потенциальный биомаркер должен быть максимально чувствителен и специфичен, а его измерение — минимально инвазивным [3]. Среди онкомаркеров, применяемых для диагностики РЯ, используется определение уровней СА-125 (cancer antigen 125) и HE4 (human epididymis protein 4). Определение уровня HE4 является более чувствительным по сравнению с СА-125 в дифференциальной диагностике рака и доброкачественных новообразований яичников, а также при дифференциальной диагностике эпителиального рака и метастазов. Изменения уровня HE4 происходят на 2–3 месяца раньше, чем СА-125. Однако чувствительность и специфичность данных тестов зачастую недостаточны для выявления заболевания на ранней стадии [4].

Неотъемлемой частью скрининга РЯ является трансвагинальное ультразвуковое исследование (УЗИ), позволяющее точно определить аномалии объема и морфологии яичников, но менее надежное при дифференциации доброкачественных опухолей яичников от злокачественных. При этом УЗИ — метод субъективный, и его результаты в значительной степени зависят от опыта, навыков и умений специалиста [5].

Прижизненное патологоанатомическое исследование является решающим методом в установлении диагноза РЯ и выборе тактики лечения, а также в диагностике возможного рецидива. Однако этот метод анализа опухоли имеет определенные ограничения. Получение биологического материала для выполнения гистологического исследования как наиболее точного метода морфологической верификации РЯ требует проведения хирургического вмешательства [6].

По этой причине в последние годы в прецизионной медицине все больше внимания уделяется жидкостной биопсии, поскольку она является минимально инвазивной и может повторяться несколько раз, что облегчает мониторинг заболевания в режиме реального времени. Несмотря на то, что большинство исследований сосредоточены на идентификации биомаркеров в крови, простота получения такого биологического образца, как моча, предполагает, что этот подход может стать многообещающим для скрининга пациентов на РЯ [7]. По сравнению с кровью моча является абсолютно неинвазивным типом образца и доступна в больших количествах. Кроме того, моча более стабильна по сравнению с плазмой или сывороткой крови в отношении преданалитических процедур обработки [8].

Для поиска потенциальных биомаркеров используют различные подходы, среди них особую популярность в последнее время приобрели так называемые омик-технологии: геномика, транскриптомика, протеомика и метаболомика. С их помощью можно проводить ненаправленный анализ максимально полного спектра соответствующих соединений — нуклеиновых

кислот, белков, низкомолекулярных метаболитов. Метаболомика занимает среди них особое место по ряду причин. Во-первых, она занимается изучением метаболома, т. е. всей совокупности промежуточных или конечных продуктов обмена. Считается, что именно метаболиты наиболее точно отражают изменения фенотипа, поскольку их состав и концентрации непрерывно меняются с колоссальной скоростью. Таким образом, профиль метаболитов является уникальным биохимическим «отпечатком», отражающим протекающие патологические процессы в организме. Уточнение онкометаболитов и модифицированных биохимических путей может расширить пул онкомаркеров для скрининга РЯ [9].

В связи с вышеизложенным **целью исследования** стало изучение метаболомного профиля мочи пациенток с серозной карциномой яичников относительно условно здоровых индивидуумов.

Материалы и методы

Для выполнения метаболомного анализа были отобраны 50 проб мочи пациенток с диагнозом «серозная карцинома яичников» (T1-3cN0-1M0, G1-3) и 20 проб условно здоровых индивидуумов (без выявленных онкологических и гинекологических заболеваний). В каждом случае было получено добровольное информированное согласие на проведение исследований. Критерии исключения из исследования: мета-/синхронный рак, мутация в генах *BRCA1/2*, коморбидная патология (сахарный диабет, острый или хронический воспалительный процесс, и/или инфекционное заболевание), беременность, возраст старше 65 лет.

Для анализа собирали первую утреннюю мочу (среднюю порцию). Не позднее, чем через 25 мин после забора, 6,5 мл мочи центрифугировали при комнатной температуре в течение 10 мин при 1600 g, затем проводили центрифугирование в течение 10 мин при 16 000 g при температуре 4°C; 6 мл полученного образца разделяли на 3 аликвоты по 2 мл, которые помещали в пластиковые криопробирки. Хранение образцов до проведения метаболомного анализа осуществляли при температуре –80°C. Пробы аннотировали, указывая стадию заболевания, возраст больной и т. д. Используемые для анализа пробы замораживали или размораживали не более одного раза.

Для осаждения белков 300 мкл мочи смешивали с 600 мкл смеси ацетонитрила LC-MS (Merck, Германия) и метанола LC-MS (Merck, Германия) (3:1 по объему). Затем образец перемешивали с использованием вортекса и инкубировали в течение 12 ч при температуре –20°C, и осаждали белки на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf, Германия) в течение 15 мин при 16 000 g при 4°C. Супернатант переносили

в чистые пластиковые пробирки (типа Эппендорф), пробу упаривали на вакуумном испарителе SpeedVac (Eppendorf, Германия). Полученный сухой осадок растворяли в смеси ацетонитрила LC-MS (Merck, Германия) и воды (1:3) с 0,1 % муравьиной кислотой (Merck, Германия), затем пробы центрифугировали в течение 10 мин при 16 000 g при 20 °C и полученный супернатант использовали для хромато-масс-спектрометрического анализа.

Хроматографическое разделение метаболитов проводили на хроматографе Vanquish Flex UHPLC System (Thermo Scientific, Германия). Хроматограф был сопряжен с масс-спектрометром Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific, Германия), имеющим электроспрейный источник ионизации. Хроматографическое разделение проводили на колонке Hypersil GOLD™ C18 (1,9 мкм, 10 × 2,1 мм), используя следующие элюенты: А – 0,1 % муравьиная кислота, В – ацетонитрил, содержащий 0,1 % муравьиной кислоты. Температура автосэмплера составляла 4 °C. Использовали следующий градиент элюции: 0–1 мин – 5 % элюента А, 1–5 мин – линейный градиент элюента В с 5 до 25 %, 5–7 мин – 25–55 % элюента В, 7–13 мин – 55–95 % элюента В, 13–14 мин – 95 % элюента В, 0,5 мин – смена элюирующего состава до 5 % элюента В, 1 мин – 5 % элюента В. Температуру колонки поддерживали равной 40 °C. Скорость потока подвижной фазы составляла 250 мкл/мин. Масс-спектры получали в диапазоне отношения массы к заряду, равному 90–900. Для идентификации метаболитов использовали МС/МС-данные пулированного образца мочи. Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Compound Discoverer Software (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты

В ходе проведенного метаболомного профилирования было проанализировано 50 образцов мочи пациенток с РЯ отделения онкогинекологии НМИЦ онкологии Минздрава России и 20 проб условно здоровых индивидуумов.

После контроля качества и предварительной обработки для дальнейшего анализа использовали 417 метаболитов. Путем статистического анализа были выявлены m/z-метаболиты, интенсивность которых в масс-спектрах статистически значимо изменяется. Для данных метаболитов были определены P-value и FoldChange (кратность отличий концентраций в моче пациентов относительно условно здоровых людей) (см. таблицу).

Общей чертой опухолевых клеток является их способность перепрограммировать свой метаболизм для поддержания производства АТФ и макромолекул, низкомолекулярных метаболитов, необходимых для роста, деления и выживания клеток. Согласно результатам исследования метаболом мочи пациенток с серозной карциномой яичников существенно отличался от образцов мочи условно здоровых индивидуумов. Показано, что у пациенток с РЯ концентрация 14 метаболитов (кинуренин, фенилаланил-валин, лизофосфатидилхолин (18:3), лизофосфатидилхолин (18:2), аланил-лейцин, лизофосфатидилхолин (20:4), L-фенилаланин, фосфатидилинозитол (34:1), 5-метокситриптофан, 2-гидроксимиристиновая кислота, 3-оксохоловая кислота, лизофосфатидилхолин (14:0), индолакриловая кислота, лизофосфатидилсерин (20:4)) в моче была значительно выше по сравнению с условно здоровыми индивидуумами. Концентрация 12 соединений (L-бета-аспартил-L-фенилаланин, миристиновая кислота,

Изменение метаболома мочи пациенток с серозной карциномой яичников относительно условно здоровых индивидуумов (12 соединений имели значимо более низкую концентрацию по сравнению с условно здоровыми индивидуумами, содержание 14 соединений повышалось ($p < 0,01$))

Change in the urine metabolome of serous ovarian carcinoma patients relative to apparently healthy individuals (12 compounds had a significantly lower concentration compared with apparently healthy individuals, the content of 14 compounds increased ($p < 0,01$))

Соединение Metabolite	m/z*	Кратность отличий (пациенты/здоровые) Fold Change (patients/healthy)	P-value
Кинуренин Kynurenine	209,09	5,49	$1,37 \times 10^{-5}$
Фенилаланил-валин Phenylalanyl-valine	265,15	1,55	$0,1 \times 10^{-3}$
L-бета-аспартил-L-фенилаланин L-beta-aspartyl-L-phenylalanine	281,11	0,39	$2,78 \times 10^{-9}$
Миристиновая кислота Myristic acid	231,25	0,28	$6,64 \times 10^{-7}$
Лизофосфатидилхолин (18:3) Lysophosphatidylcholine (18:3)	518,32	3,10	$1,78 \times 10^{-9}$

Окончание таблицы
End of table

Соединение Metabolite	m/z*	Кратность отличий (пациенты/здоровые) Fold Change (patients/healthy)	P-value
Лизофосфатидилхолин (18:2) Lysophosphatidylcholine (18:2)	521,33	7,05	$5,91 \times 10^{-12}$
Деканоилкарнитин Decanoylcarnitine	316,24	0,23	$2,29 \times 10^{-9}$
Аспартил-глицин Aspartyl-glycine	208,09	0,28	$1,91 \times 10^{-4}$
Малонилкарнитин Malonylcarnitine	230,10	0,72	$0,10 \times 10^{-3}$
Аланил-лейцин Alanyl-leucine	185,12	1,39	0,09
3-гидроксибутирилкарнитин 3-hydroxybutyryl carnitine	332,33	0,71	0,02
3-метилксантин 3-methylxanthine	167,05	0,61	0,01
Лизофосфатидилхолин (20:4) Lysophosphatidylcholine (20:4)	544,34	3,53	$6,64 \times 10^{-12}$
L-фенилаланин L-phenylalanine	166,08	1,44	$2,16 \times 10^{-5}$
Фосфатидилинозитол (34:1) Фосфатидилинозитол (34:1)	430,77	7,09	$1,45 \times 10^{-10}$
2,6-диметилгептаноилкарнитин 2,6-dimethylheptanoylcarnitine	304,24	0,27	$1,92 \times 10^{-8}$
5-метокситриптофан 5-methoxytryptophan	217,09	1,44	$6,64 \times 10^{-10}$
3-оксододекановая кислота 3-oxododecanoic acid	237,1475	0,65	0,01
2-гидроксимиристиновая кислота 2-hydroxymyristic acid	267,1943	1,29	0,09
3-оксохоловая кислота 3-oxocholic acid	407,2759	1,56	0,01
Лизофосфатидилхолин (14:0) Lysophosphatidylcholine (14:0)	468,3085	1,56	0,03
Индолакриловая кислота Indolacrylic acid	171,0637	1,36	0,03
N-ацетилпролин N-acetylproline	140,0699	0,52	$8,25 \times 10^{-4}$
L-октаноилкарнитин L-octanoylcarnitine	288,2153	0,06	$2,29 \times 10^{-15}$
Каприлоилглицин Capryloyl glycine	202,1437	0,74	0,01
Лизофосфатидилсерин (20:4) Lysophosphatidylserine (20:4)	526,3303	15,98	$1,19 \times 10^{-11}$

Примечание. m/z — соотношение массы и заряда выявленных ионов.
Note. m/z — mass and charge ratio of detected ions.

деканойлкарнитин, аспартил-глицин, малонилкарнитин, 3-гидроксibuтирилкарнитин, 3-метилксантин, 2,6-диметилгептаноилкарнитин, 3-оксодекановая кислота, N-ацетилпролин, L-октаноилкарнитин, каприлоилглицин), наоборот, была понижена.

По данным, представленным в таблице, концентрации в моче большинства производных жирных кислот — 3-гидроксibuтирилкарнитина (в 1,4 раза, $p < 0,05$), 2,6-диметилгептаноилкарнитина (в 3,7 раза, $p < 0,005$), миристиновой кислоты (в 3,6 раза, $p < 0,005$), L-октаноилкарнитина (в 16,7 раза, $p < 0,0001$), малонилкарнитина (в 1,4 раза, $p < 0,05$), деканойлкарнитина (в 4,3 раза, $p < 0,005$) — были снижены у пациенток с опухолью яичников по сравнению с контрольной группой (условно здоровые индивидуумы). В настоящее время широко известно, что раковые клетки демонстрируют значительную перестройку в своем метаболизме липидов и жирных кислот. Существуют убедительные доказательства того, что при некоторых типах рака утилизация жирных кислот увеличивается, в то время как при других этот путь подавляется. Однако изменения не ограничиваются только внутренними клеточными процессами, такими как синтез мембран или роль внутриклеточных вторичных мессенджеров, а также распространяются на ремоделирование всего микроокружения опухоли посредством паракринных сигнальных механизмов [10].

Согласно данным нашего исследования у пациенток с РЯ по сравнению с контрольной группой происходило увеличение концентрации лизофосфатидилсерина (20:4) в 16 раз ($p < 0,0001$, см. таблицу), что возможно, дополнительно указывает на нарушения иммунной системы. По данным W. Chang и соавт. в микроокружении опухоли содержание лизофосфатидилсерина значительно изменяется на поверхности опухолевых клеток или микровезикул, происходящих из опухолевых клеток, которые обладают иммунодепрессивными свойствами и способствуют росту опухоли и метастазированию [11].

Лизофосфолипиды секретируются различными типами клеток, в том числе раковыми клетками. Данные химические соединения играют важную роль в развитии, активации и регуляции иммунной системы [12]. Концентрация большинства фосфолипидов в настоящем исследовании возрастала у пациенток с опухолью яичников по сравнению с контрольной группой. Изменения состава и содержания фосфолипидов и лизофосфолипидов ранее были показаны при раке предстательной железы и могут рассматриваться в качестве потенциальных биомаркеров [13].

Концентрация индолакриловой кислоты была повышена в 1,4 раза ($p < 0,05$, см. табл. 1) у пациенток с опухолями яичников по сравнению с контрольной группой. Изменение содержания индолакриловой

кислоты может способствовать развитию противовоспалительных реакций [14].

В нашем исследовании повышение концентрации индолакриловой кислоты сопровождалось ростом содержания кинуренина в моче пациенток в 5,5 раза ($p < 0,0001$, см. таблицу). Кинурениновый путь метаболизма триптофана интенсифицируется в организме онкологических пациентов, его продукты имеют проонкогенное и иммуносупрессивное действия [15]. Изменение метаболизма другой ароматической аминокислоты — фенилаланина — и его производных также связано с воспалением и иммунной активацией. По полученным нами результатам концентрация L-фенилаланина возрастала в моче пациенток в 1,4 раза ($p < 0,0001$, см. таблицу). Ранее G. Neurauter и соавт. показали, что концентрация фенилаланина в сыворотке крови у больных карциномой яичников коррелирует с концентрацией маркеров иммунной активации и развитием оксидативного стресса [16].

Следует отметить, что настоящее исследование имеет свои ограничения. Оно выполнено на малой выборке пациенток, разработанная методика требует проведения валидации, а полученные данные являются предварительными. Тем не менее у пациенток с РЯ выявлен метаболомный дисбаланс жирных кислот и их производных (миристиновой кислоты, 2-гидроксимиристиновой кислоты и 3-оксодекановой кислоты), ацилкарнитинов (деканойлкарнитина, малонилкарнитина, 3-гидроксibuтирилкарнитина, 2,6-диметилгептаноилкарнитина и L-октаноилкарнитина), фосфолипидов (лизофосфатидилхолина (18:3), лизофосфатидилхолина (18:2), лизофосфатидилхолина (20:4), фосфатидилинозитола, лизофосфатидилхолина (14:0) и лизофосфатидилсерина), аминокислот и их производных (кинуренина, фенилаланил-валина, аланил-лейцина, L-фенилаланина, 5-метокситриптофана, индолакриловой кислоты, N-ацетилпролина, каприлоилглицина, аспартил-глицина и аспартил-фенилаланина), производных азотистых оснований (3-метилксантина), что, очевидно, отражает изменения в метаболизме опухолевой ткани, а также изменения метаболизма в ответ на появление и развитие опухоли. Обнаруженные метаболиты с аномальной концентрацией могут иметь определенный потенциал в качестве биомаркеров РЯ.

Заключение

Современная клиническая онкогинекология испытывает потребность в эффективных биомаркерах, изменение уровней которых может служить доказательством возникновения и прогрессирования злокачественного процесса. Тестирование биомаркеров в моче может стать неинвазивным методом раннего выявления РЯ, а также обеспечить длительный мониторинг за состоянием этих пациентов. В данном

исследовании изучен метаболомный профиль мочи при серозной карциноме яичников методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, идентифицировано 417 соединений различных классов. Показано, что у пациенток с РЯ наблюдается метабо-

ломный дисбаланс жирных кислот и их производных, ацилкарнитинов, фосфолипидов, аминокислот и их производных, а также производных азотистых оснований. При этом 26 метаболитов с аномальной концентрацией в моче могут иметь определенный потенциал в качестве неинвазивных биомаркеров РЯ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кутилин Д.С. Молекулярная характеристика серозной аденокарциномы яичника: значение для диагностики и лечения. Современные проблемы науки и образования 2020;1:55. DOI: 10.17513/spno.29428 Tsandekova M.R., Porkhanova N.V., Kutilin D.S. Molecular characteristics of serous ovarian adenocarcinoma: significance for diagnosis and treatment. Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education 2020;1:55 (In Russ.). DOI: 10.17513/spno.29428
2. Paoletti X., Lewsley L.A., Daniele G. et al. Assessment of progression-free survival as a surrogate end point of overall survival in first-line treatment of ovarian cancer: a systematic review and meta-analysis. JAMA network open 2020;3(1):e1918939. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2019.18939
3. Цандекова М.Р., Порханова Н.В., Кит О.И. и др. Малоинвазивная молекулярная диагностика серозной аденокарциномы яичника высокой и низкой степени злокачественности. Онкогинекология 2021;4:35–50. DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35 Tsandekova M.R., Porkhanova N.V., Kit O.I. et al. Minimally invasive molecular diagnostics of high and low grade serous ovarian adenocarcinoma. Onkoginekologiya = Oncogynecology 2021;4:35–50 (In Russ.). DOI: 10.52313/22278710_2021_4_35
4. Quan Q., Liao Q., Yin W. et al. Serum HE4 and CA125 combined to predict and monitor recurrence of type II endometrial carcinoma. Sci Rep 2021;11(1):1–8. DOI: 10.1038/s41598-021-01263-w
5. Van Nagell Jr J.R., Hoff J.T. Transvaginal ultrasonography in ovarian cancer screening: current perspectives. Int J Womens Health 2013;6:25–33. DOI: 10.2147/IJWH.S38347
6. Lalwani N., Prasad S.R., Vikram R. et al. Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. Radiographics 2011;31(3):625–46. DOI: 10.1148/rg.313105066
7. Feeney L., Harley I.J., McCluggage W.G. et al. Liquid biopsy in ovarian cancer: Catching the silent killer before it strikes. World J Clin Oncol 2020;11(11):868–89. DOI: 10.5306/wjco.v11.i11.868
8. Petri A.L., Simonsen A.H., Yip T.T. et al. Three new potential ovarian cancer biomarkers detected in human urine with equalizer bead technology. Acta Obstet Gynec Scand 2009;88(1):18–26. DOI: 10.1080/00016340802443830
9. Dinges S.S., Hohm A., Vandergrift L.A. et al. Cancer metabolomic markers in urine: Evidence, techniques and recommendations. Nat Rev Urol 2019;16(6):339–62. DOI: 10.1038/s41585-019-0185-3
10. Koundouros N., Poulogiannis G. Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. Br J Cancer 2020;122(1):4–22. DOI: 10.1038/s41416-019-0650-z
11. Chang W., Fa H., Xiao D., Wang J. Targeting phosphatidylserine for Cancer therapy: prospects and challenges. Theranostics 2020;10(20):9214–29. DOI: 10.7150/thno.45125
12. Rolin J., Maghazachi A.A. Effects of lysophospholipids on tumor microenvironment. Cancer Microenviron 2011;4(3):393–403. DOI: 10.1007/s12307-011-0088-1
13. Li X., Nakayama K., Goto T. et al. High level of phosphatidylcholines / lysophosphatidylcholine ratio in urine is associated with prostate cancer. Cancer Sci 2021;112(10):4292–302. DOI: 10.1111/cas.15093
14. Wlodarska M., Luo C., Kolde R. et al. Indoleacrylic acid produced by commensal peptostreptococcus species suppresses inflammation. Cell host & microbe 2017;22(1):25–37. DOI: 10.1016/j.chom.2017.06.007
15. Venkateswaran N., Conacci-Sorrell M. Kynurenine: An oncometabolite in colon cancer. Cell Stress 2020;4(1):24–6. DOI: 10.15698/cst2020.01.210
16. Neurauter G., Grahmann A.V., Klieber M. et al. Serum phenylalanine concentrations in patients with ovarian carcinoma correlate with concentrations of immune activation markers and of isoprostane-8. Cancer Lett 2008;272(1):141–7. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.07.002

Вклад авторов

О.Н. Гуськова: сбор биологического материала, проведение исследования методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием;
И.А. Аллилуев: дизайн исследования, разработка протоколов ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, необходимых для осуществления исследования, проведение первичной пробоподготовки;
Е.В. Вереникина: сбор биологического материала, редактирование текста статьи, анализ баз данных и литературных источников;
В.В. Половодова: проведение первичной пробоподготовки биологических образцов, сбор клинической информации о пациентах, проведение исследования методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием;
М.А. Рогозин: сбор биологического материала, проведение первичной пробоподготовки для высокоэффективной жидкостной хроматографии;
Т.Ю. Мягкова: сбор биологического материала и его криоконсервация;
М.Л. Адамян: сбор биологического материала, анализ результатов исследования;
О.Е. Женило: сбор биологического материала, редактирование текста статьи;
Н.М. Абдуллаева: сбор биологического материала, проведение первичной пробоподготовки биологических образцов;

М.Р. Цандекова: математическая обработка данных, полученных методом ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием;

Н.Д. Ушакова: сбор клинической информации о пациентах, редактирование текста статьи;

Д.С. Кутилин: разработка дизайна исследования, анализ данных, написание текста статьи и подготовка рукописи для подачи в печать.

Author's contribution

O.N. Guskova: collection of biological material, conducting a study by UHPLC-MS;

I.A. Alliluev: study design, development of UHPLC-MS protocols necessary for the study, carrying out initial testing;

E.V. Verenikina: collection of biological material, editing the text of the article, analysis of databases and literary sources;

V.V. Polovodova: carrying out primary sample preparation of biological samples, collection of clinical information about patients, conducting a study by UHPLC-MS;

M.A. Rogozin: collection of biological material; carrying out primary sample preparation for UHPLC;

T.Yu. Myagkova: collection of biological material and its cryopreservation;

M.L. Adamyan: collection of biological material; analysis of the research results;

O.E. Zhenilo: collection of biological material, editing the text of the article;

N.M. Abdullaeva: collection of biological material, conducting primary sample preparation of biological samples;

M.R. Tsandekova: mathematical processing of data obtained by UHPLC-MS;

N.D. Ushakova: collection of clinical information about patients, editing the text of the article;

D.S. Kutilin: development of study design, data analysis, writing a text article and preparing a manuscript for submission to print.

ORCID авторов /ORCID of authors

О.Н. Гуськова / O.N. Guskova: <https://orcid.org/0000-0001-8440-4341>

И.А. Аллилуев / I.A. Alliluev: <https://orcid.org/0000-0001-7654-0650>

Е.В. Вереникина / E.V. Verenikina: <https://orcid.org/0000-0002-1084-5176>

В.В. Половодова / V.V. Polovodova: <https://orcid.org/0009-0009-5739-1122>

М.А. Рогозин / M.A. Rogozin: <https://orcid.org/0009-0000-1242-3674>

Т.Ю. Мягкова / T.Yu. Myagkova: <https://orcid.org/0000-0002-9577-7896>

М.Л. Адамян / M.L. Adamyan: <https://orcid.org/0000-0003-4188-3746>

О.Е. Женило / O.E. Zhenilo: <https://orcid.org/0000-0002-9833-8530>

Н.М. Абдуллаева / N.M. Abdullaeva: <https://orcid.org/0000-0002-7364-1963>

М.Р. Цандекова / M.R. Tsandekova: <https://orcid.org/0009-0009-3046-5371>

Н.Д. Ушакова / N.D. Ushakova: <https://orcid.org/0000-0002-0068-0881>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients signed informed consent to participate in the study.

Источник финансирования. Исследование проведено без спонсорской поддержки. Исследование выполнено на оборудовании ЦКП ФГБУ «НМИЦ онкологии» Минздрава России, <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>.

Funding. The study was performed without external funding. The study was performed on the equipment of the Center for Collective Use FSBI "NMRC of Oncology" of the Ministry of Health of Russia, <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/3554742/>.

Статья поступила: 19.04.2023. Принята в печать: 12.07.2023

Article received: 19.04.2023. Accepted for publication: 12.07.2023

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-51-63>

Схизандрин и схизантерин А в составе мультифитоадаптогена для профилактической онкологии

О.А. Бочарова¹, И.В. Казеев¹, В.Е. Шевченко¹, Н.С. Ионов², О.П. Шейченко³, Е.В. Бочаров¹,
Р.В. Карпова¹, В.Г. Кучеряну⁴, А.А. Лагунин², Д.А. Филимонов², В.С. Косоруков¹, В.В. Поройков²,
В.А. Тутельян⁵, Н.В. Пятигорская⁶

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

²ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»; Россия, 119121 Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8;

³ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»; Россия, 117216 Москва, ул. Грина, 7, стр. 1;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

⁵ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи»; Россия, 109240 Москва, Устьинский проезд, 2/14;

⁶ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Илья Владимирович Казеев ilya_delta@mail.ru

Введение. Оригинальный мультифитоадаптоген (МФА) для профилактической онкологии, разработанный НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и содержащий фитокомпоненты из *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill (Schisandraceae), был изучен *in vitro*, *in vivo*. Также получено предварительное подтверждение эффективности в рамках клинических испытаний. Последнее было возможно, потому что МФА в России зарегистрирован как парафармацевтик и стандартизован в соответствии с установленными требованиями. Тем не менее высокая эффективность МФА продиктовала необходимость более подробного изучения его химического состава и оценки контроля качества, включая состав активных компонентов из *Schisandra chinensis*, транслоцированных в МФА в результате авторской технологии экстракции.

Цель исследования – выявление биологически активных веществ *Schisandra chinensis* в МФА и оценка профилей их биологической активности с помощью *in silico* анализа.

Материалы и методы. В работе применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Хроматографию проводили на колонке ACQUITY UPLC BEH C18 в градиентном режиме. Работу выполняли с помощью трехквadrupольного масс-спектрометра TSQ Vantage с электро-распылением. Анализ *in silico* биологических активностей выявленных соединений проводили с помощью компьютерных программ PASS и PharmaExpert.

Результаты. В составе МФА были обнаружены вторичные метаболиты *Schisandra chinensis* – лигнаны схизандрин и схизантерин А. Активности схизандрина и схизантерина А, согласно научной литературе и анализу *in silico*, соответствуют свойствам, показанным ранее для МФА, предназначенного для профилактической онкологии.

Заключение. Схизандрин и схизантерин А могут быть использованы для стандартизации и контроля качества МФА.

Ключевые слова: мультифитоадаптоген, *Schisandra chinensis*, схизандрин, схизантерин А, профилактическая онкология, стандартизация, ВЭЖХ-МС/МС, *in silico*

Для цитирования: Бочарова О.А., Казеев И.В., Шевченко В.Е. и др. Схизандрин и схизантерин А в составе мультифитоадаптогена для профилактической онкологии. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3): 51–63. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-51-63

Schisandrin and Schisantherin A in Multiphytoadaptogen for Preventive Oncology

Olga A. Bocharova¹, Ilya V. Kazeev¹, Valery E. Shevchenko¹, Nikita S. Ionov², Olga P. Sheichenko³, Eugeni V. Bocharov¹,
Regina V. Karpova¹, Valerian G. Kucheryanu⁴, Alexey A. Lagunin², Dmitry A. Filimonov², Vyacheslav S. Kosorukov¹,
Vladimir V. Poroikov², Viktor A. Tutelyan⁵, Natalya V. Pyatigorskaya⁶

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

²Institute of Biomedical Chemistry, 10/8 Pogodinskaya St., Moscow 19121, Russia

³All-Russian Scientific Research Institute of Medical and Aromatic Plants, 7/1 Greena St., Moscow 117216, Russia;

⁴Institute of General Pathology and Pathophysiology, 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia

⁵Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14 Ustyinsky proezd, Moscow 109240, Russia;

⁶I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8, Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia

Contacts: Ilya Vladimirovich Kazeev ilya_delta@mail.ru

Background. The original herbal formula of Multiphytoadaptogen (MPHA) for preventive oncology developed by the N.N. Blokhin Center of Oncology containing phytocomponents from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill (Schisandraceae), has been investigated *in vitro*, *in vivo*. Preliminary efficiency in clinical trials has also been obtained. This was allowed because MPHA in Russia is registered as a parapharmaceutical agent and therefore standardized according to established requirements. However, due to the high efficiency of MPHA, a detailed study of the chemical composition and standardization of it is required, including the *Schisandra chinensis* active components, which turned out to be translocated into MPHA as a result of the extraction technology developed.

The aim of the study was to identify the *Schisandra chinensis* biologically active substances in MPHA and to evaluate the biological activity profiles of the identified phytocomponents using *in silico* analysis.

Materials and methods. We used high performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry (HPLC–MS/MS). Chromatography was performed on an ACQUITY UPLC BEH C18 column in a gradient mode. A TSQ Vantage triple quadrupole mass spectrometer with electrospray ionization was used. We performed *in silico* analyzes of Schisandrin and Schisantherin A biological activity spectra using computer programs PASS and PharmaExpert.

Result. The secondary metabolites lignans Schisandrin and Schisantherin A were identified in the herbal formula MPHA. Schisandrin and Schisantherin A activities, according the scientific literature and *in silico* analysis, correspond to the properties studied for MPHA which therefore fits into the concept of medication for preventive oncology.

Conclusion. The determined secondary metabolites can be used for identification, standardization and quality testing of the herbal formula MPHA.

Keywords: multiphytoadaptogen, *Schisandra chinensis*, Schisandrin and Schisantherin A, preventive oncology, standardization, HPLC–MS/MS, *in silico*

For citation: Bocharova O.A., Kazeev I.V., Shevchenko V.E. et al. Schisandrin and Schisantherin A in Multiphytoadaptogen for Preventive Oncology. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023; 22(3):51–63. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-51-63

Введение

Адаптогены — это категория растительных лекарственных и пищевых продуктов, способствующих адаптации, устойчивости и выживанию живых организмов в условиях стресса. Комплексные эффекты адаптогенов достигаются оптимизацией функционирования нервной, иммунной и эндокринной систем защиты — регуляторных осей гомеостаза при стрессе. Адаптогены включают внутриклеточные и внеклеточные адаптивные сигнальные пути, которые способствуют выживанию клеток и сопротивляемости организма стрессу; регулированию метаболизма и гомеостаза путем воздействия на экспрессию стрессовых гормонов (кортизол, катехоламины, урокортин, мелатонин, белки теплового шока *Hsp70*, нейропептид *Y* и т.д.) и их рецепторов [1–3]. Адаптогены используются как официальные лекарства в СССР/России, а также в традиционной китайской и корейской медицине, аюрведе, кампо и других традицион-

ных медицинских системах [4–6]. Адаптогены безвредны и обладают неспецифическим действием, повышая сопротивляемость организма к широкому спектру повреждающих факторов — физических, химических и биологических [7–10]. Нормализующее действие адаптогенов проявляется независимо от направления патологических изменений [11–13].

Классическими фитоадаптогенами являются *Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*, *Aralia mandshurica*, *Eleutherococcus senticosus*, *Oplopanax elatus*, *Schisandra chinensis* и др.

Термин «адаптоген» был введен в 1958 г. советским токсикологом Н.В. Лазаревым, который полагал, что адаптогены повышают неспецифическую устойчивость организмов в условиях стресса. Это положение было основано на результатах исследований лимонника (*Schisandra chinensis*) в СССР во время Второй мировой войны для поиска альтернативы стимуляторам в немецкой и британской армиях для

повышения внимания и выносливости пилотов. Целью было также обеспечить Вооруженные силы Советского Союза и военную промышленность (солдат, летчиков, моряков и гражданских лиц, занятых в производстве оружия и военных материалов) доступными природными стимуляторами, в частности экстрактами ягод или семян *Schisandra chinensis*. В свою очередь, интерес к *Schisandra chinensis* возник в результате этнофармакологических исследований В.Л. Комарова (1895) и В.К. Арсеньева (1903–1907). Они обратили внимание, что ягоды и семена лимонника (также известные как голдис или самагир) использовали нанайские охотники (жители Дальнего Востока, Сибири и китайской Маньчжурии) как укрепляющие средства для подавления жажды, голода, усталости и улучшения ночного зрения [1].

Schisandra chinensis (Turcz.) Baill (*Schisandraceae*) — это многолетняя вьющаяся лоза. У растения много народных названий, таких как «китайская или маньчжурская шизандра» и «цзвэй-цзы», что означает «ягода пяти вкусов» на китайском языке. В основном растет в Китае, Японии и Корее. В природе на территории России распространена на Дальнем Востоке, в Приморском и Хабаровском краях, в Амурской области и на Сахалине. Растет на дренированных, богатых гумусом почвах, светолюбива [14]. Сок плодов *Schisandra chinensis* содержит много сахаров и органических кислот (в основном лимонную, яблочную, винную кислоты). Высоко содержание витаминов — аскорбиновой кислоты, тиамина и рибофлавина. В семенах выявлены такие вещества, как токоферол, схизандрин, схизандрол и т.д. Кора и другие части растения содержат эфирное масло, оно высоко ценится в парфюмерии за свой нежный пряно-лимонный аромат. Состав эфирного масла включает сесквитерпеновые углеводороды, альдегиды и кетоны. Жирное масло содержит α -линоленовую, β -линоленовую, олеиновую и близкую к маргинальной кислоты [15]. Настой семян *Schisandra chinensis* обладает гепатопротекторными и антиоксидантными свойствами. Его используют при астении, усталости, ослаблении половой функции, реабилитации после заболеваний, для улучшения физической и умственной работоспособности [16]. В дерматологии отвары и настои плодов применяют при инфекционных, аллергических и вирусных заболеваниях [17, 18].

Практическое использования адаптогенов имело социально-экономическое значение в СССР — сверхдержаве, где великие достижения в космосе, военной мощи и спорте были предметом гордости и особого внимания. Их применяли в космической медицине: космонавты — во время длительных полетов на станции МИР [19, 20], матросы — на борту судов; на подводных лодках во время длительных арктических, антарктических или тропических экспедиций; а так-

же летчики и спортсмены — в различных стрессовых условиях. Препараты адаптогенов были популярны среди элиты пожилых лидеров Коммунистической партии СССР, которая управляла страной долгие годы [1].

Биологически активные вещества (БАВ) многих фитоадаптогенов проявляют выраженную токсичность в моделях *in vivo* [1, 21]. Кроме того, использование экстракта отдельного фитоадаптогена часто ограничено развивающейся лекарственной устойчивостью. Несколько адаптогенов в фитоформуле позволяют воздействовать на организм без привыкания. В то же время актуальны проблемы стандартизации и обоснования фармакологической активности многокомпонентных фитоадаптогенов с учетом их химического состава [9, 10, 22, 23].

Оригинальная растительная формула мультифитоадаптоген (МФА) для профилактической онкологии была разработана в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н.Н. Блохина [21, 24]. МФА содержит компоненты 40 экстрактов официальных растений, включая адаптогены *Panax ginseng*, *Aralia mandshurica*, *Eleutherococcus senticosus*, *Rhodiola rosea*, *Oplopanax elatus*, *Schisandra chinensis*. Несомненно, противоопухолевые и протекторные эффекты — основные свойства, которыми должны обладать препараты для профилактической онкологии. Экспериментальные и клинические исследования выявили для МФА антимутагенное (что важно для первичной профилактики рака), противоопухолевое и антиметастатическое (необходимое для вторичной профилактики), радиопротекторное, гормонотонизирующее, антиоксидантное, нейропротекторное, иммуномодулирующее действия (важно для третичной профилактики) [21, 25–28]. МФА был изучен *in vitro*, *in vivo*. Также получено предварительное подтверждение эффективности в рамках клинических испытаний. Последнее было возможно, потому что МФА в России зарегистрирован как парафармацевтик и стандартизован в соответствии с установленными требованиями. Тем не менее в связи с высокой эффективностью МФА необходимы детальное изучение его химического состава и стандартизация.

Для оценки контроля качества и стандартизации МФА ведутся исследования его химического состава. С помощью обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором и газовой хроматографии-масс-спектрометрии в МФА были обнаружены полифенольные соединения, эфирные масла, аминокислоты [29–31]. Высокоэффективной жидкостной хроматографией в сочетании с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в МФА были идентифицированы основные БАВ женьшеня и аралии — тритерпеновые сапонины (гинзенозиды

Rb1, *Rb2*, *Rc*, *Rd*, *Rg1*, *Rg2*, *Re*, *Rf*, *Ro* и аралозиды А, В, С) [32, 33]. С помощью этой же методологии фенолэтанолгликозид (салидрозид), фенилпропаноидные гликозиды (розавин и розарин), монотерпеновый гликозид (розиридин) и флавоноид (родионин) выявлены как БАВ *Rhodiola rosea*, а также фенол (элеутерозид В) и лигнан (элеутерозид Е) — как БАВ *Eleutherococcus senticosus* [34, 35]. Тритерпеновые гликозиды, идентичные гинзенозидам *Re* и *Rd*, а также аралозиду С, были выявлены в МФА как БАВ *Oplonanax elatus* [36].

Следующим этапом анализа компонентов МФА с использованием ВЭЖХ-МС/МС является определение БАВ экстракта плодов *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill (*Schisandraceae*), которые транслоцированы в МФА в результате проведения авторской технологии извлечения. Метод ВЭЖХ-МС/МС характеризуется специфичностью и высокой точностью, что позволяет определять вещества в минимальных количествах [32–36].

Цель настоящего исследования заключалась в выявлении БАВ *Schisandra chinensis* в МФА методом ВЭЖХ-МС/МС и оценке их профилей биологической активности с помощью *in silico* анализа.

Материалы и методы

Растворы

В работе исследовали два образца — МФА, а также экстракт плодов *Schisandra chinensis*, входящий в состав МФА. Для получения образцов экстрактов использовали сертифицированное сырье, а также одинаковую технологию (удельный вес сырья, температурный и временной режим экстрагирования, состав экстрагента, соотношение сырье—экстрагент и т. д.).

МФА и экстракт *Schisandra chinensis* были проанализированы с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра TSQ Vantage (серия Thermo Scientific TSQ), подключенного к хроматографу Accela HPLC, оснащенного колонкой ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 мкм, 2,1 × 100 мм, Waters).

Образец МФА смешивали с метанолом в соотношении 1:2 и центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Аликвоту (1 мл) экстракта *Schisandra chinensis* упаривали на ротаторном испарителе Concentrator 5301 (Eppendorf, Германия) при 30 °С досуха. Остаток растворяли в 100 мкл метанола и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 1 мин.

Анализ образцов проводили с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра TSQ Vantage (серии Thermo Scientific TSQ), соединенного с ВЭЖХ-хроматографом Accela.

Хроматографический анализ

Условия хроматографического анализа: колонка ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 мкм, 2,1 × 100 мм, Waters); состав подвижной фазы: фаза А — 100 % вода и 0,1 % муравьиная кислота (FA); фаза Б — 95 % ацетонитрил, 5 % вода и 0,1 % FA.

Для анализа экстрактов применяли градиент подачи подвижной фазы (в % фазы Б): 0–68 мин (0–60 %), 68–70 мин (60–100 %), 70–75 мин (100 %), 75–80 мин (0 %). Образцы в объеме 5 мкл вводили в петлю инжектора объемом 25 мкл (мобильная фаза — 20 мкл), скорость потока 450 мкл/мин.

Ионизацию осуществляли с помощью электроспрея. Условия ионизации: отрицательная полярность, напряжение капилляра спрея 4 кВ, газ (создающий спрей) — 60 psi, обтекающий газ — 15 отн. ед., температура капилляра — 270 °С. Спектры в режиме полного сканирования ионов и в выбранном режиме ионного мониторинга (SIM) были сняты в диапазоне 150–1500 Да, время сканирования — 0,1 с.

Масс-спектры получали прямым вводом пробы через шприц со скоростью 5 мкл/мин; давление газа в камере соударений составило 0,9 торр. Напряжение в камере соударений было подобрано для каждого соединения отдельно.

Расчет вероятных спектров биологической активности

Биологические активности вторичных метаболитов *Schisandra chinensis* были рассчитаны с помощью программы PASS (2022), которая позволяет предсказывать 1957 биологических активностей со средней точностью 97 %. Алгоритм PASS основан на наивном байесовском классификаторе и представлении структуры химических соединений в виде дескрипторов MNA. Результатом предсказания является список вероятных активностей для каждого соединения с соответствующими оценками вероятности P_a и P_i — вероятностями принадлежности к классам «активных» и «неактивных» соответственно. Все активности, для которых расчетные значения P_a превышают P_i , считаются вероятными. Анализ интегрального действия и возможных взаимодействий между лекарствами химических соединений, обнаруженных в *Schisandra chinensis*, был выполнен с помощью компьютерной программы PharmaExpert [24, 37]. Эффективность подхода, использующего компьютерные программы PASS и PharmaExpert для анализа возможных биологических активностей отдельных фитокомпонентов и их комплексов, была показана во многих исследованиях [37].

Результаты и обсуждение

Для изучения основных БАВ экстракта плодов *Schisandra chinensis*, входящего в состав МФА, была

получена хроматограмма экстракта в режиме детектирования отдельных ионов. Хроматограмма представлена на рис. 1.

Анализ литературных данных о химическом составе плодов *Schisandra chinensis* позволил выявить наиболее важные биологически активные соединения этого растения – схизандрин А, В, С, схизандролы А и В и т.д. В табл. 1 приведены молекулярные массы (ММ) и структурные формулы этих веществ.

В табл. 2 представлены результаты тандемного масс-спектрометрического анализа экстракта *Schisandra chinensis* (время удерживания R_t , m/z псевдомолекулярного иона и его фрагментов), а также молекулярная масса соединения. Как следует из табл. 2, схизандрин соответствует один из пиков с m/z 430,82 при $R_t = 10,5–11,0$ мин, а схизантерин А соответствует один из пиков с m/z 535,0 при $R_t = 23,0–23,2$ мин.

Таким образом, в анализируемом экстракте были идентифицированы основные БАВ *Schisandra chinensis*, к которым в первую очередь относятся схизандрин и схизантерин А.

Используя соответствующие схизандрин и схизантерин А времена удерживания R_t и значения m/z

основного молекулярного иона, анализировали хроматограмму МФА на содержание БАВ в *Schisandra chinensis*. На рис. 2 представлена хроматограмма МФА в режиме детектирования отдельных ионов.

Анализ хроматограммы МФА, полученной в тех же условиях, что и хроматограммы экстракта плодов *Schisandra chinensis*, проводили в выбранном режиме ионного мониторинга (SIM), соответствующем основным молекулярным ионам *Schisandra chinensis* (на основании данных, приведенных в табл. 2).

В результате анализа были обнаружены соответствующие пики на хроматограмме МФА и тем самым подтверждено наличие схизандрина и схизантерина А в фармкомпозиции.

Следует отметить, что идентификация отдельных веществ весьма важна для обоснования биологической активности комплексного препарата. Применение методов *in silico* позволяет получить дополнительное обоснование биологической активности БАВ экстракта плодов *Schisandra chinensis*. Поскольку экстракт плодов *Schisandra chinensis* входит в состав фитоформулы МФА, была проведена оценка противоопухолевых спектров схизандрина и схизантерина

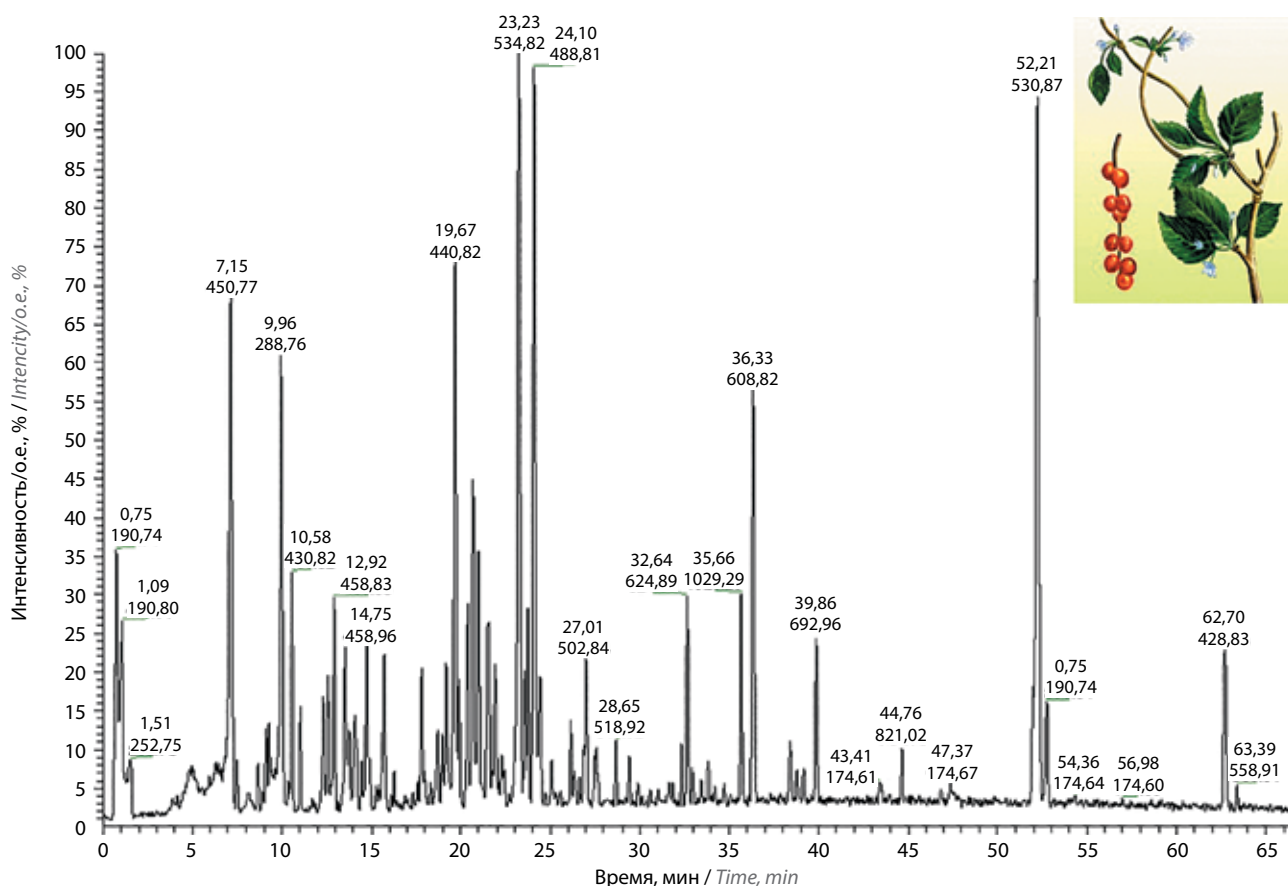


Рис. 1. Хроматограмма полного ионного тока экстракта *Schisandra chinensis*

Fig. 1. Chromatogram of *Schisandra chinensis* extract in the full ion scanning mode

Таблица 1. Основные БАВ в *Schisandra chinensis* согласно данным литературы

Table 1. The main BAS of *Schisandra chinensis* according to the literature

Основные соединения Major compound	ММ, г/моль MW, g/mol	Структурная формула Structural formula
Схизандрин (схизандрол А) Schisandrin (Schisandrol A) $C_{24}H_{32}O_7$	432,5	
Схизандрин В (Schisandrin B) $C_{23}H_{28}O_6$	400,5	
Схизандрин С (Schisandrin C) $C_{22}H_{24}O_6$	384,4	
Схизантерин В (Schisantherin B) $C_{28}H_{34}O_9$	514,6	
Схизандрин А (дезоксисхизан- дрин) Schisandrin A (Deoxyschi- sandrins) $C_{24}H_{32}O_6$	416,5	

А. Диаграмма Ра-Рi значений прогнозируемых противоопухолевых эффектов для схизандрина и схизантерина А представлена на рис. 3.

Наиболее вероятный противоопухолевый эффект при пороге Ра-Рi >0,7 для схизандрина

и схизантерина А показан в отношении рака легких, рака молочной железы (Ра-Рi = 0,81 и 0,89 соответственно), колоректального рака (Ра-Рi = 0,77).

С помощью PharmaExpert были выявлены наиболее вероятные синергетические/аддитивные механизмы противоопухолевого действия. Тридцать механизмов действия, связанных с противоопухолевыми эффектами, прогнозируются при пороге Ра >Рi для схизантерина А и схизандрина. Данные о вероятных механизмах противоопухолевого действия для исследуемых соединений при пороге Ра-Рi >0,5 представлены в табл. 3.

Как видно из данных в табл. 3, три механизма действия прогнозируются с наибольшей вероятностью: антагонист тубулина (схизантерин А, Ра-Рi = 0,82); антимитотический эффект (схизантерин А, Ра-Рi = 0,78); агонист апоптоза (схизандрин, Ра-Рi = 0,72).

Анализ литературы по изучению биологической активности выделенных соединений из плодов *Schisandra chinensis* дал следующие результаты. Схизандрин (схизандрол А) и схизантерин А (гомизин С) обладают противоопухолевым, нейропротекторным, иммуномодулирующим, антиоксидантным действиями, а также имеют потенциал для преодоления множественной лекарственной устойчивости при раке [38–47].

Одновременно следует отметить, что МФА проявляет антипролиферативную активность в отношении аденокарциномы яичников (SK-OV-3) и шейки матки (Hela), а также гипернефром человека (HN) в наших *in vitro* исследованиях. Эксперименты *in vivo* на высококоравых мышах СВА продемонстрировали высокий эффект МФА против гепатокарциномы. *In vivo* был также обнаружен 100 % антимагастатический эффект на аденокарциноме легких Льюиса. В онкоклинике была показана противоопухолевая активность при распространенном раке желудка IV стадии. Превентивный эффект был продемонстрирован на мышах СВА, а также в клинике при лечении предракового заболевания – лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. В клинических исследованиях также был получен высокий терапевтический эффект МФА в отношении возрастных патологий – доброкачественной гиперплазии предстательной железы и болезни Паркинсона. При этом показаны нейропротекторное, антиоксидантное, антимутагенное, радиопротективное, иммуномодулирующее действия МФА [21, 24–28].

Другими словами, биологическая активность схизандрина и схизантерина А, согласно научной литературе и *in silico* анализу, включает свойства, которые были показаны для МФА, что полностью соответствует концепции препарата для профилактической онкологии. Действительно, противоопухолевые и протекторные эффекты – это основные свойства,

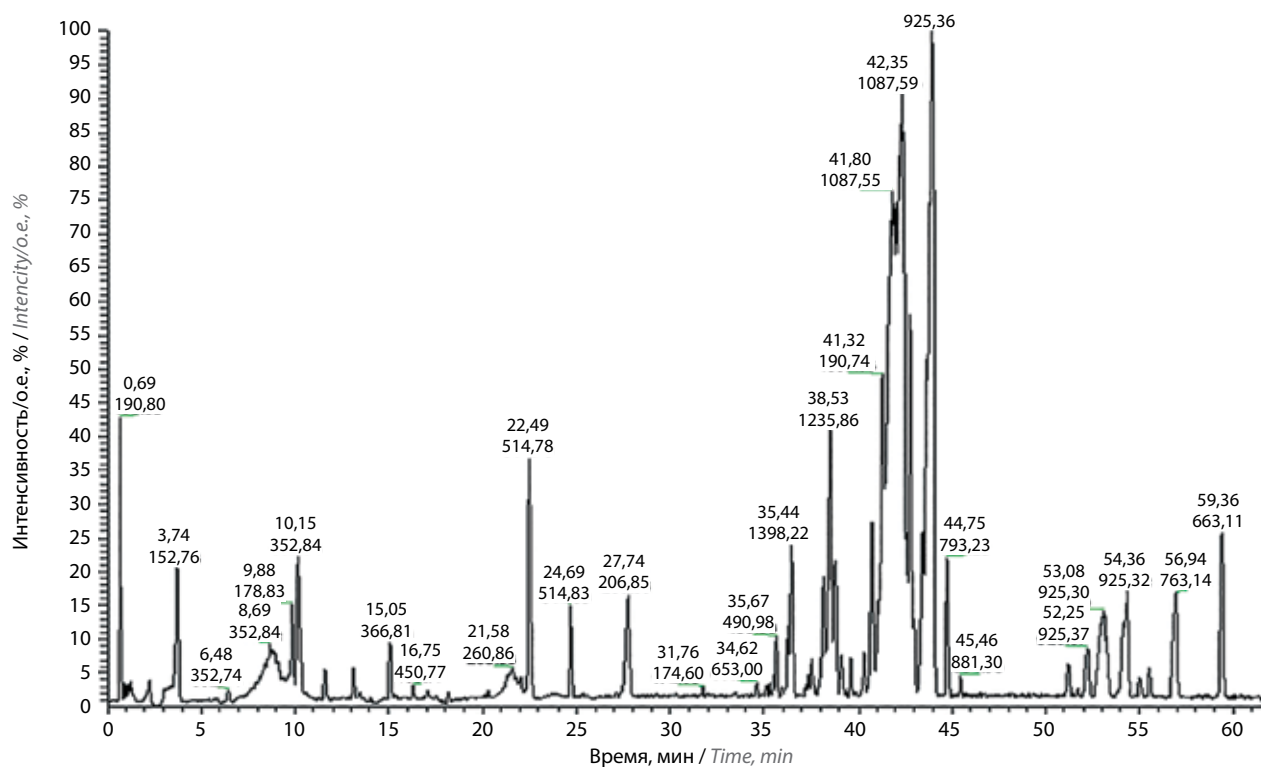
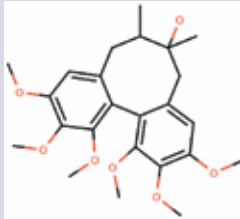
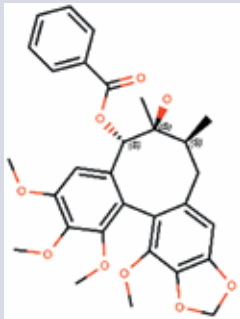


Рис. 2. Хроматограмма полного ионного тока МФА

Fig. 2. Chromatogram of MPhA in the full ion scanning mode

Таблица 2. Результаты тандемной масс-спектрометрии экстракта *Schisandra chinensis* (время удерживания R_t , m/z для основного молекулярного иона и фрагментов молекулярного иона), а также молекулярная масса по данным литературыTable 2. The tandem mass spectrometry of *Schisandra chinensis* extract (retention time R_t , m/z for the main molecular ion, as well as for fragments of the molecular ion) results, as well as the molecular weight according to the literature

Соединение Substance	ММ, г/моль MW, g/mol	R_t , мин R_t , min	m/z
Схизандрин (схизандрол А) Schisandrin (Schisandrol A) $C_{24}H_{32}O_7$ 	432,5	10,5–11,0	430,82 [M-H] – 394,3 384,8 368,5 354,4 340,6 325,5 310,5 296,5 288,69 178,5 151
Схизантерин А (Schisantherin A) $C_{30}H_{32}O_9$ 	536,6	23,0–23,2	535,0 [M-H] – 516,7 470,9 436,6 418,2 403,8 373,1 354,8 194,5 178,4 142,5 119,1 96,8

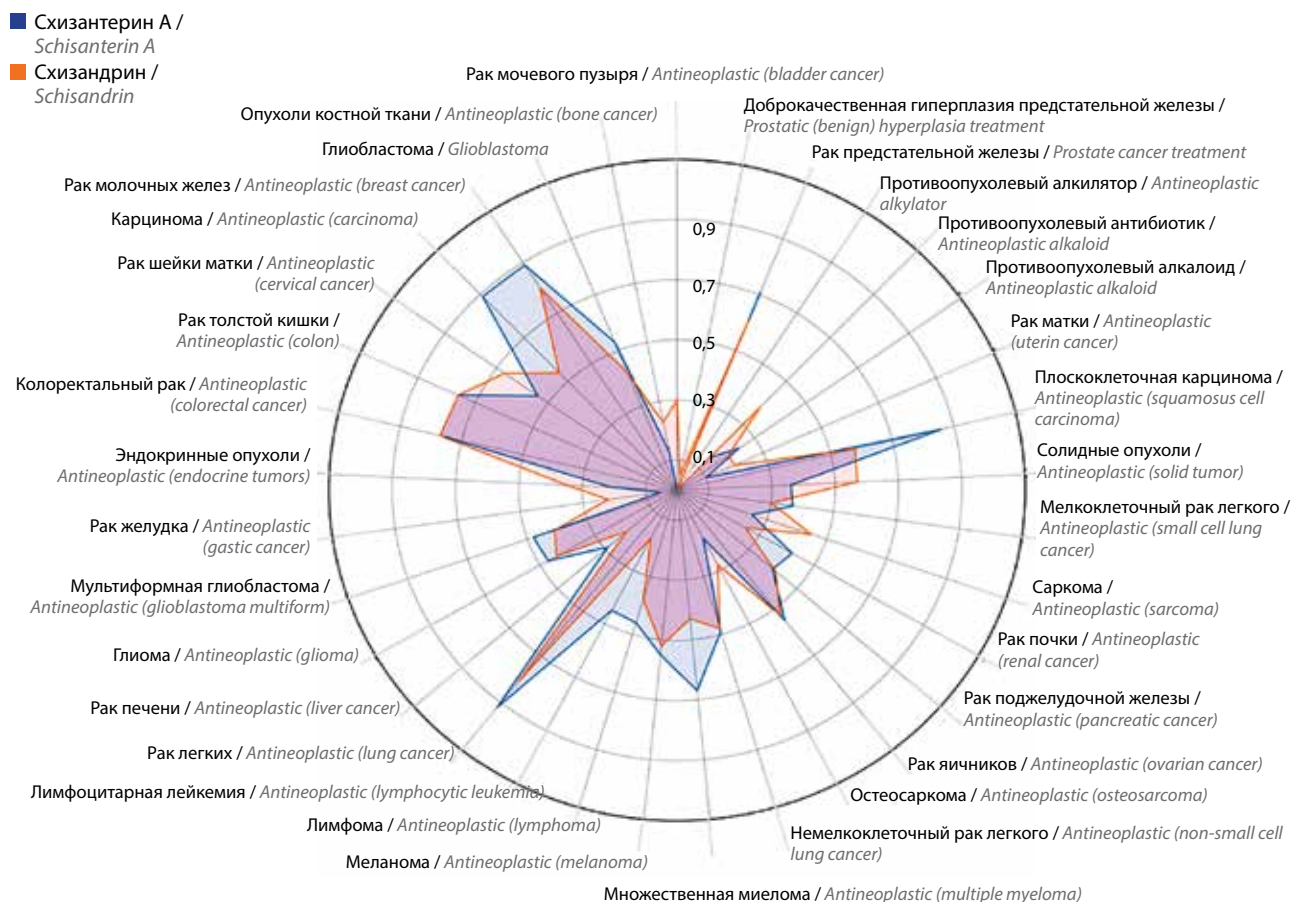


Рис. 3. Диаграмма положительных значений $Pa-Pi$ для противоопухолевых эффектов схизандрина и схизантерина А. Отрицательные значения $Pa-Pi$ на этом рисунке не учитываются и сводятся к нулю

Fig. 3. Diagram of positive $Pa-Pi$ values for schisandrin and schisanterin A antitumor effects. Negative $Pa-Pi$ values in this figure are not considered and are reduced to zero

которыми должны обладать препараты для профилактической онкологии.

Заключение

Для стандартизации и идентификации МФА для профилактической онкологии успешно применена высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектрометрией для определения вторичных метаболитов из *Schisandra chinensis* — лигнанов схизандрина и схизантерина А в качестве компонентов оригинальной фитоформулы. Лигнаны схизандрин и схизантерин А были идентифицированы также и в экстракте плодов *Schisandra chinensis*. Хроматограммы и спектры, полученные в ходе исследования, могут быть использованы для стандартизации и идентификации МФА.

Работа важна для обоснования биологической активности фармкомпозиции МФА, учитывая компоненты группы лигнанов.

Результаты анализа *in silico* соответствуют в том числе данным, полученным для МФА *in vitro*, *in vivo*

и в клинике. Вместе с тем анализ *in silico* позволил выявить дополнительные вероятные противоопухолевые эффекты фитокомпонентов *Schisandra chinensis*. Разнообразие потенциальных механизмов фармакологического эффекта положительно характеризует политаргетность отдельных вторичных метаболитов и их комплексов. Информация о вероятных аддитивных/синергетических механизмах действия обосновывает использование экстрактов в одной смеси и также раскрывает дальнейшие перспективы исследований.

Продemonстрирована возможность стандартизации и идентификации комплексных фитопрепаратов, включающих лигнаны. Полученные данные могут служить основой для нормативной документации при регистрации лекарства на основе МФА.

Результаты исследования указывают на то, что активности схизандрина и схизантерина А аналогичны свойствам, ранее полученным для МФА, что полностью соответствует препарату для профилактической онкологии.

Таблица 3. Наиболее вероятные механизмы противоопухолевого действия схизандрина и схизантерина А

Table 3. The most likely mechanisms of schisandrin and schisanterin A antitumor action

Механизм действия Mechanism of action	Заболевание, на которое направлен фармакологический эффект The disease to which the pharmacological effect is directed	Соединение Compound	Pa-Pi
Антагонист тубулина Tubulin antagonist	Меланома Melanoma Рак простаты Prostate cancer Рак яичников Ovarian cancer Рак желудка Stomach cancer Рак молочной железы Mammary cancer Рак легких Lung cancer Рак мочевого пузыря Bladder cancer Рак шейки матки Cervical cancer Колоректальный рак Colon cancer Множественная миелома Multiple myeloma Рак поджелудочной железы Pancreas cancer Рак почки Kidney cancer Противоопухолевый антибиотик Antitumor antibiotic Лимфома Lymphoma	Схизантерин А Schisanterin A	0,82
		Схизандрин Schisandrin	0,65
Антимитотический эффект Antimitotic effect	Рак простаты Prostate cancer Рак яичников Ovarian cancer Рак молочной железы Mammary cancer Рак легких Lung cancer Рак шейки матки Cervical cancer Рак толстой кишки Colon cancer Множественная миелома Multiple myeloma Рак поджелудочной железы Pancreas cancer Рак почки Kidney cancer Лимфома Lymphoma	Схизантерин А Schisanterin A	0,78
		Схизандрин Schisandrin	0,55

Продолжение табл. 3

Continuation of table 3

Механизм действия Mechanism of action	Заболевание, на которое направлен фармакологический эффект The disease to which the pharmacological effect is directed	Соединение Compound	Pa-Pi
Агонист апоптоза Apoptosis agonist	Меланома Melanoma Рак простаты Prostate cancer Рак желудка Stomach cancer Рак молочной железы Mammary cancer Рак легких Lung cancer Рак мочевого пузыря Bladder cancer Рак шейки матки Cervical cancer Колоректальный рак Colon cancer Множественная миелома Multiple myeloma Рак поджелудочной железы Pancreas cancer Рак почки Kidney cancer Рак печени Liver cancer Остеосаркома Osteosarcoma Лимфома Lymphoma Доброкачественная гиперплазия предстательной железы Benign prostatic hyperplasia	Схизандрин Schisandrin	0,72
		Схизантерин А Schisanterin A	0,65
Стимулятор каспазы-3 Caspase-3 stimulator	Рак простаты Prostate cancer Рак молочной железы Mammary cancer Рак легких Lung cancer Рак мочевого пузыря Bladder cancer Рак почки Kidney cancer	Схизантерин А Schisanterin A	0,64
		Схизандрин Schisandrin	0,50
Ингибитор транскрип- ционного фактора NF-κB NF-κB transcription factor inhibitor	Рак простаты Prostate cancer Рак желудка Stomach cancer Рак молочной железы Mammary cancer Рак легких Lung cancer Рак мочевого пузыря Bladder cancer Колоректальный рак Colon cancer Множественная миелома Multiple myeloma Рак почки Kidney cancer Лимфома Lymphoma Солидные опухоли Solid tumors	Схизантерин А Schisanterin A	0,68
		Схизандрин Schisandrin	0,68

Окончание табл. 3

The end of table 3

Механизм действия Mechanism of action	Заболевание, на которое направлен фармакологический эффект The disease to which the pharmacological effect is directed	Соединение Compound	Pa-Pi
Ингибитор Р-гликопротеина P-glycoprotein inhibitor	Меланома Melanoma Рак яичников Ovarian cancer Рак легких Lung cancer Множественная миелома Multiple myeloma Рак поджелудочной железы Pancreas cancer Рак печени Liver cancer	Схизантерин А Schisanterin A	0,62
		Схизандрин Schisandrin	0,60

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

- Panossian A., Efferth T., Shikov A. et al. Evolution of the adaptogenic concept from traditional use to medical systems: Pharmacology of stress and aging-related diseases. *Med Res Rev* 2021;41(1):630–703. DOI: 10.1002/med
- Panossian A., Efferth T. Network pharmacology of adaptogens in the assessment of their pleiotropic therapeutic activity. *Pharmaceuticals* 2022;15(9):1051. DOI: 10.3390/ph15091051
- Panossian A. Understanding adaptogenic activity: specificity of the pharmacological action of adaptogens and other phytochemicals. *Ann NY Acad Sci* 2017;1401(1):49–64. DOI: 10.1111/nyas.13399
- Shikov A., Pozharitskaya O., Makarov V.G. *Aralia elata* var. *mandshurica* (Rupr. & Maxim.) J. Wen: An overview of pharmacological studies. *Phytomedicine* 2016;23(12):1409–21. DOI: 10.1016/j.phymed.2016.07.011
- Shikov A., Pozharitskaya O., Makarova M. et al. *Oplopanax elatus* (Nakai) Nakai: chemistry, traditional use and pharmacology. *Chin J Nat Med (Amsterdam, Neth)* 2014;12(10):721–29. DOI: 10.1016/S1875-5364(14)60111-4
- Gerontakos S., Taylor A., Aydeeva A. et al. Findings of Russian literature on the clinical application of *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. & Maxim.): A narrative review. *J Ethnopharmacol* 2021;278:114274. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114274
- Kaur P., Mekanjuola V., Arora R. et al. Immunopotentiating significance of conventionally used plant adaptogens as modulators in biochemical and molecular signalling pathways in cell mediated processes. *Biomed Pharmacother* 2017;95:1815–29. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.09.081
- Dhabhar F.S. The short-term stress response – mother nature's mechanism for enhancing protection and performance under conditions of threat, challenge, and opportunity. *Front Neuroendocrinol* 2018;49:175–92. DOI: 10.1016/j.yfrne.2018.03.004
- Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Фито-адаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (часть 1). *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(2):13–21. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-13-21
Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Phytoadaptogens in biotherapy of tumors and geriatrics (Part 1). *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(2):13–21. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-13-21
- Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Фито-адаптогены в биотерапии опухолей и гериатрии (часть 2). *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(3):12–20. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-12-20
Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Phytoadaptogens in biotherapy of tumors and geriatrics (Part 2). *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(3):12–20. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-3-12-20
- Todorova V., Ivanov K., Delattre C. et al. Plant adaptogens – history and future perspectives. *Nutrients* 2021;13(8):2861. DOI: 10.3390/nu13082861
- Panossian A., Seo E.J., Efferth T. Novel molecular mechanisms for the adaptogenic effects of herbal extracts on isolated brain cells using systems biology. *Phytomedicine* 2018;50:257–84. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.204
- Shin D., Hong S.B., Geum J.H. et al. Effects of *Schisandrae Fructus* on menopause symptoms in ovariectomized mice. *Journal of Korean Medicine* 2016;37:39–46. DOI: 10.13048/jkm.16033
- Новиков В.С., Губанов И.А. Популярный атлас-определитель. Дикорастущие растения. 5-е изд. М.: Просвещение/Дрофа. 2008. С. 65–66.
Novikov V.S., Gubanov I.A. Popular atlas-determinant. Wild plants. 5th ed. Moscow: Enlightenment / Bustard. 2008. P. 65–66 (In Russ.).
- Shikov A.N., Tsitsilin A.N., Pozharitskaya O.N. et al. Traditional and current food use of wild plants listed in the Russian Pharmacopoeia. *Front Pharmacol* 2017;8:841. DOI: 10.3389/fphar.2017.00841
- Макаров В.Г., Рыженков В.Е., Федотова Ю.О., Шиков А.Н. Действие полифенольного препарата ликол на центральную нервную систему. *Психофармакология и биологическая наркология* 2004;4(1):601–7.
Makarov V.G., Ryzhenkov V.E., Fedotova Yu.O., Shikov A.N. The action of polyphenolic drug Licol on the central nervous system. *Psychopharmacol Biol Narcol* 2004;4(1):601–7. (In Russ.)

17. Shikov A.N., Narkevich I.A., Flisyuk E.V. et al. Medicinal Plants from the 14th edition of the Russian Pharmacopoeia, recent updates. *J Ethnopharmacol* 2021;268:113685. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113685
18. Kosman V.M., Karlina M.V., Pozharitskaya O.N. et al. Pharmacokinetics of lignans from *Schisandra chinensis*. *Rev Clin Pharm Med Ther* 2015;13:3–21.
19. Panossian A., Wagner H. Stimulating effect of adaptogens: an overview with particular reference to their efficacy following single dose administration. *Phytother Res* 2005;19(10):819–38. DOI: 10.1002/ptr.1751
20. Богатова Р.И., Шлыкова Л.В., Сальницкий В.П., Викман Г. Оценка влияния разового приема фитоадаптогена на работоспособность обследуемых при длительной изоляции. *Авиакосмическая и экологическая медицина* 1997;31(4):51–4. Bogatova R.I., Shlykova L.V., Salnitsky V.P., Wikman G. Evaluation of the effect of a single dose of a phytoadaptogen on the working capacity of human subjects during prolonged isolation. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya medicina = Aerosp Environ Med* 1997;31(4):51–4. (In Russ.)
21. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Бочаров Е.В. и др. Изыскание фитоадаптогенов и возможности использования фитокомпозиций. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(4):35–44. DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-35-44 Bocharova O.A., Karpova R.V., Bocharov E.V. et al. Research of new phytoadaptogens and possibilities of herbal formulas application. *Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(4):35–44. (In Russ.) DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-35-44
22. Panossian A., Wikman G., Sarris J. *Rosen root (Rhodiola rosea): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy*. *Phytomedicine* 2010;17(7):481–93. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.02.002
23. Shikov A.N., Pozharitskaya O.N., Makarov V.G. et al. Medicinal plants of the Russian Pharmacopoeia: their history and applications. *J Ethnopharmacol* 2014;154(3):481–536. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.007
24. Bocharova O.A., Ionov N.S., Kazeev I.V. et al. Computer-Aided Evaluation of Polyvalent Medications' Pharmacological Potential. Multiphytoadaptogen as a Case Study. *Mol Inf* 2023;42(1):e2200176. DOI: 10.1002/minf.202200176
25. Bocharova O., Serebriakova R., Philippova T. et al. The first in vitro and in vivo trials of the phytomixture for anticancer treatment. *Farmaceutski Vestnik* 1997;48:414–15.
26. Пожарицкая М.М., Бочарова О.А., Чекалина Т.Л., Воронин В.Ф. *Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта (Методическое пособие для врачей)*. М.: ГОУ ВУНМЦ 2004. 47 с. Pozharitskaya M.M., Bocharova O.A., Chekalina T.L. et al. *Modern aspects of the pathogenesis and treatment of oral mucosa leukoplakia (Methodological guide for doctors)*. М.: SEI HESMC, 2004. 47 p. (In Russ.)
27. Бочарова О.А., Барышников А.Ю. *Фитоадаптогены в онкологии*. М.: ЗооМедВет, 2004. 138 с. Bocharova O.A., Baryshnikov A.Yu. *Phytoadaptogens in oncology*. Moscow: ZooMedVet, 2004. 138 p. (In Russ.)
28. Альперина Е.Л., Бочаров Е.В., Бочарова О.А. и др. *Актуальные проблемы нейроиммунопатологии*. М.: Гениус-Медиа, 2012. 423 с. Alperina E.L., Bocharov E.V., Bocharova O.A. et al. *Actual problems of neuroimmunopathology*. Moscow: Genius-Media, 2012. 423p. (In Russ.)
29. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П. и др. Аналитические возможности метода ЯМР для определения компонентов препарата Фитомикс-40. *Заводская лаборатория. Диагностика материалов* 2006;72(8):15–23. Sheychenko V.I., Bocharova O.A., Sheychenko O.P. et al. Analytical capabilities of the NMR method for determining the components of Phitomix-40. *Zavodskaya laboratoriya. Diagnostika materialov = Factory laboratory. Diagnostics of materials* 2006;72(8):15–23. (In Russ.)
30. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Шейченко В.И. и др. *Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата «Фитомикс-40»*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2007;5(2):20–5. Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Sheychenko V.I. et al. Possibility of using electronic absorption spectra for standardization of the multicomponent preparation "Phitomix-40". *Voprosi biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy himii = Probl Biol Med Pharm Chem* 2007;5(2):20–5. (In Russ.)
31. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. *Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ*. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2012;10:52–9. Sheychenko O.P., Bocharova O.A., Krapivkin B.A. et al. Investigation of a complex phytoadaptogen by HPLC. *Voprosi biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy himii = Probl Biol Med Pharm Chem* 2012;10:52–9. (In Russ.)
32. Kazeev I.V., Bocharova O.A., Shevchenko V.E. et al. Tandem mass spectrometry for the analysis of ginsenosides in a phytoadaptogenic composition with antitumor properties. *Theor Found Chem Eng* 2021;55(6):780–92. DOI: 10.1134/S0040579521050225
33. Kazeev I.V., Bocharova O.A., Shevchenko V.E. et al. Tandem mass spectrometry in the technology of determining aralosides of phytoadaptogene compositions. *Theor Found Chem Eng* 2020;54(6):1242–6. DOI: 10.1134/S0040579520050334
34. Bocharova O.A., Kazeev I.V., Shevchenko V.E. et al. A Potential Method for Standardization of Multiphytoadaptogen: Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Biologically Active Substances from *Rhodiola rosea*. *Pharm Chem J Eng* 2022;56(1):78–84. DOI: 10.1007/s11094-022-02607-0
35. Bocharova O.A., Shevchenko V.E., Kazeev I.V. et al. Eleutherosides Definition by Tandem Mass Spectrometry Technology in Assay of Multiphytoadaptogen for Preventive Oncology. *Pharm Chem J Eng* 2022;56(6):806–14. DOI: 10.1007/s11094-022-02712-0
36. Kazeev I.V., Bocharova O.A., Shevchenko V.E. et al. Secondary metabolites of *Oplopanax elatus*: possibilities of standardization of a multifitoadaptogen for preventive oncology. *Pharm Chem J* 2023;57(1):29–36. DOI: 10.30906/0023-1134-2023-57-1-29-36
37. Poroikov V.V. Computer-aided drug design: From discovery of novel pharmaceutical agents to systems pharmacology. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry* 2020;14:216–27. DOI: 10.1134/S1990750820030117
38. Amujuri D., Siva B., Poornima B. et al. Synthesis and biological evaluation of Schizandrin derivatives as potential anti-cancer agents. *Eur J Med Chem* 2018;149:182–92. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.02.066
39. Yoganathan S., Alagaratnam A., Acharekar N., Kong J. Ellagic Acid and Schisandrins: Natural Biaryl Polyphenols with Therapeutic Potential to Overcome Multidrug Resistance in Cancer. *Cells* 2021;10(2):458. DOI: 10.3390/cells10020458
40. Dileep Kumar G., Siva B., Bharathi K. et al. Synthesis and biological evaluation of Schizandrin derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2020;30:127354. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127354
41. Xu G., Feng Y., Li H. et al. Molecular Mechanism of the Regulatory Effect of Schisandrol A on the Immune Function of Mice Based on a Transcription Factor Regulatory Network. *Front Pharmacol* 2021;12:785353. DOI: 10.3389/fphar.2021.785353
42. Lin X., Attar R., Mobeen I. et al. Regulation of cell signaling pathways by Schisandrin in different cancers: Opting for "Swiss Army Knife" instead of "Blunderbuss". *Cell Mol Biol* 2021;67(2):25–32. DOI: 10.14715/cmb/2021.67.2.5

43. Zhu P., Li J., Fu X., Yu Z. Schisandra fruits for the management of drug-induced liver injury in China: A review. *Phytomedicine* 2019;59:152760. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.11.020
44. Wang Z., Yu K., Hu Y. et al. Schisantherin A induces cell apoptosis through ROS/JNK signaling pathway in human gastric cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2020;173:113673. DOI: 10.1016/j.bcp.2019.113673
45. Zhang L., Sa F., Chong C. et al. Schisantherin A protects against 6-OHDA-induced dopaminergic neuron damage in zebrafish and cytotoxicity in SH-SY5Y cells through the ROS/NO and AKT/GSK3 β pathways. *J Ethnopharmacol* 2015;170:8–15. DOI: 10.1016/j.jep.2015.04.040
46. Panossian A., Hambartsumyan M., Hovanissian A. et al. The adaptogens Rhodiola and Schizandra modify the response to immobilization stress in rabbits by suppressing the increase of phosphorylated stress-activated protein kinase, nitric oxide and cortisol. *Drug Targets Insights* 2007;2:39–54.
47. Inglis J.E., Lin P.J., Kerns S.L. et al. Nutritional interventions for treating cancer-related fatigue: a qualitative review. *Nutr Cancer* 2019;71(1):21–40. DOI: 10.1080/01635581.2018.1513046

Вклад авторов

О.А. Бочарова: разработка дизайна исследования, планирование работы, анализ данных, анализ рукописи;
 И.В. Казеев, О.П. Шейченко, Е.В. Бочаров, Р.В. Карпова: получение и анализ данных, написание текста рукописи, оформление рукописи;
 Н.С. Ионов, В.Г. Кучеряну, А.А. Лагунин, Д.А. Филимонов: получение и анализ данных;
 В.Е. Шевченко, В.С. Косоруков, В.В. Пороиков, В.А. Тутельян, Н.В. Пятигорская: анализ и редактирование рукописи.

Author's contributions

O.A. Bocharova: research design, work planning, data analysis, manuscript analysis;
 I.V. Kazeev, O.P. Sheichenko, E.V. Bocharov, R.V. Karpova: data acquisition and analysis, manuscript writing, manuscript design;
 N.S. Ionov, V.G. Kucheryanu, A.A. Lagunin, D.A. Filimonov: data acquisition and analysis;
 V.E. Shevchenko, V.S. Kosorukov, V.V. Poroikov, V.A. Tutelyan, N.V. Pyatigorskaya: manuscript analysis and editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.А. Бочарова / O.A. Bocharova: <https://orcid.org/0000-0002-6365-2888>
 И.В. Казеев / I.V. Kazeev: <https://orcid.org/0000-0002-6100-3470>
 В.Е. Шевченко / V.E. Shevchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0401-9900>
 Н.С. Ионов / N.S. Ionov: <https://orcid.org/0000-0001-5396-2789>
 О.П. Шейченко / O.P. Sheichenko: <https://orcid.org/0000-0001-7099-4192>
 Е.В. Бочаров / E.V. Bocharov: <https://orcid.org/0000-0003-2342-9881>
 Р.В. Карпова / R.V. Karpova: <https://orcid.org/0000-0003-4893-1472>
 В.Г. Кучеряну / V.G. Kucheryanu: <https://orcid.org/0000-0002-5071-3581>
 А.А. Лагунин / A.A. Lagunin: <https://orcid.org/0000-0003-1757-8004>
 Д.А. Филимонова / D.A. Filimonova: <https://orcid.org/0000-0002-0339-8478>
 В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>
 В.В. Пороиков / V.V. Poroikov: <https://orcid.org/0000-0001-7937-2621>
 В.А. Тутельян / V.A. Tutelyan: <https://orcid.org/0000-0002-4164-8992>
 Н.В. Пятигорская / N.V. Pyatigorskaya: <https://orcid.org/0000-0003-4901-4625>

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: 05.04.2023. Принята к публикации: 12.07.2023.

Article received: 05.04.2023. Accepted for publication: 12.07.2023.

Исследование биосовместимости и противоопухолевой цитотоксической активности *in vitro* упрочненных равноканальным угловым прессованием сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca

Н.С. Мартыненко¹, Н.Ю. Анисимова¹⁻³, О.В. Рыбальченко¹, М.В. Шинкарева³, Д.Р. Темралиева¹, К.М. Новрузов², А.Г. Рааб⁴, Е.А. Лукьянова¹, Е.А. Корнюшенков², Д.В. Филоненко⁵, Д.Е. Митрушкин², С.В. Добаткин¹

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

³ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС»; Россия, 119049 Москва, Ленинский пр-т, 4;

⁴ФГБОУ ВО «Уфимский университет науки и технологий»; Россия, 450076 Уфа, ул. Заки Валиди, 32;

⁵отдел общей онкологии ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения города Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

Контакты: Наталья Сергеевна Мартыненко nataliasmartynenko@gmail.com

Введение. Исследована биологическая активность биodeградируемых сплавов на основе цинка, перспективных для онкоортопедии. Сплавы были обработаны методом равноканального углового прессования, что позволило повысить их прочность за счет измельчения микроструктуры и способность обеспечить функциональность остеосинтеза, фиксированного за счет разрабатываемой на их основе металлоконструкции.

Цель исследования – изучить влияние обработки методом равноканального углового прессования на прочность, пластичность, скорость деградации, биосовместимость *in vitro* и цитотоксичность относительно опухолевых клеток линии SKOV-3 сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были использованы сплавы Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca в исходном состоянии и после равноканального углового прессования, а в качестве модельных систем – клетки крови мышей линии СВА. Для оценки гемолитической активности образцы инкубировали с эритроцитами в течение 4 и 24 ч при 37 °С, оценивая относительное увеличение уровня внеклеточного гемоглобина в сравнении с интактным контролем. Цитотоксичность сплавов оценивали по изменению уровня активности внеклеточной лактатдегидрогеназы после 24 ч инкубации с мононуклеарными лейкоцитами. Исследование противоопухолевой цитотоксической активности производили на клетках рака яичников человека линии SKOV-3 *in vitro*, оценивая их выживаемость через 48 ч инкубации с образцами сплавов в тесте лактатдегидрогеназы.

Результаты. В результате проведенных исследований был сделан вывод о том, что исследуемые сплавы после обработки равноканальным угловым прессованием сохранили биосовместимость, поскольку не было выявлено признаков гемолиза и цитотоксичности относительно клеток крови. Однако контакт с образцами всех изученных сплавов *in vitro* индуцировал достоверное угнетение метаболической активности культуры клеток рака яичников в сравнении с контролем. Инкубация с образцами приводит к снижению клеточной активности в среднем на 49 и 59 % для сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca, соответственно. Добавка в состав сплава Zn – 1 %Mg кальция способствовала росту противоопухолевой цитотоксической активности.

Заключение. Таким образом, основываясь на результатах оценки гемолитической активности и цитотоксичности образцов, можно сделать вывод о биосовместимости изученных сплавов. Выявлено, что сплавы Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca обладали выраженным цитотоксическим воздействием относительно опухолевых клеток линии SKOV-3. Полученные данные указывают на перспективность разработки на основе изучаемых сплавов медицинских изделий нового типа, перспективных, в частности, для онкоортопедии: разработанная на их основе металлоконструкция может обеспечить прочность остеосинтеза, снизить риск локального рецидива онкологического заболевания и не требует повторной операции для удаления.

Ключевые слова: цинковые сплавы, равноканальное угловое прессование, имплантат, биodeградация, биосовместимость, цитотоксичность

Для цитирования: Мартыненко Н.С., Анисимова Н.Ю., Рыбальченко О.В. и др. Исследование биосовместимости и противоопухолевой цитотоксической активности *in vitro* упрочненных равноканальным угловым прессованием сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3):64–74. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-64-74

Study of biocompatibility and antitumor cytotoxic activity *in vitro* of Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys strengthened by equal angular pressing

Natalia S. Martynenko¹, Natalia Yu. Anisimova^{1–3}, Olga V. Rybalchenko¹, Maria V. Shinkareva³, Diana R. Temralieva¹, Keryam M. Novruzov², Arseny G. Raab⁴, Elena A. Lukyanova¹, Evgeny A. Korniyushenkov², Dmitriy V. Filonenko⁵, Dmitriy E. Mitrushkin², Sergey V. Dobatkin¹

¹A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences; 49 Leninskiy Prospekt, Moscow 119334, Russia;

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;

³National University of Science and Technology “MISIS”; 4 Leninskiy Prospekt, Moscow 119049, Russia;

⁴Ufa University of Science and Technology; 32 Zaki Validi St., Ufa 450076, Russia;

⁵General Oncology Department of the A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia

Contacts: Natalia Sergeevna Martynenko nataliasmartynenko@gmail.com

Introduction. The biological activity of potential biodegradable zinc-based alloys that are promising for onco-orthopedics was studied in this work. The alloys were processed by equal-channel angular pressing, which made it possible to increase their strength due to microstructure refinement and the ability to provide the functionality of osteosynthesis, fixed due to the metal structure developed on their basis.

Aim. Investigation of effect of equal-channel angular pressing (ECAP) treatment on strength, ductility, degradation rate, biocompatibility *in vitro* and cytotoxicity against SKOV-3 tumor cells of the Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys.

Materials and methods. The Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys in the initial state and after ECAP were used as objects of study, and blood cells of CBA mice were used as model systems. To assess the hemolytic activity, the samples were incubated with red blood cells for 4 and 24 hours at 37 °C, assessing the relative increase in the level of extracellular hemoglobin compared to the intact control. The cytotoxicity of the alloys was assessed by the change in the level of extracellular lactate dehydrogenase (LDH) activity after 24 hours of incubation with mononuclear white blood cells. The study of antitumor cytotoxic activity was carried out on human ovarian cancer cells of the SKOV-3 line *in vitro*, assessing their survival after 48 hours of incubation with alloy samples using the LDH test.

Results. As a result of the studies, it was concluded that the studied alloys after ECAP treatment retained their biocompatibility, since there were no signs of hemolysis and cytotoxicity with respect to blood cells. However, contact with samples of all studied alloys *in vitro* induced a significant inhibition of the metabolic activity of the ovarian cancer cell culture in comparison with the control. Incubation with alloys samples leads to a decrease in cellular activity by an average of 49 % and 59 % for Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys, respectively. The addition of calcium to the composition of the alloy Zn – 1 %Mg contributed to the growth of antitumor cytotoxic activity.

Conclusion. Thus, based on the results of assessing the hemolytic activity and cytotoxicity of the samples, we can conclude that the studied alloys are biocompatible. It was also found that Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys had a pronounced cytotoxic effect on SKOV-3 tumor cells. The obtained data indicate the prospects for the development of a new type of medical devices based on the studied alloys, promising, in particular, for oncoorthopedics: a metal structure developed on their basis can ensure the strength of osteosynthesis, reduce the risk of local recurrence of oncological disease and does not require a second operation to remove the device.

Keywords: zinc alloys, equal channel angular pressing, implant, biodegradation, biocompatibility, cytotoxicity

For citation: Martynenko N.S., Anisimova N.Yu., Rybalchenko O.V. et al. Study of biocompatibility and antitumor cytotoxic activity *in vitro* of Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys strengthened by equal angular pressing. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):64–74. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-64-74

Введение

Идея создания биоразлагаемых изделий медицинского назначения, которые деградировали бы в теле пациента после выполнения необходимых функций, рассматривается учеными уже не одно десятилетие [1–3]. Одними из первых материалов, которые были предложены для этих целей, были биоразлагаемые полимеры [4]. Однако, несмотря на биосовместимость, низкий уровень их механических характеристик не позволяет создавать из них конструкции, которые предполагается эксплуатировать в условиях повышенных нагрузок, например имплантаты для остеосинтеза. Именно поэтому пристальный интерес ученых и медиков вызвали биоразлагаемые металлы, которые наряду с биосовместимостью обладают высокими механическими характеристиками. Среди металлов, способных разлагаться, выбор пал на металлы, которые могут безопасно метаболизироваться организмом и в виде микроэлементов необходимы организму для нормального функционирования, в частности такие как Mg, Fe и Zn. Сплавы на основе магния удовлетворяют требованиям биосовместимости и характеризуются модулем упругости, близким к модулю упругости кости [5]. Железосодержащие сплавы, кроме биосовместимости, обладают высокими прочностными свойствами [6]. Вместе с тем и железные, и магниевые сплавы обладают определенными недостатками. Так, магниевые сплавы демонстрируют высокую скорость деградации, сопровождающуюся выделением водорода. Несмотря на различные мнения о неблагоприятном влиянии на организм газов, скапливающихся вокруг имплантатов, полностью игнорировать их потенциальный вред нельзя [7, 8]. В случае сплавов на основе железа наблюдается образование объемных продуктов деградации, которые могут инкапсулироваться в организме и вызывать воспалительные реакции [9]. Сплавы на основе железа обладают низкой скоростью деградации, что приводит к тому, что имплантат остается в организме пациента на длительный срок уже после завершения его терапевтического эффекта. Цинковые сплавы лишены таких недостатков, как газообразование и образование объемных продуктов деградации. Кроме того, цинк является важным микроэлементом и участвует в метаболических процессах организма человека [10, 11]. При разработке имплантатов на основе цинка следует учитывать то, что передозировка цинка (более 100–300 мг/день) может вызывать тошноту, рвоту, боль в животе и нарушать иммунную функцию [12]. При этом скорость деградации сплавов на основе цинка (~0,1–0,5 мм/год) при отсутствии ярко выраженной дисфункции органов выделения, как предполагается, не способна индуцировать системное накопление в организме токсической дозы этого микроэлемента [13]. Ра-

нее D. Vojtěch и соавт. установили, что доля ионов Zn^{2+} , высвобождающихся в процессе деградации чистого цинка, незначительна по сравнению с максимальным допустимым биологическим пределом [14].

Одной из первых работ, направленных на исследование биосовместимости цинка, была статья P.K. Bowen, J. Drelich, J. Goldman [15]. После имплантации цинковой проволоки в брюшную аорту крысы на 1, 3, 4, 5 и 6 мес авторы не сообщали о наличии воспалительных процессов и отторжений. Более детальное исследование биосовместимости *in vivo* в рамках данной биологической модели было проведено в работе [16]. Это исследование показало превосходную биосовместимость образцов на основе цинка с тканью аорты. Авторы не наблюдали воспалительных реакций и локального некроза, напротив, отмечали регенерацию ткани вокруг частично деградировавшего имплантата [16]. Следующим шагом на пути создания изделий медицинского назначения на основе цинка стало исследование влияния различных элементов на его биосовместимость. S. Du и соавт. показали то, что добавка таких редкоземельных металлов (РЗМ), как La, Ce и Nd, вызывала более выраженную остеоинтеграцию по сравнению с чистым Zn при имплантации пятимесячным самцам новозеландских кроликов [17]. Сплав Zn – 0,8 %Sr оказывал схожий эффект и способствовал остеогенезу [18]. В то же время в исследованиях, проведенных на сплаве Zn – 0,5 %Mn, обнаружено, что имплантация штифтов в проксимальный отдел большеберцовой кости способствует восстановлению поврежденного костного мозга и не приводит к воспалениям тканей и повреждению печени и почек [19]. Кроме того, существует ряд работ, свидетельствующих о том, что оксид цинка обладает противоопухолевой цитотоксической активностью [20, 21]. Известны публикации, в которых продемонстрировано, что такие РЗМ, как Gd, Nd, Eu и La, могут проявлять противоопухолевый эффект [22–24]. Сообщается также, что противоопухолевый эффект могут демонстрировать Mg [25, 26] и Ca [27], характеризующиеся оптимальной биосовместимостью. Из этого следует, что, варьируя состав сплава на основе цинка, можно создавать изделия различного назначения: не только коронарные стенты и имплантаты для остеосинтеза, но также и изделия для онкоортопедии. Однако в случае применения цинковых сплавов в качестве несущего каркаса при травмах и заболеваниях костей следует учитывать их низкие механические характеристики. В таком случае применение предварительной деформационной обработки (например, равноканального углового прессования (РКУП) [28]) для повышения прочности сплавов на основе Zn является необходимой частью разработки готового изделия.

Учитывая изложенное, **цель** настоящего **исследования** заключалась в исследовании влияния обработки методом РКУП на прочность, пластичность, скорость деградации, биосовместимость *in vitro* и цитотоксичность относительно опухолевых клеток линии SKOV-3 сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca.

Материалы и методы

Материалы. Объектами исследования в данной работе являлись 2 сплава: Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca, обладающие потенциалом для разработки на их основе медицинских изделий. Для улучшения механических характеристик изучаемых сплавов их подвергали деформационной обработке методом РКУП, который проводили по маршруту Вс при температуре 300 °С на установке с углом пересечения каналов, равным 120°. Для обоих сплавов проводили по 8 проходов РКУП, что соответствовало степени деформации, равной 6,4.

Исследование механических свойств. Исследование механических характеристик проводили на испытательной машине Instron 3382 (Instron Corp., США) при комнатной температуре. Испытания проводили на плоских образцах с площадью поперечного сечения 2 мм × 1 мм и рабочей длиной равной 5,75 мм.

Подготовка образцов к исследованию деградации и биологических свойств. Для исследований использовали образцы в форме 1/4 диска диаметром 10 мм и толщиной около 1 мм. Перед началом проведения исследований образцы погружали на 2 ч в 60 % этаноле (водный раствор), а затем высушивали в стерильных условиях.

Исследование скорости деградации. Исследования скорости деградации проводили методом потери массы в питательной среде на основе RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), дополненной 10 % фетальной телячьей сывороткой (HyClone™, США), 4 mM L-глутамина («ПанЭко», Россия) и 1 % пенициллин-стрептомицина («ПанЭко», Россия). Образцы, предварительно обработанные погружением в этанол, как было описано выше ($n = 9$ для каждого сплава), выдерживали в инкубационной среде при 37 °С в течение 1, 3 и 7 сут. Среду для инкубации меняли свежей порцией каждые 2 сут. После извлечения образцов их промывали в 10 % водном растворе персульфата аммония ((NH₄)₂S₂O₈) в течение 5 мин для удаления продуктов деградации. Затем образцы тщательно высушивали в стерильной среде и взвешивали на электронных весах Sartorius pro 11 (Data Weighing Systems, США). Значение скорости деградации (DR) рассчитывалось по формуле [29]

$$DR = 8,76 \times 10^4 \times \frac{m_0 - m_f}{A \times t \times \rho},$$

где DR – скорость коррозии, мм/год; m_0 – исходная масса, г; m_f – конечная масса, г; t – время погружения, ч; A – площадь поверхности образца, см²; ρ – плотность сплава, г/см³.

Исследование параметров биосовместимости *in vitro*. С этой целью оценивали гемолитическую активность и цитотоксичность образцов сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca в форме 1/4 диска диаметром 10 мм (не менее чем 6 образцов каждого типа). Перед проведением испытаний все образцы стерилизовали, как указано выше, и исследовали согласно методам, описанным ранее [30]. В качестве биологических моделей использовали клетки крови мышей линии C57BL/6. В частности, для оценки гемолитической активности образцы инкубировали в 2 мл ростовой среды на основе RPMI-1640 с эритроцитами в течение 4 и 24 ч при температуре 37 °С в атмосфере с 5 % углекислым газом, а затем рассчитывали отношение измеренной с помощью планшетного ридера Spark (Tecan, США) при 540 нм оптической плотности внеклеточной среды в лунках с образцами сплавов к контролю, выраженное в процентах. Цитотоксичность оценивали после 24 ч инкубации образцов сплавов в питательной среде с монулекарными лейкоцитами в описанных условиях, путем оценки уровня активности внеклеточной лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Релиз ЛДГ лейкоцитов во внеклеточную среду изучали путем оценки активности ЛДГ в культуральной среде с использованием набора Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific™, США) в соответствии с инструкцией производителя с последующим расчетом отношения величин, измеренных при 450 против 620 нм в среде инкубации образцов сплавов и в контроле, выраженного в процентах. В качестве контролей использовали клетки, которые культивировали без образцов сплавов в аналогичных условиях.

Исследование противоопухолевой цитотоксичности *in vitro*. Исследования проводили на клетках рака яичников человека линии SKOV-3 (коллекция ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Выбор данной биологической модели обусловлен тем, что в клинической практике рак яичников часто является причиной вторичного поражения костей вследствие метастатического распространения клеток первичного опухолевого узла. Это влечет необходимость проведения остеореконструктивных операций после резекции тканей костей, разрушенных опухолью. Образцы сплавов обрабатывали этанолом и высушивали, как описано выше.

Культуру опухолевых клеток в логарифмической фазе обрабатывали раствором Версена («ПанЭко», Россия), отмывали средой RPMI-1640, ресуспендировали в свежей порции ростовой среды и наносили на поверхность образцов сплавов (использовали

не менее трех образцов каждого типа) в объеме 20 мкл на образец (7600 ± 100 клеток). В контроле клеточную суспензию в объеме 20 мкл наносили на дно лунки планшета. После 30 мин культивации клеток при 37°C в атмосфере 5 % углекислого газа во все лунки добавляли по 2 мл полной ростовой среды и инкубировали в течение 3 сут для оценки пролиферации и клеточной колонизации при соблюдении указанных условий. Влияние сплавов на выживаемость опухолевых клеток оценивали, рассчитывая отношение активности ЛДГ клеток на поверхности образцов к контролю. Для документирования роста опухолевых клеток на поверхности образцов сплавов их окрашивали Calcein AM (Sigma, США) и пропидием йодидом с помощью набора Live/Dead Kit (Sigma, США) в соответствии с инструкцией производителя, а затем изучали методом флуоресцентной микроскопии с помощью цифрового микроскопа LionHeart LX (Perkin Elmer, США).

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

Результаты

Механические свойства. Сплавы, предназначенные для создания конструкций для остеосинтеза, должны обладать высоким уровнем прочности, поэтому целесообразно проводить деформационную обработку, направленную на повышение прочности данных материалов. В нашем случае в качестве способа повышения прочностных характеристик исследуемых сплавов было выбрано РКУП. Данная обработка за счет изменения микроструктуры материала приводит к изменению его механических свойств. В таблице представлены результаты исследования

механических свойств сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca до и после РКУП.

Применение РКУП приводит к росту прочности и пластичности обоих исследуемых сплавов. В случае сплава Zn – 1 %Mg РКУП приводит к росту предела прочности со 156 ± 3 МПа в исходном состоянии до 197 ± 9 МПа. При этом наблюдается рост пластичности с $0,2 \pm 0,1$ до $4,0 \pm 0,3$ %. В сплаве Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca после РКУП также наблюдается рост прочности и пластичности. В этом случае предел прочности растет со 154 ± 5 до 209 ± 6 МПа при росте относительного удлинения с $0,4 \pm 0,1$ до $3,2 \pm 1,0$ %. Дальнейшие исследования были проведены на сплавах после обработки РКУП.

Скорость деградации. На рис. 1 представлены результаты исследования деградации сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca после обработки РКУП в среде на основе RPMI-1640. Исследования показали то, что добавка Ca в сплав Zn – 1 %Mg не влияет на его коррозионную стойкость. Однако в случае обоих сплавов с увеличением времени инкубации скорость деградации замедляется. Так, скорость деградации после 1 сут инкубации в среде составила $0,82 \pm 0,04$ и $0,83 \pm 0,01$ мм/год для сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca соответственно. Увеличение длительности инкубации сплавов до 3 сут приводит к снижению данных значений до $0,29 \pm 0,01$ и $0,26 \pm 0,03$ мм/год соответственно. После 7 сут выдержки в растворе средняя скорость деградации снизилась до $0,13 \pm 0,03$ мм/год для сплава Zn – 1 %Mg и $0,13 \pm 0,01$ мм/год – для сплава Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca.

Биосовместимость *in vitro*. Результат исследования гемолитической активности показал то, что изучаемые сплавы не индуцировали статистически достоверного повреждения мембран эритроцитов после 4 и 24 ч инкубации (рис. 2). Однако, сравнивая свойства образцов сплавов разного состава, можно заметить тенденцию нарастания гемолиза под влиянием образцов сплава

Механические свойства сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca до и после равноканального углового прессования (РКУП)

Mechanical properties of the Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys before and after equal-channel angular pressing (ECAP)

Материал и его обработка Material and its processing		Предел текучести, МПа Yield stress, MPa	Предел прочности, МПа Ultimate tensile strength, MPa	Удлинение, % Elongation, %
Zn – 1 %Mg	Отжиг Annealing	153 ± 7	156 ± 3	$0,2 \pm 0,1$
	РКУП ECAP	164 ± 9	197 ± 9	$4,0 \pm 0,3$
Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca	Отжиг Annealing	135 ± 13	154 ± 5	$0,4 \pm 0,1$
	РКУП ECAP	179 ± 6	209 ± 6	$3,2 \pm 1,0$

Zn – 1 %Mg в сравнении с эффектом сплава Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca ($p > 0,05$).

Изучение цитотоксичности относительно лейкоцитов крови продемонстрировало то, что присутствие обоих изученных сплавов в среде инкубации не приводило к достоверному повышению активности внеклеточной ЛДГ в сравнении с контролем ($p > 0,05$) (рис. 3). Отсутствие признаков индуцированного релиза ЛДГ во внеклеточную среду свидетельствует о сохранении его локализации в цитозоле клетки на протяжении всего периода коинкубации с образцами

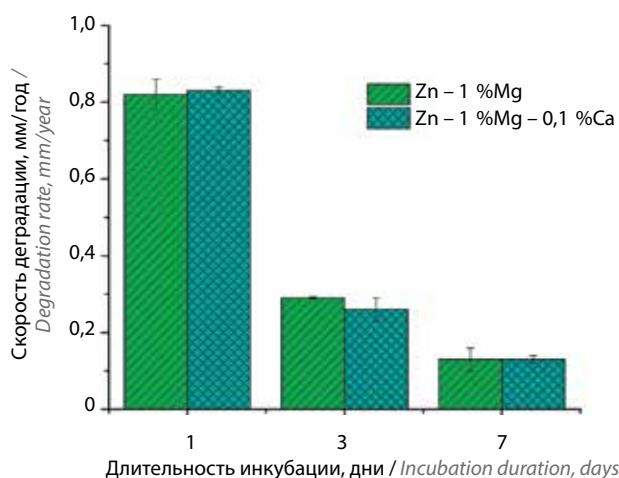


Рис. 1. Скорость деградации сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca после обработки равноканальным угловым прессованием при инкубации в среде на основе RPMI-1640 в течение 1, 3 и 7 сут

Fig. 1. The degradation rate of the Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys after equal-channel angular pressing treatment during incubation in a medium based on RPMI-1640 for 1, 3 and 7 days

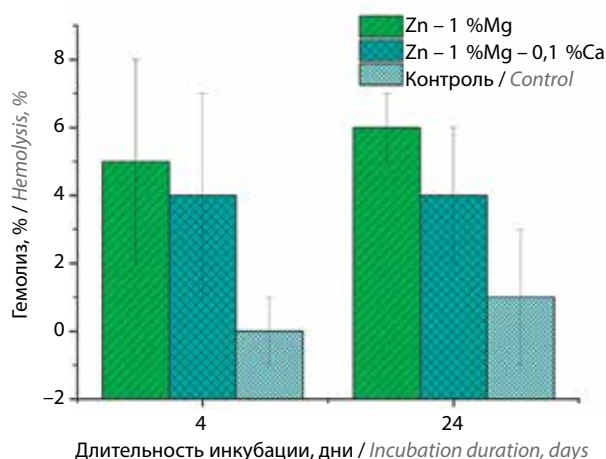


Рис. 2. Гемолитическая активность сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca после обработки РКУП в сравнении с контролем

Fig. 2. Hemolytic activity of the Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys after equal-channel angular pressing treatment in comparison with control

сплавов, что позволяет сделать вывод об отсутствии признаков повреждения клеточных мембран модельных иммунных клеток под воздействием изучаемых сплавов.

Приведенные результаты не выявили признаков повреждения клеток крови вследствие контакта *in vitro* с изучаемыми сплавами Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca после РКУП. Таким образом, можно сделать вывод о том, что введение кальция в состав

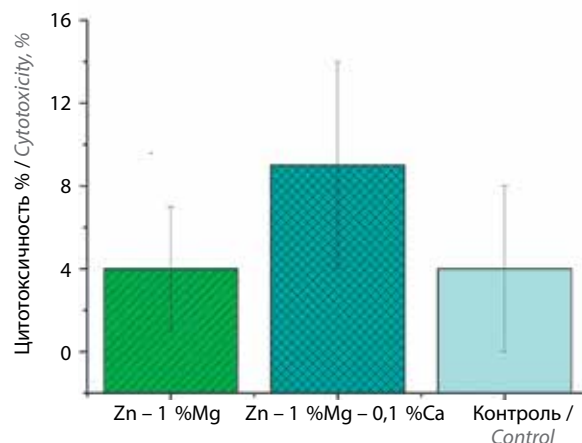


Рис. 3. Изучение цитотоксичности сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca по результатам регистрации уровня внеклеточной активности лактатдегидрогеназы лейкоцитов крови человека после инкубации с изученными образцами в сравнении с контролем

Fig. 3. The study of the cytotoxicity of the Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys based on the results of registration of the level of extracellular activity of lactate dehydrogenase in human white blood cells after incubation with the studied samples in comparison with the control

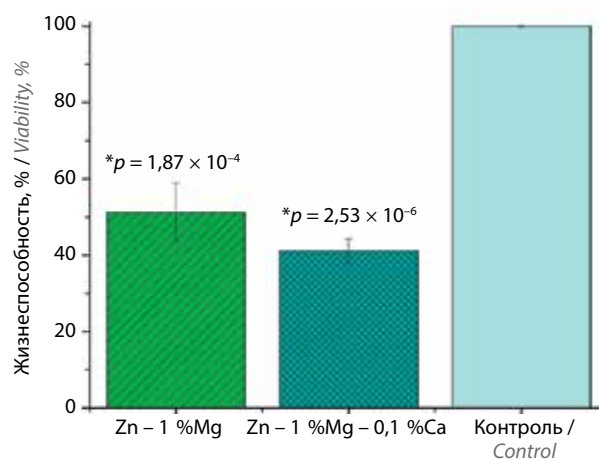


Рис. 4. Подавление выживаемости опухолевых клеток линии SKOV-3 после инкубации на поверхности сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca после обработки равноканальным угловым прессованием в сравнении с контролем (интактные клетки) *in vitro*, * $p < 0,05$

Fig. 4. Viability suppression of SKOV-3 tumor cells after incubation on the surface of Zn – 1 %Mg and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca alloys after equal-channel angular pressing treatment in comparison with the control (intact cells) *in vitro*, * $p < 0,05$

сплава Zn – 1 %Mg и деформационная обработка методом РКУП не индуцируют изменение их биосовместимости.

Противоопухолевая цитотоксичность *in vitro*. Результаты оценки проявлений специфической биоактивности разработанных сплавов в виде цитотоксического воздействия на опухолевые клетки представлены на рис. 4 и 5. Полученные результаты показывают то, что контакт с обоими сплавами угнетает выживаемость опухолевых клеток (рис. 4). На это указывает достоверное снижение результатов ЛДГ-теста, основанного на оценке метаболической активности клеточной культуры после инкубации на поверхности образцов сплавов в сравнении с контролем, а также микрофотографии, приведенные на рис. 5. После обработки РКУП сплав Zn – 1 %Mg угнетал клеточную активность в среднем на 49 %, а Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca на 59 %. Изучение клеток на поверхности сплавов с использованием флуоресцентной микроскопии позволило прийти к сходным выводам. В сравнении с контролем можно увидеть значительное повышение концентрации в культуре нежизнеспособных клеток с поврежденной цитоплазмой, а также драматичное снижение абсолютного количества живых клеток на поверхности образцов сплавов. Эти признаки были особенно выражены на образцах сплава Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca.

Обсуждение

В настоящей работе было проведено исследование механических характеристик, скорости деградации, отдельных параметров биосовместимости и цитотоксической противоопухолевой активности сплавов Zn – 1 %Mg и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca,

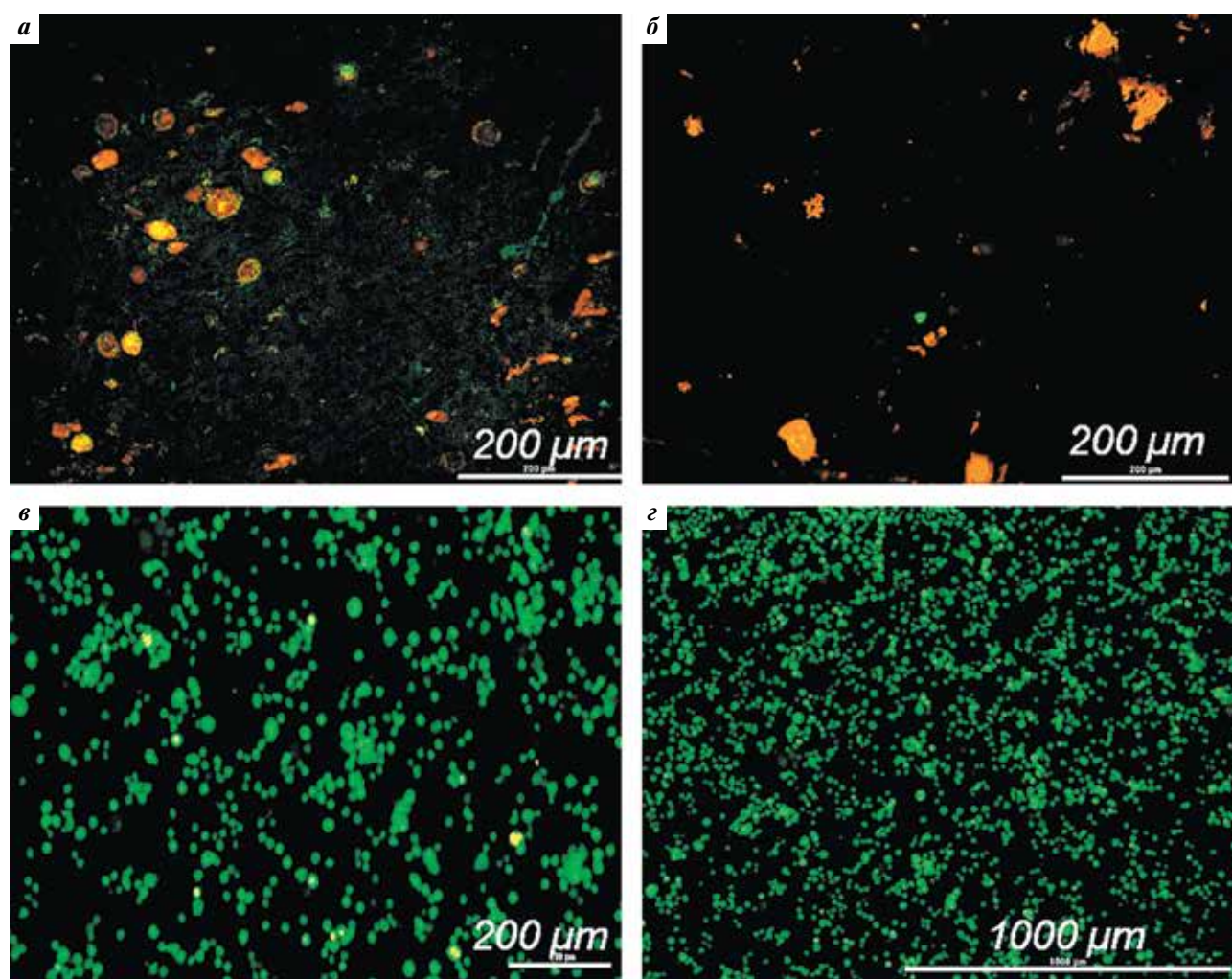


Рис. 5. Микрофотографии опухолевых клеток линии SKOV-3 на поверхности образцов сплавов Zn – 1 %Mg (а, в) и Zn – 1 %Mg – 0,1 %Ca (б, г) после 3 дней инкубации. Окраска Calcein AM и пропидием йодидом для визуализации живых (зеленый цвет) и клеток с поврежденной мембраной (красный цвет) соответственно

Fig. 5. Micrographs of tumor cells of the SKOV-3 line on the surface of Zn – 1 %Mg (a, c) and Zn – 1 %Mg – 0.1 %Ca (b, d) alloys samples after 3 days of incubation. Calcein AM and propidium iodide staining to visualize live (green) and membrane-damaged (red) cells, respectively

упрочненных РКУП. Исследования подтвердили то, что применение обработки с помощью РКУП позволяет повысить прочность обоих исследованных сплавов на 20–25 % при повышении пластичности на порядок. Рост механических характеристик вызван изменениями, происходящими в структуре и текстуре сплавов в процессе деформационной обработки. Ранее X. Zhuo и соавт. показали то, что РКУП сплава $Zn - 0,4 \%Mg - 0,02 \%Mn$ приводит к росту прочности со $126,0 \pm 4,4$ до $194,5 \pm 4,3$ МПа при росте пластичности с $1,7 \pm 0,1$ до $9,8 \pm 1,1$ % [31]. Было также доказано то, что формирование однородной измельченной микроструктуры и наклоненной базисной текстуры после РКУП приводило к росту прочности и пластичности сплава $Zn - 1,5 \%Mg - 0,3 \%Y$ [32].

При исследовании процессов деградации обнаружено то, что добавка 0,1 %Ca не приводит к изменению скорости деградации сплава $Zn - 1 \%Mg$. При этом увеличение срока инкубации с 1 до 3 дней в 2 раза уменьшает скорость деградации. После инкубации в течение 7 дней скорость деградации обоих сплавов снижается еще вдвое. Снижение скорости деградации может быть связано с постепенным разрастанием на поверхности образцов пленки, состоящей из продуктов деградации сплавов. K. Niu и соавт. [33] исследовали разрастание пленки продуктов деградации на сплавах $Zn - 4 \%Ag$, $Zn - 4 \%Ag - Cu$ и $Zn - 4 \%Ag - Mn$ после инкубации в растворе Хенкса. Исследования подтвердили, что на начальных этапах деградации на поверхности образцов образовывались точечные очаги продуктов коррозии, которые при увеличении срока эксперимента превращались в пленку толщиной 50,5; 75,7 и 230,3 мкм для сплавов $Zn - 4 \%Ag$, $Zn - 4 \%Ag - Cu$ и $Zn - 4 \%Ag - Mn$ соответственно. Исследования, проведенные на чистом цинке и сплавах $Zn - 3 \%Ag$ и $Zn - 3 \%Ag - 0,5 \%Mg$, также согласуются с нашими результатами. Так, потеря массы чистого Zn и сплавов $Zn - 3 \%Ag$, $Zn - 3 \%Ag - 0,5 \%Mg$ после 14 дней инкубации в растворе Хенкса составляла $32,5 \pm 2,0$, $26,1 \pm 0,6$ и $29,3 \pm 3,3$ мкм/год. После 30 дней испытаний процесс деградации замедлился до $10,4 \pm 0,8$, $15,3 \pm 3,9$ и $14,5 \pm 1,6$ мкм/год для чистого Zn, $Zn - 3 \%Ag$, $Zn - 3 \%Ag - 0,5 \%Mg$ соответственно [34]. Кроме того, стоит подчеркнуть, что полученное нами значение скорости деградации сплавов близко к скорости, заявляемой как «идеальная» скорость деградации биорезорбируемого имплантата. Ранее было показано, что скорость деградации $\sim 0,5$ мм/год является наиболее приемлемой с точки зрения обеспечения одновременного постепенного рассасывания изделия и сохранения его несущей способности [35].

Проведенные исследования биосовместимости в условиях *in vitro* не выявили значимого увеличения гемолитической активности эритроцитов крови и уг-

нетения жизнеспособности лейкоцитов крови человека ($p > 0,05$), что указывает на отсутствие признаков повреждения клеток крови под влиянием изученных сплавов цинка после обработки РКУП. Полученные данные хорошо согласуются с ранее выполненными исследованиями. Исследования гемосовместимости других сплавов цинка, например $Zn - 2 \%Cu - 0,2 \%Mn - Li$ (с различным содержанием Li), показали то, что уровень индуцированного гемолиза сплавов не превышал 2 %, при этом величина эффекта коррелировала с концентрацией экстракта [36]. Сплавы Zn , $Zn - 0,8 \%Cu$, $Zn - 0,8 \%Mn$ и $Zn - 0,8 \%Li$ демонстрировали схожий результат [37]. Полученные нами данные об отсутствии негативного воздействия на клетки крови деформационной обработки методом РКУП, опосредующей изменение микроструктуры сплавов [38, 39], согласуются с результатами наших предыдущих исследований, доказавших биосовместимость сплавов $Zn - 1 \%Mg$ и $Zn - 1 \%Mg - 0,1 \%Ca$, обработанных кручением под высоким давлением. Тем не менее, согласно работам других исследователей, можно сделать вывод о том, что применение иных методов обработки сплавов может ухудшить их биосовместимость. Например, есть данные о том, что после кручения под высоким давлением сплав $Zn - 1 \%Mg - 0,1 \%Ca$ демонстрировал умеренную цитотоксичность, тогда как цитотоксичность сплава $Zn - 1 \%Mg$ значимо не отличалась от контроля [40, 41]. Отдельно стоит отметить влияние изменения химического состава на биоактивные свойства сплава. В частности, есть данные о появлении у сплавов на основе системы Zn–Mg дополнительных функциональных свойств в сравнении с чистым цинком. Так, X. Tong и соавт. наблюдали то, что сплавы $Zn - 1 \%Mg$ и $Zn - 1 \%Mg - 0,1 \%P3M$ обладали эффективным антикоагулянтным действием, причем добавка P3M приводила к увеличению этого действия [42], а сплавы на основе системы Zn–Sr демонстрировали умеренную антибактериальную активность [43]. Кроме того, как уже было прежде упомянуто, ионы цинка, магния и кальция могут обладать специфической противоопухолевой цитотоксической активностью [20–21, 25–27]. Проведенные нами в данной работе исследования подтверждают способность сплавов угнетать выживаемость опухолевых клеток на примере клеток рака яичников человека линии SKOV-3. Ранее нами уже было представлено то, что сплав $Mg - 1,03 \%Zn - 0,66 \%Ca$, деградирующий с выделением ионов Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , демонстрирует специфическую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток линии K562 [44]. При деградации исследуемых в работе сплавов также выделяются ионы Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , с той только разницей, что в случае сплавов на основе цинка большинством ионов в растворе являются

не ионы Mg^{2+} , а ионы Zn^{2+} , противоопухолевый эффект которых в медицине хорошо известен [45–48]. Несмотря на то что нами не было выявлено значимой разницы в цитотоксичности сплавов $Zn - 1\%Mg$ и $Zn - 1\%Mg - 0,1\%Ca$ против клеток линии SKOV-3, наблюдалась тенденция к нарастанию противоопухолевой цитотоксичности в случае добавления кальция. При этом $0,1\%Ca$, добавленный в состав сплава, вероятно, приводил к релизу довольно низкой концентрации ионов Ca^{2+} . Именно поэтому есть основания полагать, что увеличение содержания кальция в сплаве может усиливать противоопухолевый эффект.

Закключение

Таким образом, в результате проведенного исследования мы пришли к выводу о том, что обработка методом РКУП не ухудшает биосовместимость сплавов $Zn - 1\%Mg$ и $Zn - 1\%Mg - 0,1\%Ca$. Полученные результаты позволяют рассматривать эти сплавы как перспективные для создания на их основе биодеградируемых медицинских изделий. Полученные данные об угнетении выживаемости клеток рака яичников человека линии SKOV-3 после инкубации на поверхности обоих изученных сплавов позволяют предположить, что использование полученного на их

основе погружного медицинского изделия сможет локально тормозить развитие опухолевого роста. Вероятно, подобный подход может быть реализован в онкоортопедии для остеосинтеза или возмещения дефектов костной ткани, пораженной опухолевым процессом. В настоящем исследовании было показано то, что обработка РКУП за счет регуляции структуры и текстуры исследуемых сплавов позволяет повысить их прочность на 20–25 % при росте пластичности на порядок. Приведенные данные указывают на перспективность разработки на основе изучаемых сплавов медицинских изделий нового типа, способных деградировать в биологически активной среде со скоростью, не препятствующей сохранению их целостности, с постепенным замещением их объема собственной вновь образованной тканью организма и релизом биоактивных компонентов. В частности, обнаруженные свойства обосновывают их использование в качестве базы погружных имплантатов и крепежных элементов для проведения остеореconstructивных операций у онкологических больных благодаря уникальному сочетанию механических свойств и потенциала снижения риска рецидивов опухоли за счет реализации контактной цитотоксической противоопухолевой активности в локусе имплантации металлоконструкций.

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

1. Staiger M.P., Pietak A.M., Huadmai J. et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials* 2006;27(9):1728–34. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.10.003
2. Zhuo X., Wu Y., Ju J. et al. Recent progress of novel biodegradable zinc alloys: from the perspective of strengthening and toughening. *J Mater Res Technol* 2022;17:244–69. DOI: 10.1016/j.jmrt.2022.01.004
3. Han H.-S., Loffredo S., Jun I. et al. Current status and outlook on the clinical translation of biodegradable metals. *Materials Today* 2019;23:57–71. DOI: 10.1016/j.mattod.2018.05.018
4. Zhao B., Qiu X., Wang D. et al. Application of bioabsorbable screw fixation for anterior cervical decompression and bone grafting. *Clinics* 2016;71:320–4. DOI: 10.6061/clinics/2016(06)06
5. Tsakiris V., Tardei C., Clincinschi F.M. Biodegradable Mg alloys for orthopedic implants – A review. *J Magnes Alloy* 2021;9(6):1884–905. DOI: 10.1016/j.jma.2021.06.024
6. Li S., Ren J., Wang X. et al. Dilemmas and countermeasures of Fe-based biomaterials for next-generation bone implants. *J Mater Res Technol* 2022;20:2034–50. DOI: 10.1016/j.jmrt.2022.07.089
7. Zhang S., Zhang X., Zhao C. et al. Research on an Mg–Zn alloy as a degradable biomaterial. *Acta Biomater* 2010;6:626–40. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.06.028
8. Witte F., Fischer J., Nellesen J. et al. *In vitro* and *in vivo* corrosion measurements of magnesium alloys. *Biomaterials* 2006;27:1013–8. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.037
9. Zheng Y.F., Gu X.N., Witte F. Biodegradable metals. *Mater Sci Eng R Rep* 2014;77:1–34. DOI: 10.1016/j.mser.2014.01.001
10. Frederickson C.J., Koh J.-Y., Bush A.I. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 2005;6:449–62. DOI: 10.1038/nrn1671
11. Vallee B.L., Falchuk K.H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 1993;73:79–118. DOI: 10.1152/physrev.1993.73.1.79
12. Fosmire G.J. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 1990;51:225–7. DOI: 10.1093/ajcn/51.2.22
13. Kabir H., Munir K., Wen C., Li Y. Recent research and progress of biodegradable zinc alloys and composites for biomedical applications: Biomechanical and biocorrosion perspectives. *Bioact Mater* 2021;6(3):836–79. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.09.013
14. Vojtěch D., Kubásek J., Serák J., Novák P. Mechanical and corrosion properties of newly developed biodegradable Zn-based alloys for bone fixation. *Acta Biomater* 2011;7:3515–22. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.05.008
15. Bowen P.K., Drelich J., Goldman J. Zinc exhibits ideal physiological corrosion behavior for bioabsorbable stents. *Adv Mater* 2013;25:2577–82. DOI: 10.1002/adma.201300226
16. Bowen P.K., Guillory R.J., Shearier E.R. et al. Metallic zinc exhibits optimal biocompatibility for bioabsorbable endovascular stents. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2015;56:467–72. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.022
17. Du S., Shen Y., Zheng Y. et al. Systematic *in vitro* and *in vivo* study on biodegradable binary Zn–0.2 at% Rare Earth alloys (Zn–RE: Sc, Y, La–Nd, Sm–Lu). *Bioact Mater* 2023; 24:507–23. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2023.01.004

18. Jia B., Yang H., Zhang Z. et al. Biodegradable Zn–Sr alloy for bone regeneration in rat femoral condyle defect model: *In vitro* and *in vivo* studies. *Bioact Mater* 2021;6(6):1588–604. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2020.11.007
19. Guo P., Zhu X., Yang L. et al. Ultrafine- and uniform-grained biodegradable Zn–0.5Mn alloy: Grain refinement mechanism, corrosion behavior, and biocompatibility *in vivo*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111391. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111391
20. Guruviah K., Annamalai S.K., Ramaswamy A. et al. Comparative antimicrobial and anticancer activity of biologically and chemically synthesized zinc oxide nanoparticles toward breast cancer cells. *Nanomater* 2020;7(4):272–83. DOI: 10.22038/nmj.2020.07.00003
21. Al-Enazi N.M., Alsamhary K., Kha M. et al. *In vitro* anticancer and antibacterial performance of biosynthesized Ag and Ce co-doped ZnO NPs. *Bioprocess Biosyst Eng* 2023;46:89–103.
22. Feyerabend F., Fischer J., Holtz J. et al. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys on primary cells and cell lines. *Acta Biomater* 2010;6(5):1834–42. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.09.024
23. Liu S.S., Lu D., Miao L.F. et al. Effects of lanthanum chloride on proliferation and migration of human cervical cancer cell line HeLa cells. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2010;45(8):609–13. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-567x.2010.08.012
24. Feng C., Gan Q., Liu X. et al. Synthesis, antitumor and apoptosis inducing activities of novel 5-fluorouracil derivatives of rare earth (Sm, Eu) substituted polyoxometalates. *Chin J Chem Eng* 2012;30(7):5–8. DOI: 10.1002/cjoc.201100744
25. Li T., Xu W., Liu C. et al. Anticancer effect of biodegradable magnesium on hepatobiliary carcinoma: an *in vitro* and *in vivo* study. *ACS Biomater Sci Eng* 2021;7(6):2774–82. DOI: 10.1021/acsbomaterials.1c00288
26. Wei X., Tang Z., Wu H. et al. Biofunctional magnesium-coated Ti6Al4V scaffolds promote autophagy-dependent apoptosis in osteosarcoma by activating the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway. *Mater Today Bio* 2021;12:100147. DOI: 10.1016/j.mtbio.2021.100147
27. Dou J.-P., Wu Q., Fu C.-H. et al. Amplified intracellular Ca^{2+} for synergistic anti-tumor therapy of microwave ablation and chemotherapy. *J Nanobiotechnology* 2019;17(1):118. DOI: 10.1186/s12951-019-0549-0
28. Valiev R.Z., Langdon T.G. Principles of equal-channel angular pressing as a processing tool for grain refinement. *Prog Mater Sci* 2006;51(7):881–981. DOI: 10.1016/j.pmatsci.2006.02.003
29. ASTM G1-03-E. Standard practice for preparing, cleaning, and evaluating corrosion test specimens. West Conshohocken, PA: ASTM International, 2011.
30. Choudhary R., Venkatraman S.K., Bulygina I. et al. Biomaterialization, dissolution and cellular studies of silicate bioceramics prepared from eggshell and rice husk. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2021;118:111456. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111456
31. Zhuo X., Gao W., Zhao L. et al. A bimodal grain structured Zn–0.4Mg–0.02Mn alloy with superior strength-ductility synergy. *Materials Science and Engineering: A* 2023;862:144514. DOI: 10.1016/j.msea.2022.144514
32. Huang H., Liu H., Ren K. et al. Improvement of ductility and work hardening ability in a high strength Zn–Mg–Y alloy via micron-sized and submicron-sized YZn_{12} particles. *J Alloys Compd* 2021;877:160268. DOI: 10.1016/j.jallcom.2021.160268
33. Niu K., Zhang D., Qi F. et al. The effects of Cu and Mn on the microstructure, mechanical, corrosion properties and biocompatibility of Zn–4Ag alloy. *J Mater Res Technology* 2022;21:4969–81. DOI: 10.1016/j.jmrt.2022.11.083
34. Wątroba M., Mech K., Bednarczyk W. et al. Long-term *in vitro* corrosion behavior of Zn–3Ag and Zn–3Ag–0.5Mg alloys considered for biodegradable implant applications. *Mater Des* 2022;213:110289. DOI: 10.1016/j.matdes.2021.110289
35. Venezuela J., Dargusch M.S. The influence of alloying and fabrication techniques on the mechanical properties, biodegradability and biocompatibility of zinc: A comprehensive review. *Acta Biomater* 2019;87:1–40. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.01.035
36. Duan J., Li L., Liu C. et al. Novel Zn–2Cu–0.2Mn–xLi (x = 0, 0.1 and 0.38) alloys developed for potential biodegradable implant applications. *J Alloys Compd* 2022;916:165478. DOI: 10.1016/j.jallcom.2022.165478
37. Yin Y.-X., Zhou C., Shi Y.-P. et al. Hemocompatibility of biodegradable Zn–0.8 wt% (Cu, Mn, Li) alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019;104:109896. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109896
38. Rybalchenko O.V., Anisimova N.Yu., Kiselevsky M.V. et al. Effect of equal-channel angular pressing on structure and properties of Fe–Mn–C alloys for biomedical applications. *Mater Today Commun* 2022;30:103048. DOI: 10.1016/j.mtcomm.2021.103048
39. Martynenko N., Lukyanova E., Anisimova N. et al. Improving the property profile of a bioresorbable Mg–Y–Nd–Zr alloy by deformation treatments. *Materialia* 2020;13(2):100841. DOI: 10.1016/j.mtla.2020.100841
40. Martynenko N., Anisimova N., Rybalchenko O. et al. Effect of high pressure torsion on microstructure, mechanical and operational properties of Zn–1%Mg–0.1%Ca alloy. *Metals* 2022;12(10):1681. DOI: 10.3390/met12101681
41. Martynenko N., Anisimova N., Rybalchenko O. et al. Structure, biodegradation and *in vitro* bioactivity of Zn–1%Mg alloy strengthened by high pressure torsion. *Materials* 2022;15(24):9073. DOI: 10.3390/ma15249073
42. Tong X., Zhang D., Lin J. et al. Development of biodegradable Zn–1Mg–0.1RE (RE = Er, Dy, and Ho) alloys for biomedical applications. *Acta Biomater* 2020;117:384–99. DOI: 10.1016/j.actbio.2020.09.036
43. Su Y., Fu J., Du S. Biodegradable Zn–Sr alloys with enhanced mechanical and biocompatibility for biomedical applications. *Smart Mat Med* 2021;3:117–27. DOI: 10.1016/j.smaim.2021.12.004
44. Martynenko N., Anisimova N., Kiselevskiy M. et al. Structure, mechanical characteristics, biodegradation, and *in vitro* cytotoxicity of magnesium alloy ZX11 processed by rotary swaging. *J Magnes Alloy* 2020;8(4):1038–46. DOI: 10.1016/j.jma.2020.08.008
45. Ma Z., Cao Y., Li Q. et al. Synthesis, characterization, solid-state photo-luminescence and anti-tumor activity of zinc(II) 4'-phenyl-terpyridine compounds. *J Inorg Biochem* 2010;104(7):704–11. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2010.03.002
46. Magda D., Lecane P., Wang Z. et al. Synthesis and anticancer properties of water-soluble zinc ionophores. *Cancer Res* 2008;68:5318–25. DOI: 10.1158/0008-5472.can-08-0601
47. Feng P., Li T.L., Guan Z.X. et al. Effect of zinc on prostatic tumorigenicity in nude mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:316–20. DOI: 10.1196/annals.1299.056
48. Liguori P.F., Valentini A., Palma M. et al. Non-classical anticancer agents: synthesis and biological evaluation of zinc(II) heteroleptic complexes. *Dalton Trans* 2010;39:4205–12. DOI: 10.1039/b922101h

Благодарность. Авторы выражают благодарность кандидатам технических наук А.В. Санникову и А.В. Колтыгину, а также кафедре литейных технологий и художественной обработки материалов НИТУ «МИСИС» за помощь в выплавке материалов исследования.

Acknowledgment. The authors are grateful to Dr. A.V. Sannikov and Dr. A.V. Koltygin, as well as to Department of Casting Technologies and Artistic Processing of Materials of the National University of Science and Technology "MISIS" for assistance in smelting research materials.

Вклад авторов

Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова: разработка дизайна исследования, написание текста рукописи;
Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова, О.В. Рыбальченко, Д.Р. Темралиева, М.В. Шинкарева, К.М. Новрузов, А.Г. Рааб, Е.А. Лукьянова, Е.А. Корнюшенков, Д.В. Филоненко: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
Н.С. Мартыненко, Н.Ю. Анисимова, О.В. Рыбальченко, Е.А. Лукьянова, К.М. Новрузов: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных;

Д.Е. Митрушкин, С.В. Добаткин: формальный анализ, рецензирование.

Author's contributions

N.S. Martynenko and N.Yu. Anisimova: research design, writing the text of the manuscript;

N.S. Martynenko, N.Yu. Anisimova, O.V. Rybalchenko, D.R. Temralieva, M.V. Shinkareva, K.M. Novruzov, A.G. Raab, E.A. Lukyanova, E.A. Kornushenkov, D.V. Filonenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

N.S. Martynenko, N.Yu. Anisimova, O.V. Rybalchenko, E.A. Lukyanova, K.M. Novruzov: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained;

D.E. Mitrushkin, S.V. Dobatkin: formal analysis and review.

ORCID авторов / ORCID of authors:

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

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

О.В. Рыбальченко / O.V. Rybalchenko: <https://orcid.org/0000-0002-0403-0800>

М.В. Шинкарева / M.V. Shinkareva: <https://orcid.org/0000-0002-8208-9111>

Д.Р. Темралиева / D.R. Temralieva: <https://orcid.org/0000-0002-8392-7826>

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

А.Г. Рааб / A.G. Raab: <https://orcid.org/0000-0003-1993-413X>

Е.А. Лукьянова / E.A. Lukyanova: <https://orcid.org/0000-0001-7122-6427>

Е.А. Корнюшенков / E.A. Kornushenkov: <https://orcid.org/0000-0002-3903-8773>

Д.В. Филоненко / D.V. Filonenko: <https://orcid.org/0000-0002-9943-3054>

Д.Е. Митрушкин / D.E. Mitrushkin: <https://orcid.org/0000-0003-3778-303X>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00024).

Financing. This research was supported by the Russian Science Foundation (Grant No 22-13-00024).

Статья поступила: 16.02.2023. Принята к печати: 15.08.2023.

Article submitted: 16.02.2023. Accepted for publication: 15.08.2023.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2023-22-3-75-86>

Комбинированная фотодинамическая и радиодинамическая терапии с хлориновым фотосенсибилизатором при фракционированном лучевом воздействии на перевивные опухоли в эксперименте *in vivo*

Д.А. Церковский¹, А.Н. Мазуренко¹, Д.И. Козловский¹, Н.Д. Адаменко², Ф.Ф. Боричевский³

¹ГУ «Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»; Республика Беларусь, 223040 Минская область, Минский район, аг. Лесной;

²УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»; Республика Беларусь, 210038 Витебск, пр-т Московский, 33;

³Минская областная клиническая больница; Республика Беларусь, 223040 Минская область, Минский район, аг. Лесной

Контакты: Дмитрий Александрович Церковский tzerkovsky@mail.ru

Введение. Актуальным направлением научных исследований в экспериментальной и клинической онкологии является радиодинамическая терапия (РДТ) – метод лечения, основанный на активации фотосенсибилизаторов (ФС) ионизирующим излучением. Как показывают результаты *in vitro/in vivo* исследований, ряд фотосенсибилизирующих агентов обладают радиомодифицирующими свойствами, а сам метод характеризуется высокой противоопухолевой эффективностью.

Цель исследования – изучить возможность повышения эффективности фотодинамической терапии (ФДТ) за счет ее комбинированного применения с РДТ в эксперименте *in vivo*.

Материалы и методы. Работа выполнена на 26 белых нелинейных крысах с массой тела 180 ± 50 г. В качестве опухолевой модели использовали лимфосаркомку Плисса (ЛСП), которую перевивали подкожно. ФС, представляющий собой тринатриевую соль хлорина е6 («Белмедпрепараты», Беларусь), вводился внутривенно в дозе 2,5 мг/кг массы тела. Сеанс РДТ проводили через 2,5–3,0, 24 и 48 ч после окончания инфузии ФС контактным методом (КЛТ) на аппарате microSelectron-HDR V3 Digital (Elekta, Швеция) с использованием γ -излучения (^{192}Ir) в разовой очаговой дозе (РОД) 2 Гр до достижения суммарной очаговой дозы (СОД) 6 Гр. Сеанс ФДТ осуществляли однократно непосредственно после первого воздействия ионизирующим излучением с помощью полупроводникового лазера PDT diode laser (Imaf Axicon, Беларусь, $\lambda = 660 \pm 5$ нм) в экспозиционной дозе 100 Дж/см² с плотностью мощности 0,2 Вт/см² и мощностью 0,353 Вт. Все крысы были разделены на 4 группы по 6–7 особей в каждой: интактный контроль, ФС + ФДТ, ФС + КЛТ, ФС + КЛТ + ФДТ. Критериями оценки противоопухолевой эффективности были: средний объем опухолей (V_{cp}), коэффициент абсолютного прироста опухолей (К), коэффициент торможения роста опухолей (ТРО), частота полных опухолевых регрессий (ПР), доля излеченных крыс, показатель увеличения средней продолжительности жизни (УПЖ) павших крыс. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты. На 18-е сутки эксперимента V_{cp} в группах составил $65,98 \pm 0,81$ см³; $24,02 \pm 4,01$ см³ ($p < 0,00001$); $17,11 \pm 4,13$ см³ ($p < 0,00001$); $4,42 \pm 1,65$ см³ ($p < 0,00001$) соответственно. Коэффициенты К – 5497,33 ОЕ, 1714,71 ОЕ, 1424,83 ОЕ, 367,33 ОЕ. Коэффициенты ТРО – 63,60 % (ФС + ФДТ); 74,07 % (ФС + КЛТ); 93,30 % (ФС + КЛТ + ФДТ). Показатель УПЖ – 25,31 % (ФС + ФДТ); 55,06 % (ФС + КЛТ); 158,22 % (ФС + КЛТ + ФДТ). На 60-е и 90-е сутки эксперимента частота ПР и доля излеченных крыс были одинаковыми и составили в группах 0; 16,7; 14,3 и 42,9 % соответственно.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о наличии у хлоринового ФС помимо фотосенсибилизирующих свойств также и радиомодифицирующих, а разработанный метод комбинированной терапии характеризуется высокой противоопухолевой эффективностью.

Ключевые слова: крысы, перевивные опухоли, фотодинамическая терапия, радиодинамическая терапия, фотосенсибилизатор

Для цитирования: Церковский Д.А., Мазуренко А.Н., Козловский Д.И. и др. Комбинированная фотодинамическая и радиодинамическая терапии с хлориновым фотосенсибилизатором при фракционированном лучевом воздействии на перевивные опухоли в эксперименте *in vivo*. Российский биотерапевтический журнал 2023;22(3): 75–86. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-75-86

Combined photodynamic and radiodynamic therapy with a chlorine photosensitizer under fractionated radiation exposure to transplanted tumors in an *in vivo* experiment

Dmitry A. Tzerkovsky¹, Alexandr N. Mazurenko², Denis I. Kozlovsky¹, Natalia D. Adamenko², Fedor F. Borichevsky³

¹N. N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus; Lesnoy, Minsk region 223040, Republic of Belarus;

²P. M. Masherov Vitebsk State University; 33 Moskovskiy ave., Vitebsk 210038, Republic of Belarus;

³Minsk Regional Clinical Hospital; Lesnoy, Minsk region 223040, Republic of Belarus

Contacts: Dmitry Alexandrovich Tzerkovsky tzerkovsky@mail.ru

Introduction. The current direction of scientific research in experimental and clinical oncology is radiodynamic therapy (RDT), a treatment method based on the activation of photosensitizers (PS) by ionizing radiation. As the results of *in vitro/in vivo* studies show, a number of photosensitizing agents have radiomodifying properties, and the method itself is characterized by high antitumor efficacy.

Aim. To study the possibility of increasing the effectiveness of photodynamic therapy (PDT) through its combined use with RDT in an *in vivo* experiment.

Materials and methods. The work was performed on 26 white non-linear rats weighing 180 ± 50 g. Pliss lymphosarcoma was used as a tumor model, which was transplanted subcutaneously. The chlorine-based PS (Belmed-preparaty, Republic of Belarus) was administered intravenously at a dose of 2.5 mg/kg of body weight. The RDT session was performed by the contact method (CRT) after 2.5–3, 24 and 48 hours after the end of PS administration on the microSelectron-HDR V3 Digital device (Elekta, Sweden) using γ -radiation (^{192}Ir) in a single focal dose (SFD) of 2 Gy until the total focal dose of 6 Gy is reached. A PDT session was performed once immediately after the first exposure to ionizing radiation using a PDT diode laser (Imaf Axicon, Republic of Belarus, $\lambda = 660 \pm 5$ nm) at an exposure dose of 100 J/cm² with a power density of 0.2 W/cm² and a power of 0.353 W. All rats were divided into 4 groups of 6–7 animals each: intact control, PS + PDT, PS + CRT, PS + CRT + PDT. The criteria for evaluating antitumor efficacy were: the average volume of tumors (V_{av}), the coefficient of absolute growth of tumors (K), the coefficient of tumor growth inhibition (TGI), the frequency of complete tumor regressions (CR), the proportion of cured rats, an increase in the average duration of dead rats. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. On the 18th day of the experiment, V_{av} in groups was 65.98 ± 0.81 cm³; 24.02 ± 4.01 cm³ ($p < 0.00001$); 17.11 ± 4.13 cm³ ($p < 0.00001$); 4.42 ± 1.65 cm³ ($p < 0.00001$), respectively. Coefficients K – 5497.33 OE; 1714.71 OE; 1424.83 OE; 367.33 OE. TGI coefficients – 63.60 % (PS + PDT); 74.07 % (PS + CRT); 93.30 % (PS + CRT + PDT). An increase in the average duration of dead rats indicator – 25.31 % (PS + PDT); 55.06 % (PS + CRT); 158.22 % (PS + CRT + PDT). On the 60th and 90th days of the experiment, the frequency of CR and the proportion of cured rats were the same and amounted to 0; 16.7; 14.3 and 42.9 %, respectively.

Conclusion. The results obtained indicate that the chlorine PS has, in addition to photosensitizing properties, also radiomodifying properties, and the developed method of combined therapy is characterized by high antitumor efficacy.

Key words: rats, transplanted tumors, photodynamic therapy, radiodynamic therapy, photosensitizer

For citation: Tzerkovsky D.A., Mazurenko A.N., Kozlovsky D.I. et al. Combined photodynamic and radiodynamic therapy with a chlorine photosensitizer under fractionated radiation exposure to transplanted tumors in an *in vivo* experiment. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy 2023;22(3):75–86. DOI: 10.17650/1726-9784-2023-22-3-75-86

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой высокоэффективный метод лечения пациентов с предопухолевыми заболеваниями и злокачественными новообразованиями [1]. В качестве одного из его основных компонентов выступают специальные вещества — фотосенсибилизаторы (ФС), способные к фото-

сенсибилизации биологических тканей, т.е. к увеличению их чувствительности к свету [2]. В классическом понимании для запуска каскада сложных фотохимических реакций в опухолевых клетках и тканях, приводящих к их летальному повреждению, используется излучение с определенной длиной волны, генерируемое различными лазерными аппаратами и приборами [3].

Тем не менее в последние годы учеными ряда крупных научных центров США, Японии и Италии предприняты успешные попытки применения в качестве активирующего ФС физического фактора ионизирующего излучения, а данное направление получило название «радиодинамическая терапия» (РДТ) [4]. Как свидетельствуют полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo* результаты, комбинированное использование ФС и ионизирующего излучения приводит к статистически значимому уменьшению числа жизнеспособных опухолевых клеток и более выраженному торможению роста различных перевивных опухолей по сравнению с лучевой терапией (ЛТ) в монорежиме [4–6]. В США (2020) и Германии (2022) начаты I/II фазы клинических испытаний, целью которых является изучение безопасности, переносимости и оптимальных терапевтических режимов метода РДТ с 5-аминолевулиновой кислотой (5-АЛК) у пациентов с III–IV стадиями злокачественных новообразований головы и шеи, грудной и брюшной полостей, малого таза, а также с рецидивными формами глиобластомы [7, 8].

Предшествующие исследования, выполненные на базе Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (аг. Лесной, Республика Беларусь) в 2022 г., были направлены на изучение радиомодифицирующих свойств белорусского ФС, представляющего собой тринатриевую соль хлорина е6, при его комбинированном применении с ионизирующим излучением в однократном режиме воздействия в разовых очаговых дозах (РОД) 2, 4 и 6 Гр. Пилотные данные, полученные на основании анализа непосредственных и отдаленных результатов экспериментального исследования на крысах с лимфосаркомой Плисса (ЛСП), свидетельствовали о тенденции к достижению более выраженного противоопухолевого эффекта комбинированного лечения, включающего применение ФС с последующим проведением сеансов ЛТ в РОД 4 и 6 Гр, по сравнению с ЛТ в монорежиме [9]. Открытым остается вопрос применения ФС и ЛТ во фракционированном режиме облучения.

Для повышения противоопухолевой эффективности ФДТ целесообразно комбинированное и сочетанное применение метода с традиционными подходами в лечении злокачественных новообразований, в частности с ЛТ [10]. Основная научная гипотеза данной комбинации — возможность использования субтерапевтических режимов лазерного и ионизирующего излучений, применение которых приводит к увеличению эффекта каждого из методов терапии за счет синергетического воздействия со значительным уменьшением риска возникновения серьезных нежелательных реакций, имеющих место при применении высоких доз указанных физических факторов.

Цель исследования — изучение возможности повышения противоопухолевой эффективности ФДТ с тринатриевой солью хлорина е6 за счет ее комбинированного применения с РДТ с использованием фракционированного режима облучения перевивных опухолей.

Материалы и методы

Лабораторные животные. Пилотное исследование выполнено на 26 белых нелинейных беспородных крысах-самцах, полученных из вивария Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, с массой тела 180 ± 50 г, в возрасте 2,5–3 мес. Длительность карантина перед включением в эксперимент составляла 14 сут. Крысы содержались в стандартных условиях пищевого и питьевого рациона *ad libitum*, при 12-часовом режиме освещения, при температуре 20–22 °С и влажности 50–60 % в индивидуальных клетках по 5–7 особей в каждой. Условия содержания крыс в лаборатории, а также показатели влажности, температуры, освещенности в помещении соответствовали действующим санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию вивариев (Санитарные правила и нормы 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», Постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31.10.2006 г. № 131) и межгосударственным стандартам (ГОСТ 33216–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» и ГОСТ 33215–2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур», утвержденным Постановлением Межгосударственного совета по стандартизации, метрологии и сертификации, протокол от 22.12.2014 г. № 73-П).

Опухолевый штамм. В качестве опухолевого штамма использовали ЛСП (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация). Данный опухолевый штамм был получен Г.Б. Плиссом в 1960 г. от крысы-самки, которая с рождения получала диету, содержащую 3,3-дихлорбензидин. Опухоль состоит из мелких и крупных лимфоидных клеток (лимфобластов) с высокой митотической активностью. Перевиваемость штамма составляет 75–100 %. Опухоль растет быстро. Продолжительность жизни крыс с перевивными опухолями варьирует от 12 до 95 сут.

Опухолевая модель. Опухолевую модель у крыс создавали путем подкожного пассивирования *in vivo*. Подкожная перевивка включала введение под кожу левой паховой области 0,5 мл взвеси опухолевых

клеток в 20 % растворе Хенкса. ЛСП относится к числу быстрорастущих опухолей с коротким латентным периодом, в связи с чем крыс с ЛСП включали в эксперимент на 6-е сутки после перевивки по достижению диаметра опухолевого узла в среднем 5 мм.

Этические аспекты. Экспериментальные исследования были проведены в соответствии с международным законодательством и действующими в Республике Беларусь нормативными правовыми актами по проведению экспериментальных исследований с лабораторными животными, а именно:

1. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (г. Страсбург, Франция, от 18.03.1986 г.), с изменениями в соответствии с положениями Протокола (СЕД № 170 от 02.12.2005 г.).
2. Директива 2010/63/EU Европейского парламента и Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (от 22.09.2010 г.).
3. ТПК 125–2008 «Надлежащая лабораторная практика» (GLP) (постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008 г.).

Характер выполняемых исследований соответствовал ряду принципов 3Rs, разработанных W.M. Russell и R.L. Berch (1959 г.), а именно:

- 1) Reduction – сокращение количества используемых лабораторных животных в эксперименте.
- 2) Refinement – усовершенствование методики проведения эксперимента за счет применения обезболивающих и нетравматических методов.

Крыс перед облучением вводили в наркоз (нейролептаналгезия: 0,005 % раствор фентанила + 0,25 % раствор дроперидола в соотношении 2:1 по 0,2 мл на 100 г массы тела внутримышечно). После окончания периода наблюдения за крысами их умерщвление выполнялось с помощью общепринятых методов эвтаназии (*aether pro narcosi*) с соблюдением гуманных методов обращения с лабораторными животными.

Выполнение исследования одобрено Комитетом по этике Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова (выписка из протокола от 25.02.2022 г. № 180).

Фото- и радиосенсибилизатор. В качестве лекарственного средства использовали инъекционную форму ФС, представляющего собой тринатриевую соль хлорина е6, («Белмедпрепараты», Республика Беларусь). Вспомогательное вещество – повидон с К-значением 17. ФС представлял собой порошок лиофилизированный для приготовления раствора для внутривенного введения в виде пористой массы зеленовато-черного цвета, 100 мг (регистрационный номер 16/11/886 от 08.11.2016 г.). Перед использованием порошок разводили 0,9 % раствором хлорида

натрия до концентрации 1 мг/мл и вводили путем внутривенной инфузии в хвостовую вену крысы в условиях затемненного помещения в дозе 2,5 мг/кг.

Радиодинамическая терапия. Облучение перевивных опухолей осуществлялось контактным методом (контактная лучевая терапия, КЛТ) на аппарате microSelectron-HDR V3 Digital (Elekta, Швеция) с использованием γ -излучения (^{192}Ir). Источник имел высокую активность (на момент начала экспериментов она составила 5,2 Ci), что обусловило высокую мощность дозы и короткую продолжительность сеансов облучения, необходимые для крыс, находящихся в состоянии медикаментозного сна. Для проведения КЛТ на область перевивной опухоли использовался аппликатор Leipzig, фиксировавшийся на поверхности опухоли с помощью мягких резиновых держалок. Облучение проводилось фракционированно: первое облучение – в РОД 2 Гр через 2–2,5 ч после окончания инфузии, второе и третье – в РОД 2 Гр через 24 ч и 48 ч после введения ФС соответственно. Суммарная очаговая доза (СОД) составила 6 Гр. Расчет времени сеанса облучения проводился на системе планирования Oncentra Brachy v4.5.2 (Elekta, Швеция) на пустой серии изображений с использованием алгоритма G-43 без учета отражения и рассеивания излучения внутри аппликатора. Использовалась методика КЛТ с нормализацией на точку, расположенную на расстоянии 5 мм от терапевтической поверхности аппликатора, в соответствии с размером мишени и рекомендациями GEC-ESTRO ACROP и др. Используемая методика облучения позволила подвести запланированные РОД на перевивные опухоли у крыс без переоблучения нормальных окружающих опухоль тканей.

Фотодинамическая терапия. Сеансы ФДТ осуществляли однократно непосредственно после окончания первого воздействия ионизирующим излучением с помощью полупроводникового лазера PDT diode laser (Imaf Axicon, Республика Беларусь) с длиной волны излучения 660 ± 5 нм. Фотооблучение перевивных опухолей начинали через 2,5–3 ч после окончания инфузии ФС в экспозиционной дозе 100 Дж/см² с плотностью мощности 0,2 Вт/см² и мощностью 0,353 Вт. Продолжительность воздействия составила 8 мин.

Дизайн экспериментального исследования. Все воздействия производились на 6-е сутки после перевивки ЛСП по достижению диаметра опухолевого узла не менее 3–6 мм. Все крысы – 26 особей, включенных в исследование, – случайным образом распределены на 4 группы по 6–7 особей в каждой:

1. ФС 2,5 мг/кг + КЛТ РОД 2 Гр, СОД 6 Гр.
2. ФС 2,5 мг/кг + ФДТ 100 Дж/см², 0,2 Вт/см².
3. ФС 2,5 мг/кг + КЛТ РОД 2 Гр, СОД 6 Гр + ФДТ 100 Дж/см², 0,2 Вт/см².

4. Интактный контроль (ИК) — крысы с перевивными опухолями, которым не вводился ФС и не осуществлялось облучение.

Критерии оценки противоопухолевой эффективности

Оценку противоопухолевой эффективности воздействий осуществляли по общепринятым в экспериментальной онкологии показателям, характеризующим динамику изменения среднего объема опухолей (V_{cp} , в $см^3$), а также изменение коэффициента абсолютного прироста опухоли (К) и коэффициента торможения роста опухолей (ТРО). Динамику роста перевивных опухолей регистрировали начиная с 6-х суток после перевивки опухолевого штамма ЛСП в течение 2 нед с интервалом 2–3 сут.

Объем опухолей вычисляли по формуле Шрека (1):

$$V = \frac{1}{6} \pi \times d_1 \times d_2 \times d_3,$$

где $d_{1,2,3}$ — три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли (в см); $\pi/6 = 0,52$ — постоянная величина; V — объем опухоли (в $см^3$).

Коэффициент абсолютного прироста опухоли (К) рассчитывали по формуле (2):

$$K = \frac{V_t - V_0}{V_0},$$

где V_0 — исходный объем опухоли (до начала воздействий); V_t — объем опухоли на определенный срок наблюдения.

При $K > 0$ (V на соответствующем сроке наблюдения превышал его исходное значение) ситуация расценивалась как продолженный рост опухоли; при $-1 < K < 0$ (V на соответствующем сроке наблюдения был меньше его исходного значения) — как торможение роста опухоли; при $K = -1$ — как полная регрессия опухоли.

ТРО рассчитывали по формуле (3):

$$TPO = \frac{V_{контроля} - V_{опыта}}{V_{контроля}} \times 100,$$

где $V_{контроля}$ — средний объем опухоли в контрольной группе (в $см^3$); $V_{опыта}$ — средний объем опухоли в основной группе (в $см^3$).

Минимально значимый критерий, демонстрирующий эффективность лечения перевивных опухолей, считался при $TPO > 50\%$.

Частота полных регрессий (ПР) и частота излеченности крыс оценивалась через 60 и 90 сут после окончания воздействий при отсутствии визуальных и пальпаторных признаков опухолевого роста.

Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на перевивных опухолях у крыс были следующими (табл. 1) [11].

Таблица 1. Критерии оценки ингибирующего рост опухолей эффекта
Table 1. Criteria for evaluating the tumor growth-inhibiting effect

Критерии противоопухолевой эффективности Criteria of antitumor efficacy	Значения эффективности Values efficiency
$TPO < 20\%$ $TGI < 20\%$	0
$TPO < 20-50\%$ $TGI < 20-50\%$	$\pm$
$TPO < 51-80\%$ $TGI < 51-80\%$	+
$TPO < 81-90\%$ $TGI < 81-90\%$	++
$TPO < 91-100\% + < 50\% \text{ ПР}$ $TGI < 91-100\% + CR < 50\%$	+++
$TPO > 91-100\% + > 50\% \text{ ПР}$ $TGI > 91-100\% + CR > 50\%$	++++

Примечание. ТРО — коэффициент торможения роста опухоли; ПР — полная регрессия.

Note. TGI — tumor growth inhibition; CR — complete regression.

Оценка противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни проводилась по окончании эксперимента и гибели всех крыс. Определялась средняя продолжительность жизни (СПЖ) в группах, и вычислялись показатели УПЖ по формуле (4):

$$УПЖ\% = \frac{СПЖ_{опыта} - V_{контроля}}{V_{контроля}} \times 100,$$

где УПЖ — показатель увеличения продолжительности жизни павших крыс (в %); $СПЖ_{опыта}$ — средняя продолжительность жизни павших крыс в опытных группах (в сут); $СПЖ_{контроля}$ — средняя продолжительность жизни павших крыс в контрольной группе (в сут).

Минимально значимый критерий, демонстрирующий эффективность лечения перевивных опухолей, считался при $УПЖ > 50\%$.

Статистическая обработка полученных данных. Статистическая обработка результатов (V_{cp} , коэффициенты К и ТРО) проводилась с помощью пакетов прикладных программ Excel (версия 2010), Origin Pro (Origin Lab., версия 7.0, США) и Statistica (StatSoft, Inc., версия 10.0, США). Данные представляли как $M \pm m$ (среднее значение $\pm$ ошибка среднего значения). Для

оценки достоверности различий использовали U критерий Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Общая выживаемость оценивалась с использованием непараметрического метода Каплана–Майера. Точкой 0 принята дата перевивки опухоли, событием — гибель крысы, окончанием наблюдения — гибель всех крыс в опытной группе. Сравнительный анализ данных проводился с помощью непараметрического

лог-ранк-теста. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Перевиваемость опухолевого штамма составила 100 %.

Побочных реакций и осложнений, связанных с внутривенным введением ФС, а также проведением сеансов ФДТ и КЛТ, зарегистрировано не было.

Таблица 2. Данные о динамике роста перевивных опухолей в эксперименте на крысах с лимфосаркомой Плисса

Table 2. Data on the growth dynamics of transplanted tumors in an experiment on rats with Pliss lymphosarcoma

Наименование группы Groups	Исследуемые критерии Research criteria					
	Время после перевивки, сут Days after tumors transplantation, days					
	Средний объем, см ³ ($M \pm m$) $V_{av}, \text{cm}^3 (M \pm m)$					
	Коэффициент абсолютного прироста опухолей (К), ОЕ Coefficient of absolute tumor growth (K), units					
	Коэффициент торможения роста опухолей (ТРО), % Coefficient of tumor growth inhibition (TGI), %					
	p vs интактный контроль p vs intact control					
	6	9	11	13	15	18
ИК IC	0,012 ± 0,001	1,33 ± 0,14	9,19 ± 0,56	18,07 ± 0,22	49,53 ± 2,72	65,98 ± 0,81
	—	109,83	764,83	1504,83	4126,50	5497,33
	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	—	—	—
ФС + КЛТ PS + CRT	0,012 ± 0,001	0,20 ± 0,05	1,18 ± 0,38	3,24 ± 0,91	8,89 ± 2,31	17,11 ± 4,13
	—	15,67	97,33	269,00	739,83	1424,83
	—	84,96	87,16	82,07	82,03	74,07
	>0,05	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
ФС + ФДТ PS + PDT	0,014 ± 0,001	0,65 ± 0,16	1,69 ± 0,38	4,58 ± 0,89	12,12 ± 2,11	24,02 ± 4,01
	—	45,43	119,71	326,14	864,71	1714,71
	—	51,13	81,61	74,65	75,53	63,60
	>0,05	0,008	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
ФС + КЛТ + ФДТ PS + CRT + PDT	0,012 ± 0,001	0,11 ± 0,02	0,36 ± 0,11	1,37 ± 0,51	2,96 ± 1,09	4,42 ± 1,65
	—	8,17	29,00	113,17	245,67	367,33
	—	91,73	96,08	92,42	94,02	93,30
	>0,05	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

Примечание. ИК — интактный контроль; ФС — фотосенсибилизатор; КЛТ — контактная лучевая терапия; ФДТ — фотодинамическая терапия

Note. IC — intact control; PS — photosensitizer; CRT — contact radiotherapy; PDT — photodynamic therapy

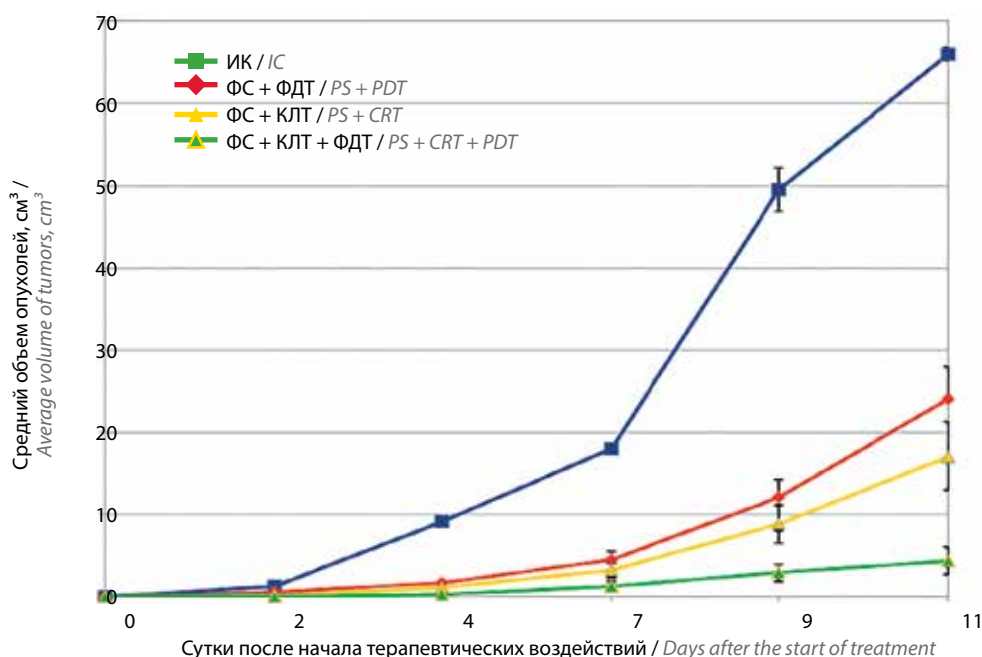


Рис. 1. Изменение среднего объема перевивных опухолей в группах исследования: ИК – интактный контроль; ФС – фотосенсибилизатор; КЛТ – контактная лучевая терапия; ФДТ – фотодинамическая терапия

Fig. 1. Change in the average volume of transplanted tumors in study groups: IC – intact control, PS – photosensitizer, CRT – contact radiotherapy, PDT – photodynamic therapy

В эксперименте оценивали противоопухолевую эффективность метода комбинированной терапии перевивных опухолей, включающего системное (внутривенное) введение ФС, представляющего собой тринатриевую соль хлорина е6, с последующим однократным воздействием лазерным излучением в экспозиционной дозе 100 Дж/см² с плотностью мощности 0,2 Вт/см² и фракционированным воздействием ионизирующим излучением в РОД 2 Гр тремя фракциями до достижения СОД 6 Гр в сравнении с каждым из компонентов метода (ФС + КЛТ, ФС + ФДТ) и ИК.

Как видно из табл. 2 и рис. 1, в течение всего срока оценки показателей, характеризующих изменение динамики роста перевивных опухолей (с 6-х по 18-е сутки после терапевтических воздействий), отмечено его статистически значимое торможение как в группе комбинированной терапии, так и в группах-компонентах предложенного метода по сравнению с группой ИК ($p < 0,05$).

На 18-е сутки эксперимента $V_{\text{ср}}$ в группе комбинированной терапии был статистически значимо меньше: в 14,93 раза по сравнению с ИК ($p = 0,00000$), в 5,43 раза по сравнению с группой ФС + ФДТ ($p = 0,0005$) и в 3,87 раза по сравнению с группой ФС + КЛТ ($p = 0,013$).

Противоопухолевая эффективность воздействий по полуколичественной шкале оценки (табл. 1) представлена в табл. 3.

В табл. 4 и на рис. 2 представлены данные о показателях выживаемости павших крыс в данной серии

экспериментов. Полученные результаты свидетельствуют о высокой противоопухолевой эффективности разработанного метода комбинированной терапии: достигнуто статистически значимое увеличение СПЖ по сравнению с ИК и каждым из компонентов метода ($p = 0,0002$ – с ФС + ФДТ и $p = 0,002$ – с ФС + КЛТ).

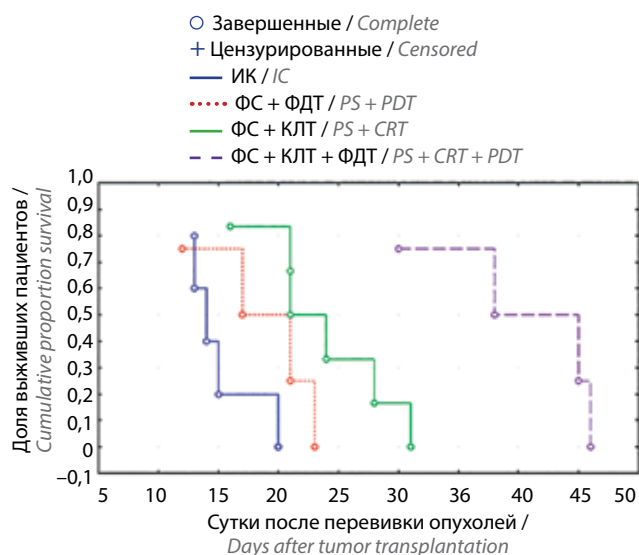


Рис. 2. Показатели выживаемости крыс в эксперименте: ИК – интактный контроль; ФС – фотосенсибилизатор; КЛТ – контактная лучевая терапия; ФДТ – фотодинамическая терапия

Fig. 2. Survival rates of rats in the experiment: IC – intact control, PS – photosensitizer, CRT – contact radiotherapy, PDT – photodynamic therapy

Таблица 3. Оценка противоопухолевой эффективности по критериям ингибирующих рост перевивных опухолей эффектов

Table 3. Evaluation of antitumor efficacy according to the criteria growth-inhibiting effects of transplanted tumors

Наименование группы Groups	Исследуемые критерии Research criteria		
	Коэффициент торможения роста опухоли, % Tumor growth inhibition coefficient, %	Частота полных регрессий, % Frequency of complete regressions, %	Эффективность Efficacy
ИК IC	—	0,0	0
ФС + ФДТ PS + PDT	63,60	16,7	+++
ФС + КЛТ PS + CRT	74,07	14,3	+++
ФС + КЛТ + ФДТ PS + CRT + PDT	93,30	42,9	+++

Примечание. ИК — интактный контроль; ФС — фотосенсибилизатор; ФДТ — фотодинамическая терапия; КЛТ — контактная лучевая терапия

Note. IC — intact control; PS — photosensitizer; PDT — photodynamic therapy; CRT — contact radiotherapy

Таблица 4. Показатели выживаемости в эксперименте

Table 4. Survival rates in the experiment

Наименование группы Groups	Информация Information		
	Средняя продолжительность жизни, сутки Average life expectancy, days	Увеличение средней продолжительности жизни, % Increase in average life expectancy, %	p vs интактный контроль p vs intact control
ИК IC	15,80 ± 1,32	—	—
ФС + ФДТ PS + PDT	19,80 ± 1,96	25,31	0,11
ФС + КЛТ PS + CRT	24,50 ± 2,21	55,06	0,005
ФС + КЛТ + ФДТ PS + CRT + PDT	40,80 ± 3,71	158,22	0,00004

Примечание. ИК — интактный контроль; ФС — фотосенсибилизатор; КЛТ — контактная лучевая терапия; ФДТ — фотодинамическая терапия

Note. IC — intact control; PS — photosensitizer; CRT — contact radiotherapy; PDT — photodynamic therapy

Таким образом, разработанный метод комбинированной терапии, который включает внутривенное введение ФС, а именно тринатриевой соли хлоридна еб, в дозе 2,5 мг/кг массы тела с последующими через 2,5–3,0, 24 и 48 ч после окончания инфузии ФС сеансами КЛТ при фракционированном облучении в РОД 2 Гр до достижения СОД 6 Гр и ФДТ в экспозиционной дозе 100 Дж/см² и плотности мощности лазерного излучения 0,2 Вт/см², продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность. На 18-е сутки после сеанса лечения животных коэффициент К составил 367,33 ОЕ; величина ТРО по сравнению с ИК — 93,30 %. На 60-е и 90-е сутки частота

ПР и излечения составила 42,9 % и 42,9 % соответственно. Показатели СПЖ и УПЖ — 40,80 ± 3,71 сут и 158,22 % соответственно. Эффективность воздействия по полуколичественной шкале оценки составила «+++».

Обсуждение

Фотосенсибилизаторы — вещества природного и синтетического происхождения, используемые для ФДТ в экспериментальной и клинической онкологии. В последние годы актуализировался интерес исследователей к использованию с целью их активации таких физических факторов как ультразвук,

магнитные поля и гипертермия [12]. Рядом авторских коллективов предложено применять в качестве радиомодификаторов ионизирующего излучения различные ФС. Данное направление научных исследований получило название «радиодинамическая терапия» (РДТ) — метод лечения, основанный на комбинированном применении ФС и ионизирующего излучения, как правило, при дистанционной ЛТ [5]. В источниках литературы, опубликованных в период с начала 2000-х гг. до 2019 г., встречаются немногочисленные публикации, посвященные изучению радиодинамической активности ФС «Протопорфирин IX» (ПпIX), «Дериват гематопорфирина» и «Порфиример натрия» в экспериментах *in vitro/in vivo* (глиомы с6 и U-373 MG, глиосаркома 9L; плоскоклеточная карцинома пищевода человека OE-21, аденокарцинома пищевода человека OE-33; карцинома мочевого пузыря человека RT4 и аденокарцинома толстого кишечника HT-29) [13–16].

В дальнейшем J.V. Panetta и соавт. из Fox Chase Cancer Center (США) (2020) опубликовали результаты применения РДТ с ФС ПпIX у мышей с ортотопической моделью карциномы предстательной железы человека PC-3. Вызывающая образование эндогенного ФС 5-АЛК вводилась перорально в дозе 100 мг/кг за 4 ч до начала облучения подкожно перевитых опухолей, которое осуществлялось в РОД 4 Гр однократно. Авторы сообщили, что через 1 и 2 нед от момента начала эксперимента в группе РДТ (5-АЛК + ЛТ) средний объем опухолей был на 24 ± 9 % и 21 ± 8 % меньше по сравнению с группой ЛТ в монорежиме соответственно ($p < 0,05$) [4].

В другом исследовании J. Takahashi и соавт. (Health and Medical Research Institute, Япония) (2021) представили экспериментальные данные о применении РДТ с ФС ПпIX против глиобластом человека U251MG и U87MG у мышей BALB/c-nu/nu. 5-АЛК вводилась перорально в дозах 60 и 120 мг/кг за 4 ч до начала облучения подкожно перевитых опухолей, которое проводилось в РОД 2 Гр 5 раз в неделю в течение 6 нед до достижения СОД 60 Гр. Авторы пришли к выводу, что предложенная методика облучения по схеме РДТ (5-АЛК 120 мг/кг + ЛТ СОД 60 Гр) оказывает выраженное тормозящее действие на рост обеих моделей перевитых опухолей в течение всего срока наблюдения (42 и 70 сут соответственно), вызывая в опухолевой ткани развитие морфологически подтвержденных необратимых повреждений [17].

D.M. Yang и соавт. (2022) (Fox Chase Cancer Center, США) доказали наличие радиосенсибилизирующих свойств у 5-АЛК в эксперименте на линейных мышках C57BL/6 с перевитой подкожно опухолью мелкоклеточным раком легкого KP1. Перорально вводилась 5-АЛК в дозе 100 мг/кг за 4 ч до начала облучения подкожно перевитых опухолей, которое

осуществлялось однократно в РОД 4 Гр. Авторы пришли к выводу, что через 2 нед после начала эксперимента в группе РДТ (5-АЛК + ЛТ) зарегистрировано торможение роста перевитых опухолей на 52,1; 48,1 и 57,9 % по сравнению с группами 5-АЛК ($p < 0,001$), ЛТ в монорежиме ($p < 0,001$) и интактным контролем ($p < 0,001$) соответственно [18].

Y. Matsuyama и соавт. (Mie University Graduate School of Medicine, Япония) (2022) в экспериментах *in vivo* изучили возможность применения акридина оранжевого (АО) в качестве радиомодификатора. В качестве объектов исследований авторы использовали линейных мышей C3H/HeSlc и BALB/cSlc-nu/nu с перевитыми опухолями: остеосаркомой мышью LM8, раком предстательной железы человека PC-3 и раком молочной железы человека MDA-MB-231. АО вводился подкожно по периметру опухолей в дозе 1 мг/мл. Облучение производилось однократно в РОД 5 Гр. Авторы сообщили, что РДТ (АО + ЛТ) продемонстрировала выраженный цитостатический эффект в отношении всех видов опухолей. Так, к концу 2-й недели эксперимента средний объем опухолей LM8 в контрольной группе составил 890 мм³, АО — 780 мм³, ЛТ РОД 5 Гр — 120 мм³ и АО + ЛТ РОД 5 Гр — 42 мм³ ($p < 0,05$); для MDA-MB-231 — 1060, 620, 1010 и 29 мм³ ($p < 0,05$) и для PC-3 — 530, 200, 45 и 14 мм³ ($p < 0,05$) соответственно [5].

И, наконец, С. Dupin и соавт. (Bordeaux Institute of oncology, Франция) (2022) представили опыт применения метода РДТ в эксперименте на иммунодефицитных мышках RAG $\gamma^{\text{C}^{-/-}}$ с ортотопической моделью глиобластомы человека P3. В качестве фотосенсибилизирующего агента использовали 5-АЛК, которую вводили интраперитонеально в дозе 100 мг/кг. Облучение перевитых опухолей осуществляли 3 раза в неделю в следующих режимах: 3×2 Гр, 5×2 Гр и 5×3 Гр; 2,55 Гр/мин. На основании анализа полученных результатов по критерию выживаемости оптимальным воздействием было фракционированное облучение в режиме 5×3 Гр 3 раза в неделю (73–83 сут) vs контроль (без воздействий) (15–24 сут), ЛТ 3×2 Гр (41–47 сут) и ЛТ 5×3 Гр (48–62 сут) ($p < 0,05$). В сравнительном аспекте отмечена тенденция к оптимизации показателей выживаемости в группе 5-АЛК + ЛТ 5×2 Гр (53–67 сут) к группе ЛТ 5×2 Гр ($p = 0,24$; HR = 1,57) [19].

Авторы сообщают о статистически значимом сокращении числа жизнеспособных опухолевых клеток и торможении роста перевитых опухолей в группах комбинированной терапии по сравнению с ЛТ в монорежиме. Проанализированные данные свидетельствуют о значительных перспективах данного направления в экспериментальной онкологии.

Полученные в экспериментах результаты позволяют сделать вывод о наличии у ряда ФС

радиомодифицирующих свойств, что создает предпосылки для оптимизации и дальнейшего совершенствования комплексной терапии пациентов со злокачественными новообразованиями различных локализаций. Учеными из Германии и Израиля начата апробация метода в клинике в рамках пилотных проектов [20, 21]. Полученные данные показывают хорошую переносимость РДТ (ФС + ЛТ) и отсутствие серьезных нежелательных реакций у пациентов с глиомами, раком мочевого пузыря, шейки матки, меланомой, остеогенной саркомой, лимфосаркомой и др., а также удовлетворительную противоопухолевую эффективность, которая подтверждена увеличением частоты объективных ответов и редукции объема опухолей, что позволило перевести их в резектабельное состояние.

Тем не менее из-за немногочисленности пролеченных пациентов, отсутствия результатов рандомизированных исследований и необходимости их проведения с целью оптимизации режимов воздействия ионизирующим излучением и определения эффективности комбинированной терапии по сравнению с монотерапией ЛТ пока нельзя сделать окончательные выводы о перспективах данного направления в клинической онкологии. В связи с этим инициированы несколько клинических испытаний на больших выборках пациентов с целью оценки безопасности и переносимости РДТ. Так, клиническое испытание A Phase I Dose Finding Study Of Low-dose Radiation With Sensitization Using 5-aminolevulinic Acid In Advanced Malignancies, в основе которого лежит определение оптимальных доз ЛТ и ФС у пациентов с различными нозологическими формами злокачественных новообразований (солидные опухоли головы и шеи, грудной и брюшной полостей, малого таза), начато Fox Chase Cancer Center (США) в июле 2020 г. В исследование планируется включение 130 пациентов. В качестве ФС используется 5-АЛК в 3 дозах. Облучение осуществляется фракционированно, а курс терапии проводится однократно и составляет 21 день. В дальнейшем пациенты находятся под динамическим наблюдением в течение 56 сут с целью оценки частоты и степени выраженности нежелательных реакций, а также предварительных данных о противоопухолевой эффективности метода [7].

Клиническое испытание Phase I/II Dose Escalation Trial of Radiodynamic Therapy (RDT) With 5-Aminolevulinic Acid in Patients With First Recurrence of Glioblastoma под руководством проф. W. Stummer

(University Hospital Münster, Germany) начато в октябре 2022 г. В исследование планируется включить 34 пациента с рецидивной формой глиобластомы (первый рецидив после комбинированного или комплексного лечения). В качестве ФС используется 5-АЛК (Gliolan®). Облучение будет проводиться фракционированно, а целью исследования будет определение максимально переносимых доз ФС и ЛТ, а также оптимального числа сеансов РДТ. В качестве критериев противоопухолевой эффективности будут изучены показатели выживаемости пациентов (общая 6-месячная выживаемость, 6-месячная выживаемость без прогрессирования и др.) [8].

Как свидетельствуют представленные выше данные, ФС наряду с традиционными фотосенсибилизирующими свойствами обладают и свойствами радиомодификаторов. Для повышения противоопухолевой эффективности ФДТ целесообразно комбинированное и сочетанное применение метода с традиционными подходами в лечении злокачественных новообразований, в частности с ЛТ [10]. Основой данной комбинации является возможность использования субтерапевтических режимов лазерного и ионизирующего излучений, применение которых приводит к увеличению эффекта каждого из методов терапии за счет синергетического воздействия со значительным уменьшением риска возникновения серьезных нежелательных реакций, имеющих место при применении высоких доз указанных физических факторов.

Заключение

Пилотные данные, полученные на основании анализа непосредственных и отдаленных результатов экспериментального исследования на перевивных опухолях у крыс, свидетельствуют о высокой противоопухолевой эффективности комбинированного лечения, включающего применение ФС, представляющего собой тринатриевую соль хлорина е6, с последующим проведением сеансов РДТ во фракционированном режиме облучения и ФДТ при однократном режиме облучения по сравнению с РДТ и ФДТ в монорежимах. Публикации, посвященные изучению эффективности комбинированного применения данного ФС хлоринового ряда и указанных методов терапии, демонстрирующих положительные результаты, в доступных источниках литературы носят единичный характер, что позволяет сделать вывод о необходимости и перспективности развития более глубоких исследований в данном направлении [22].

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

- Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic therapy for the treatment and diagnosis of cancer – a review of the current clinical status. *Front Chem* 2021;9:e686303. DOI: 10.3389/fchem.2021.686303
- Correia J.H., Rodrigues J.A., Pimenta S. et al. Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. *Pharmaceutics* 2021;13:e1332. DOI: 10.3390/pharmaceutics13091332
- Rodrigues J.A., Correia J.H. Enhanced photodynamic therapy: a review of combined energy sources. *Cells* 2022;11(24):3995. DOI: 10.3390/cells11243995
- Panetta J.V., Cvetkovic D., Chen X. et al. Radiodynamic therapy using 15-MV radiation combined with 5-aminolevulinic acid and carbamide peroxide for prostate cancer *in vivo*. *Phys Med Biol* 2020;65(16):1–14. DOI: 10.1088/1361-6560/ab9776
- Matsuyama Y., Nakamura T., Yoshida K. et al. Radiodynamic therapy with acridine orange local administration as a new treatment option for primary and secondary bone tumours. *Bone Joint Res* 2022;11(10):715–22. DOI: 10.1302/2046-3758.1110.BJR-2022-0105.R2
- Di Pompo G., Kusuzaki K., Ponzetti M. et al. Radiodynamic therapy with acridine orange is an effective treatment for bone metastases. *Biomedicines* 2022;10:1904. DOI: 10.3390/biomedicines10081904
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04381806
- ClinicalTrials.gov Identifier: NCT05590689
- Tzerkovsky D.A., Mazurenko A.N., Kozlovskii D.I., Borichevsky F.F. Radiodynamic therapy with chlorine-based photosensitizer on Pliss lymphosarcoma solid tumor: *in vivo* experiment. *J Anal Oncol* 2022;11:33–8. DOI: 10.30683/1927-7229.2022.11.05
- He L., Yu X., Li W. Recent progress and trends in X-ray-induced photodynamic therapy with low radiation doses. *ACS Nano* 2022;16(12):19691–721. DOI: 10.1021/acsnano.2c07286
- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. чл.-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. С. 647–649. Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Under the general editorship of the corresponding Member of the Russian Academy of Medical Sciences prof. R.U. Khabriev. Moscow: OAO “Izdatelstvo Meditsina”, 2005. Pp. 647–649.
- Yang M., Yang T., Mao C. Enhancement of photodynamic cancer therapy by physical and chemical factors. *Angew Chem Int Ed Engl* 2019;58(40):14066–80. DOI: 10.1002/anie.201814098
- Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M. et al. Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms. *Curr Pharm Des* 2003;9(25):2024–35. DOI: 10.2174/1381612033454153
- Rutkovskiene L., Plesniene L., Sendiulienė D. et al. Sensitization of rat C6 glioma cells to ionizing radiation by porphyrins. *Acta Medica Lituanica* 2011;18(2):56–62. DOI: 10.6001/actamedica.v18i2.1816
- Yamamoto J., Ogura S.I., Shimajiri S. et al. 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX with multi-dose ionizing irradiation enhances host antitumor response and strongly inhibits tumor growth in experimental glioma *in vivo*. *Mol Med Rep* 2015;11(3):1813–9. DOI: 10.3892/mmr.2014.2991
- Yamada K., Murayama Y., Kamada Y. et al. Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid in colorectal cancer *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Lett* 2019;17:5132–8. DOI: 10.3892/ol.2019.10198
- Takahashi J., Nagasawa S., Doi M., Takahashi M. et al. *In vivo* study of the efficacy and safety of 5-aminolevulinic radiodynamic therapy for glioblastoma fractionated radiotherapy. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–15. DOI: 10.3390/ijms22189762
- Yang D.M., Cvetkovic D., Chen L., Charlie Ma C.M. Therapeutic effects of *in vivo* radiodynamic therapy (RDT) for lung cancer treatment: a combination of 15MV photons and 5-aminolevulinic acid (5-ALA). *Biomed Phys Eng Express* 2022;8(6):1–15. DOI: 10.1088/2057-1976/ac9b5c
- Dupin C., Sutter J., Amintas S. et al. An orthotopic model of glioblastoma is resistant to radiodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. *Cancers (Basel)* 2022;14(17):4244. DOI: 10.3390/cancers14174244
- Schaffer M., Ertl-Wagner B., Schaffer P.M. et al. Feasibility of photofrin II as a radiosensitizing agent in solid tumors – preliminary results. *Onkologie* 2006;29:514–9. DOI: 10.1159/000095979
- Schaffer P., Batash R., Ertl-Wagner B. et al. Treatment of cervix carcinoma FIGO IIb with Photofrin II as a radiosensitizer: a case report. *Photochem Photobiol Sci* 2019;18:1275–9. DOI: 10.1039/c8pp00576a
- Jiang F., Lee C., Zhang W. et al. Radiodynamic therapy with CsI(na)@MgO nanoparticles and 5-aminolevulinic acid. *J Nanobiotechnology* 2022;20(1):330. DOI: 10.1186/s12951-022-01537-z

Вклад авторов

Д.А. Церковский: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание и редактирование текста рукописи;

Д.И. Козловский: получение данных для анализа, анализ полученных данных;

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

Н.Д. Адаменко: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;

Ф.Ф. Боричевский: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных.

Author's contributions:

D.A. Tzerkovsky: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing and editing;

D.I. Kozlovsky: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data;

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

N.D. Adamenko: obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

F.F. Borichevsky: review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data.

ORCID авторов /ORCID of authors

Д.А. Церковский / D.A. Tzerkovsky: <https://orcid.org/0000-0001-7444-7997>

Д.И. Козловский / D.I. Kozlovsky: <https://orcid.org/0000-0001-8165-7597>

А.Н. Мазуренко / A.N. Mazurenko: <https://orcid.org/0000-0001-9541-3374>

Н.Д. Адаменко / N.D. Adamenko: <https://orcid.org/0000-0002-0851-7317>

Ф.Ф. Боричевский / F.F. Borichevsky: <https://orcid.org/0000-0003-1028-4601>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Национальной академии наук Беларуси (грант № 2021-61-284, 2021–2022 гг.).

Financing. This work was supported financially by the National Academy of Sciences of Belarus (grant № 2021-61-284, 2021–2022).

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. Выполнение исследования одобрено Комитетом по этике РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова (выписка из протокола от 25.02.2022 г. № 180).

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. The study was approved by the Ethics Committee of the N.N. Alexandrov National Cancer Center of Belarus (protocol dated 25.02.2022 № 180).

Статья поступила: 07.07.2023. Принята в печать: 18.08.2023

Article received: 07.07.2023. Accepted for publication: 18.08.2023

При направлении статьи в редакцию журнала «Российский биотерапевтический журнал» авторам необходимо руководствоваться следующими правилами, составленными с учетом «Единых требований к рукописям, предоставляемым в биомедицинские журналы» (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals), разработанных Международным комитетом редакторов медицинских журналов (International Committee of Medical Journal Editors).

Редакция просит авторов в подготовке рукописей руководствоваться изложенными ниже правилами. Рукописи, оформленные без соблюдения данных правил, редакцией рассматриваться не будут.

1. Общие правила

Статья в обязательном порядке должна сопровождаться официальным направлением учреждения, в котором выполнена данная работа, с подписью руководителя, заверенной печатью учреждения. При первичном направлении рукописи в редакцию в копии электронного письма должны быть указаны все авторы данной статьи. Обратную связь с редакцией будет поддерживать ответственный автор, обозначенный в статье (см. пункт 2).

Представление в редакцию ранее опубликованных статей не допускается.

Присланные статьи проходят проверку в системе «Антиплагиат» и принимаются в случае удовлетворительного результата (определяемого для каждой из статей в индивидуальном порядке по соотношению оригинальных фрагментов текста, заимствованных фрагментов и наличия оформленных ссылок).

2. Оформление данных о статье и авторах

Первая страница должна содержать:

- 1) название статьи прописными буквами (шрифт **жирный**);
- 2) инициалы и фамилии всех авторов (шрифт **обычный**);
- 3) место работы каждого из авторов, адрес учреждения с указанием индекса (шрифт *курсив*);
- 4) ORCID авторов;
- 5) адрес электронной почты ответственного за связь автора (шрифт *курсив*).

Данные, указанные в пунктах 1–3, должны быть предоставлены на русском и английском языках.

Пример:

ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ В «РОССИЙСКОМ БИОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМ ЖУРНАЛЕ»

И.И. Иванов¹, П.П. Петров²

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБНУ «НИИ по изысканию новых антибиотиков имени Г.Ф. Гаузе», Россия, 119021 Москва, ул. Болшaya Пироговская, 11

Контакты: Иван Иванович Иванов chem_analysis@ronc.ru

THE PUBLICATION OF THE ARTICLE IN «ROSSIYSKY BIOTHERAPEVTICHESKY JURNAL»

I.I. Ivanov¹, P.P. Petrov²

¹N.N. Blokhin NMRCO; 24 Kashyrskoe Sh., Moscow, 115522, Russia;

²FSBSI "G.F. Gauze Research Institute of search for new antibiotics"; 11 Bolshaya Pirogovskaya St, Moscow, 119435, Russia

Последняя страница должна содержать:

- 1) Сведения об авторе, ответственном за связь с редакцией:
 - фамилия, имя, отчество полностью;
 - занимаемая должность;
 - ученая степень, ученое звание;
 - контактный телефон;
 - рабочий адрес с указанием индекса;
 - адрес электронной почты.
- 2) Скан подписей всех авторов статьи.

3. Оформление текста

Статьи принимаются в формате doc, docx, rtf.

Шрифт – Times New Roman, размер 12, межстрочный интервал 1,5. Все страницы должны быть пронумерованы.

Текст статьи начинается со второй страницы.

4. Объем статей (включая список литературы, таблицы и подписи к рисункам)

Обзор литературы – не более 15 страниц,

оригинальная статья – не более 12 страниц,

краткие сообщения – не более 4 страниц.

Большой объем статьи допускается в индивидуальном порядке, по решению редакции.

5. Резюме и ключевые слова

Ко всем видам статей на второй странице должно быть приложено резюме на русском и английском языках. Слова «резюме» и «abstract» не указываются. Резюме должно кратко повторять структуру статьи, независимо от ее тематики. Для оригинальных статей резюме обязательно должно содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы).
- цель;
- результаты;

Объем резюме – 200–250 слов. Резюме не должно содержать ссылки на литературные источники и иллюстративный материал.

На этой же странице помещаются **ключевые слова** на русском и английском языке в количестве 3–10.

6. Структура статей

Оригинальная статья и краткое сообщение экспериментального или клинического характера должны содержать следующие разделы:

- введение;
- материалы и методы;
- заключение (выводы);
- при наличии финансирования исследования указать его источник (грант и т.д.).
- благодарность (раздел не является обязательным).
- цель;
- результаты и обсуждение;
- конфликт интересов;

Обзоры литературы, статьи теоретического и концептуального характера должны включать следующие разделы:

- введение;
- разделы по отдельным обсуждаемым вопросам;
- заключение (выводы).

Введение. Краткий обзор состояния вопроса со ссылками на наиболее значимые публикации, при этом необходимо проведения исследования.

Цель. 1–3 предложения о том, какую проблему или гипотезу решает автор и с какой целью.

Материалы и методы. Подробное изложение методик исследования, аппаратуры, критериев отбора участников, их число и характеристики, способы и принципы распределения на группы, дизайн исследования, методы статистического анализа. Описанные методы исследования должны гарантировать возможность воспроизведения результатов. При перечислении использованной аппаратуры и препаратов в скобках указываются производитель и страна; при перечислении используемых в ходе работы лекарственных препаратов и химических веществ – их международное непатентованное (общепринятое) название, дозы, пути введения.

В конце статьи о проведенном исследовании указать, решение какого этического комитета оно одобрено, номер и дату протокола исследования, а также факт подписания испытуемыми информированного согласия.

Результаты. Должны быть представлены в логической последовательности, отражать данные описанного выше исследования с указаниями на графики, таблицы и рисунки. Допускается сопоставление полученных результатов с данными других исследователей. Возможно включение обоснованных рекомендаций для клинической практики и применения полученных данных в предстоящих исследованиях. Следует избегать повторения сведений из раздела «Введение». Результаты представляются четко, в виде коротких описаний.

Заключение. Должно быть кратким и лаконичным. Подведение итога проделанной работы и гипотеза авторов о значении полученных данных – в рамках патогенеза, лечения, диагностики; перспективы использования полученных данных.

7. Иллюстративный материал

Иллюстративным материалом являются фотографии, рисунки, схемы, графики, диаграммы, таблицы. В тексте должны быть указаны ссылки на таблицы и рисунки, например: (табл. 1), (рис. 1) или на рис. 1 представлены. . ., которые должны быть размещены в соответствующих по смыслу абзацах и последовательно пронумерованы. Рисунки и таблицы нумеруются отдельно.

Иллюстративный материал должен быть представлен в виде отдельных файлов и не фигурировать в тексте статьи. Схемы, графики, диаграммы, таблицы могут быть собраны в общие файлы по типу иллюстративного материала с началом каждого с новой страницы. Например: все таблицы собраны в отдельный от статьи файл, где каждая новая таблица начинается с новой страницы. Если в этой же статье есть диаграммы, то они будут составлять следующий файл, где будут собраны исключительно диаграммы, и каждая из них будет размещена на отдельном листе документа. Файлы иллюстративного материала должны позволять воспроизвести высокое качество изображения в электронной и печатной версии журнала. Если иллюстративный материал ранее был опубликован в других изданиях, автор обязан предоставить в редакцию разрешение правообладателя на публикацию данного изображения в другом журнале, в противном случае это будет считаться плагиатом и к публикации принято не будет. Количество иллюстраций должно соответствовать объему предоставляемой информации, избыточность иллюстраций может привести к возвращению автором статьи для доработки на предмет сокращения. Данные таблиц не должны повторять данные рисунков и текста и наоборот.

Фотографии представляются в формате TIFF, JPG с разрешением не менее 300 dpi (точек на дюйм). Глаза пациентов или здоровых испытуемых на фотографиях должны быть закрыты черным прямоугольником, в случае его отсутствия автор должен предоставить в редакцию письменное разрешение пациента на публикацию.

Рисунки, графики, схемы, диаграммы представляются в формате EPS Adobe Illustrator 7.0–10.0 или Office Excel. При невозможности представления в данном формате необходимо связаться с редакцией.

Все **рисунки** должны быть пронумерованы и снабжены подписочными подписями. Фрагменты рисунка обозначаются строчными буквами русского алфавита – «а», «б» и т.д. Все сокращения, обозначения в виде кривых, букв, цифр и т.д., использованные на рисунке, должны быть расшифрованы в подписочной подписи. Подписи к рисункам даются на отдельном листе после текста статьи в одном с ней файле.

Названия рисунков должны быть переведены на английский язык.

Таблицы должны быть наглядными, иметь название и порядковый номер. Заголовки граф должны соответствовать их содержанию. Все сокращения расшифровываются в примечании к таблице. Необходимо указывать применявшийся для анализа статистический метод и соответствующее значение достоверности (p). В случае размера таблиц больше, чем на лист A4, они представляются в виде отдельного файла doc, docx, rtf.

Названия таблиц должны быть переведены на английский язык.

Все **формулы** должны быть тщательно выверены автором, набраны или встроены в формат текстового редактора. В формулах необходимо различать строчные и прописные, латинские и греческие, подстрочные и надстрочные буквы. Использованные автором сокращения должны быть разъяснены под формулой.

8. Единицы измерения и сокращения

Единицы измерения даются в Международной системе единиц (СИ). Если исследование проводилось на приборах, дающих показатели в других единицах, необходимо перевести их в систему СИ с указанием коэффициента пересчета или компьютерной программы в разделе «Материалы и методы».

Сокращения слов не допускаются, кроме общепринятых. Все аббревиатуры в тексте статьи должны быть полностью расшифрованы при первом упоминании (например, рак предстательной железы (РПЖ)). Список использованных сокращений приводится после списка литературы. Не следует параллельно использовать термин и его сокращение.

Название генов пишется курсивом, название белков – обычным шрифтом.

9. Список литературы

Не менее 50 процентов источников из списка литературы должны быть опубликованы за последние 5 лет, в том числе в журналах, индексируемых в базах данных *Web of Science, Scopus, Science Index*.

Все источники должны быть пронумерованы, нумерация осуществляется строго по мере цитирования в тексте статьи, но не в алфавитном порядке. Все ссылки на источники литературы в тексте статьи печатаются арабскими цифрами в квадратных скобках (например: [5], [7, 8], [7–9]). Количество цитируемых работ: в оригинальных статьях желательно не более 25 источников, в обзорах литературы – не более 60.

Ссылки должны даваться на первоисточники и не цитировать один обзор, где они упомянуты. Ссылки на неопубликованные работы, учебники, учебные пособия, нормативные и архивные материалы, статистические сборники, ГОСТы, распоряжения, анонимные источники, публикации в СМИ, монографии, авторефераты и т.д. не допускаются.

В цитируемой литературе нужно указывать источники с DOI (Digital Object Identifier, подробнее на сайте www.crossref.org) при наличии и PMID (PubMed identifier, подробнее на сайте <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ссылки на источники литературы должны быть оформлены следующим образом: для каждого источника необходимо указать: фамилии и инициалы авторов (если авторов более 4, указываются первые 3 автора, затем ставится «и др.» в русском или «et al.» в английском тексте). Авторы цитируемых источников должны быть указаны в том же порядке, что и в первоисточнике.

Для каждого русскоязычного источника должен приводиться перевод на английский язык (можно проверить на сайте elibrary.ru). При отсутствии перевода основных сведений в первоисточнике необходима транслитерация ссылки на английский язык (рекомендуем обращаться на сайт translit.net (стандарт транслитерации – BSI)).

Статья в журнале

Фамилия И.О. авторов. Название статьи. Название журнала год; том (номер выпуска): страницы (повторяющиеся цифры страниц не указывать, например: 185–7).

Примеры:

Srigley J.R., Delahunt B., Eble J.N. et al. The International society of urological pathology (ISUP) Vancouver classification of renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2013;37 (10):1469–89. DOI: 10.1097/PAS.0b013e318299fd1.

Михайленко Д.С., Алексеев Б.Я., Ефремов Г.Д., Каприн А.Д. Генетические особенности несветлоклеточного рака почки. *Онкоурология* 2016;12(3):14–21. DOI: 10.17650/1726-9776-2016-12-3-14-21. [Mikhaylenko D.S., Alekseev B.Y., Efremov G.D., Kaprin A.D. Genetic characteristics of the non-clear cell renal cancer. *Cancer Urology* 2016;12 (3):14–21. (In Russ.)].

Монографии, сборники тезисов

Фамилия И.О. авторов. Полное название книги. Место издания: название издательства; год издания; номера страниц или общее количество страниц.

Примеры:

Матвеев Б.П., Бухаркин Б.В., Калинин С.А. Лечение гормонорезистентного рака предстательной железы. В кн.: Материалы конференции «Онкологическая урология: от научных исследований к клинической практике (современные возможности лечения опухолей предстательной железы, мочевого пузыря и почки)». М., 2004. С. 28–31. [Matveev B.P., Buharkin B.V., Kalinin S.A. Treatment of the hormone resistant prostate cancer. In the book: Materials of the conference «Oncologic urology: from scientific studies to clinical practice (modern opportunities for the treatment of prostate, bladder and kidney tumors)». Moscow, 2004. P. 28–31. (In Russ.)].

Каприн А.Д., Нестеров П.В., Костин А.А. и др. Особенности хирургического этапа лечения пациентов, страдающих раком мочевого пузыря с синдромом нижних мочевых путей. Материалы I конгресса Рос. общества онкоурологов: тез. докл. М., 2006. С. 87–88. [Kaprin A.D., Nesterov P.V., Kostin A.A. et al. Peculiarities of the surgical stage of the treatment of patients with bladder cancer with the syndrome of lower urinary tracts. Materials of the I congress of the Russian Oncourologists' Society: report abstract. Moscow, 2006. P. 87–88. (In Russ.)].

Патенты

Фамилия И.О. изобретателя, заявителя, патентовладельца. Название изобретения. Обозначение вида документа, название страны, номер, дата публикации (регистрационный номер заявки, дата подачи).

Пример:

Колс Ян. Применение Мидостаурина для лечения желудочно-кишечных стромальных опухолей. Патент США №5093330 от 03.03.1992 г. [Kols Jan (BE) Administration of Midostaurin for treating gastrointestinal stromal tumours. RU2 410 098C2. (In Russ.)].

При ссылке на **данные, полученные из Интернета**, указывают электронный адрес цитируемого источника.

10. Этические вопросы

• Авторство

Право называться автором имеют лица, которые:

- 1) внесли значительный вклад в концепцию и дизайн исследования или в анализ и интерпретацию данных;
- 2) активно участвовали в подготовке текста статьи или внесении принципиальных изменений;
- 3) участвовали в окончательном утверждении версии, которая сдается в печать;
- 4) готовы принять на себя ответственность за содержание статьи.

Исключительно обеспечение финансирования или подбор материала для статьи не оправдывает включения в состав авторской группы. Общее руководство исследовательским коллективом также не признается достаточным для авторства.

Редакторы вправе запросить информацию о вкладе каждого из авторов в написание статьи и опубликовать ее.

Возможные варианты участия авторов: разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных (включая статистический), обзор публикаций по теме статьи, написание текста рукописи и др.

Пример:

А.М. Иванов: разработка дизайна исследования;
В.С. Петров, Г.П. Сидоров: получение данных для анализа, анализ полученных данных;
М.М. Иванова: написание текста рукописи;
О.Д. Сидорова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных.

Все члены коллектива, не отвечающие критериям авторства, не оказавшие помощь в проведении исследования по сбору, анализу и интерпретации данных, предоставлению материалов и инструментов, должны быть перечислены с их согласия в разделе «Благодарности».

• Конфликт интересов

В конце статьи необходимо указать наличие конфликта интересов для всех авторов. Конфликт интересов подразумевает наличие каких-либо связей и/или личной заинтересованности, которые потенциально могут повлиять на результаты, интерпретацию полученных данных, объективное их восприятие, в частности финансовые отношения и сотрудничество с какими-либо организациями (например, получение гонораров, образовательных грантов, участие в экспертных советах, членство, трудовые отношения, консультационная работа, владение магазином в частной собственности или другие интересы) или нефинансовая заинтересованность (например, личные или профессиональные взаимоотношения, знакомства и пр.), касающиеся рассматриваемых в статье вопросов и/или материалов.

В случае отсутствия конфликта интересов в конце статьи следует констатировать следующее:

Для статьи 1 автора/2 и более авторов

Конфликт интересов. Автор/авторы заявляет/заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author/authors declares/declare no conflict of interest.

• Источник финансирования

Информация о наличии или отсутствии финансирования указывается для всех статей. Пример оформления для статьи с авторским исследованием:

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке <...>.

Статьи, в которых содержится информация, не касающаяся непосредственно исследования, оформляются следующим образом:

Финансирование. Работа выполнена при поддержке <...>.

• Информированное согласие пациентов

Данный раздел необходим при публикации статей с авторскими исследованиями и описаниями клинических случаев. Авторы должны предоставить в редакцию письменное информированное согласие больного на распространение информации и сообщить об этом в статье:

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

• Соблюдение прав животных при проведении исследования

Пример оформления раздела:

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

При несоответствии рукописи перечисленным требованиям, в рассмотрении статьи авторам будет отказано.

Общие положения

• Оплата публикации

Все статьи принимаются к печати бесплатно.

• Авторские права

Авторы, публикующие статьи в данном журнале, соглашаются на следующее:

Авторы сохраняют за собой авторские права и предоставляют журналу право первой публикации работы, которая по истечении 6 месяцев после публикации автоматически лицензируется на условиях Creative Commons Attribution License, которая позволяет другим распространять данную работу с обязательным сохранением ссылок на авторов оригинальной работы и оригинальную публикацию в этом журнале.

Авторы имеют право размещать свою работу в сети Интернет (например, в институтском хранилище или на персональном сайте) до и во время процесса рассмотрения ее данным журналом, так как это может привести к продуктивному обсуждению и большему количеству ссылок на данную работу (См. The Effect of Open Access).

• Приватность

Имена и адреса электронной почты, введенные на сайте этого журнала, будут использованы исключительно для целей, обозначенных этим журналом, и не будут использованы для каких-либо других целей или предоставлены другим лицам и организациям.

Рассмотрение статьи на предмет публикации занимает не менее 8 недель.

Все поступающие статьи рецензируются. Рецензия является анонимной. Корреспонденция с рецензентом ведётся через ответственного секретаря. После окончательного решения о принятии или отклонении работы все авторы получают электронное информационное письмо с уведомлением о прочтении.

Редакция оставляет за собой право на редактирование статей, представленных к публикации.

При обнаружении автором ошибок в статье до момента публикации или в случае, когда редактор сообщает автору, что получил сведения от третьей стороны о существенных ошибках в статье, автор обязан взаимодействовать с редактором журнала с целью скорейшего изъятия статьи из вёрстки и ее исправления.

Если ошибки обнаружены после выхода номера журнала, автор также обязан взаимодействовать с редактором и следовать его инструкциям по решению данного вопроса в индивидуальном порядке.

Авторы могут присылать свои материалы по электронной почте на адреса:

biotherapy_rbj@mail.ru или **rbjournal@onc.ru**

Также статью можно подать через редакционную систему на сайте журнала.

11. Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Рукопись может быть возвращена авторам, если она им не соответствует.

1. Эта статья ранее не была опубликована, а также не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале (или дано объяснение этого в Комментариях для редактора).
2. Файл отправляемой статьи представлен в формате документа OpenOffice, Microsoft Word, RTF или WordPerfect.
3. Приведены полные интернет-адреса (URL) для ссылок там, где это возможно.
4. Текст набран с полуполным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 12 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание (за исключением интернет-адресов).
5. Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям, описанным в Руководстве для авторов, расположенном на странице «О журнале».
6. Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то выполнены требования документа Обеспечение слепого рецензирования.

