

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



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal

2024 • ТОМ 23 • № 3

Российский Биотерапевтический Журнал



Russian Journal
of Biotherapy

3

ТОМ/VOL. 23
2024

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

Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal

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 23}
'24

Учредитель:

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

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

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

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

Адрес издательства:

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

www.abvpress.ru

Редактор Ю.Н. Бирюкова
Корректор Н.А. Виленкина

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,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013.*

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

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

Российский биотерапевтический журнал.
2024. Том 23. № 3. 1–92.

© Оформление, верстка.

ООО «ИД «АБВ-пресс», 2024

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 фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина 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, профессор кафедры фармации Института фармации им. П.А. Нелюбина 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 нанобиоинженерии 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, ведущий научный сотрудник ГБУЗ «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения города Москвы», профессор кафедры онкологии и рентгенодиагностики им. академика В.П. Харченко Медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы», 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

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., заведующая лабораторией экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

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

Демидов Лев Вадимович, д.м.н., профессор, заведующий хирургическим отделением № 10 биотерапии опухолей ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Павел Константинович, д.м.н., заведующий лабораторией медицинской биотехнологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Кадагидзе Заира Григорьевна, д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник централизованного клинико-лабораторного отдела ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Москва, Россия)

Косоруков Вячеслав Станиславович, к.б.н., 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)

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. 23}
'24

Founder:

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

Founder and editorial office:

Bld. 2, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel.: +7 (499) 324-10-65
Fax: +7 (499) 324-22-74

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

Publishing office:

Research Institute of Carcinogenesis, Floor 3, Bld. 15, 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478.

Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru

www.abvpress.ru

Editor **Yu.N. Biriukova**
Proofreader **N.A. Vilenkina**
Designer **E.V. Stepanova**
Maker-up **O.V. Goncharuk**

The journal is registered

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

If materials are reprinted in whole or in part, reference must necessarily be made to the "Rossijskij bioterapevticeskij zurnal".

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

Rossijskij bioterapevticeskij zurnal. 2024. Volume 23. No 3. 1–92.

© Design, layout PH "ABV-Press", 2024

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, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, 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)

Bunyatyan, 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, Professor of Chair of Pharmacy, P.A. Nelyubin Institute of Pharmacy, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University) (Moscow, Russia)

Evsegneeva, 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 Nanobioengineering, 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 Immunochemistry, 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, Leading researcher at the "Moscow Multidisciplinary Scientific and Clinical Center named after S.P. Botkin of the Moscow Department of Health, Professor of the Department of Oncology and Radiology named after Academician V.P. Kharchenko of the Medical Institute of the "Pravda"

Lumumba Peoples' Friendship University of Russia", 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)

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)

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

- К.С. Титов, С.В. Чулкова, Г.М. Запиров, З.В. Лорие, М.В. Киселевский*
Влияние опухолевого микроокружения рака молочной железы на прогноз и лечение 10
- О.А. Тихонова, Е.С. Дружинина, О.П. Тучина, Д.С. Дружинин, С.А. Докторова*
Сывороточные белки как предикторы развития химиоиндуцированной полинейропатии 18

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Д.С. Фомина, М.С. Лебедкина, Е.А. Никитина, А.Д. Душкин, А.А. Чернов, Ю.Д. Юхновская, И.В. Евсегнеева, А.В. Караулов, М.А. Лысенко*
Использование средств искусственного интеллекта для молекулярного анализа профилей сенсибилизации у больных атопическим дерматитом и бронхиальной астмой. 26
- А.В. Алясова, М.Е. Мамаева, Н.И. Кубышева, В.В. Новиков*
Анализ изменения содержания уровней растворимых молекул CD50, CD54 и CD95 в сыворотке крови больных миомой матки в зависимости от особенностей течения заболевания (пилотное исследование). 40
- С.Ю. Филиппова, А.О. Ситковская, И.В. Межевова, Е.Ю. Златник, И.А. Новикова, Л.Ю. Владимирова, Ю.В. Пржедецкий, Е.А. Дженкова, С.А. Колпаков, Е.П. Колпакова, Е.Ю. Кириченко, А.К. Логвинов*
Действие штамма Р-92 реовируса человека на опухолевые клеточные линии 47
- А.В. Ланцова, Е.В. Санарова, Л.Л. Николаева, Д.А. Ланцова, Ю.В. Шкляев, А.Е. Бармашов, Н.Л. Соловьева, М.А. Барышникова*
Разработка модели лекарственной формы нового отечественного соединения (производное пирроло[3,2-1]акридинона) и изучение его цитотоксической активности 57
- М.В. Шестовская, А.Л. Лусс, В.В. Макаров, В.С. Юдин, А.А. Кескинов*
Наночастицы оксида железа как потенциальные агенты для комбинированной лучевой терапии 65
- Э.Ф. Степанова, Е.В. Ковтун, Н.Д. Бунятян, Мониб М.И. Даду, И.М. Привалов, А.П. Плетень*
Изучение и подбор оптимальных реологических характеристик гелевых композиций парацетама для интраназального применения 78

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

- В.А. Скрибицкий, Ю.А. Финогенова, К.Е. Шпакова, А.А. Липенгольц, А.В. Смирнова, И.А. Скрипачев, Д.И. Невзоров, А.И. Пронин, Е.Ю. Григорьева*
Первый опыт применения мультимодальной *in vivo* ПЭТ/ОФЭКТ/КТ и МРТ-визуализации лабораторных мышей с меланомой B16F10 (краткое сообщение). 86

ЮБИЛЕЙ

- БАРЫШНИКОВ Анатолий Юрьевич (1944–2015) 91**

REVIEW

- Konstantin S. Titov, Svetlana V. Chulkova, Hajimurad M. Zapiro, Zoya V. Lorie, Mikhail V. Kiselevskiy*
Impact of the tumor microenvironment of breast cancer on prognosis and treatment 10
- Olga A. Tikhonova, Evgenia S. Druzhinina, Oksana P. Tuchina, Dmitry S. Druzhinin, Svetlana A. Doktorova*
Serum proteins as predictors of the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. 18

ORIGINAL REPORTS

- Daria S. Fomina, Marina S. Lebedkina, Ekaterina A. Nikitina, Alexander D. Dushkin, Anton A. Chernov, Yulia D. Yukhnovskaya, Irina V. Evsegneeva, Alexander V. Karaulov, Mariana A. Lysenko*
Artificial intelligence tools for molecular analysis of sensitization profiles in patients with atopic dermatitis and bronchial asthma 26
- Anna V. Alyasova, Marina E. Mamaeva, Nailya I. Kubysheva, Viktor V. Novikov*
Analysis of changes in the levels of soluble molecules CD50, CD54 and CD95 in the blood serum of patients with uterine fibroids depending on the characteristics of the disease (pilot study) 40
- Svetlana Yu. Filippova, Anastasiya O. Sitkovskaya, Irina V. Mezhevova, Elena Yu. Zlatnik, Inna A. Novikova, Lubov Yu. Vladimirova, Yury V. Przhedetskiy, Elena A. Dzhenkova, Sergey A. Kolpakov, Elena P. Kolpakova, Evgeniya Yu. Kirichenko, Alexander K. Logvinov*
Effect of human reovirus strain R-92 on tumor cell lines. 47
- Anna V. Lantsova, Ekaterina V. Sanarova, Ludmila L. Nikolaeva I., Daria A. Lantsova, Yurii V. Shklyayev, Alexander E. Barmashov, Natalia L. Solovieva, Maria A. Baryshnikova*
Development of a model of a dosage form for a new domestic compound (pyrrolo[3,2-l]acridinone derivative) and studying its cytotoxic activity 57
- Maria V. Shestovskaya, Anna L. Luss, Valentin V. Makarov, Vladimir S. Yudin, Anton A. Keskinov*
Iron oxide nanoparticles as potential agents for combined radiotherapy 65
- Eleonora F. Stepanova, Elena V. Kovtun, Natalya D. Bunyatyan, Moneb M.Y. Dadou, Igor M. Privalov, Anatoly P. Pleten*
Study and selection of optimal rheological characteristics of piracetam gel compositions for intranasal use 78

BRIEF REPORT

- Vsevolod A. Skribitsky, Yulia A. Finogenova, Kristina E. Shpakova, Alexey A. Lipengolts, Anna V. Smirnova, Ivan A. Skripachev, Denis I. Nevzorov, Artem I. Pronin, Elena Y. Grigorieva*
The first experience of multi-modal *in vivo* PET/SPECT/CT and MRI imaging of laboratory mice with melanoma B16F10 (short message) 86

JUBILEE

- BARYSHNIKOV Anatoly Yurievich (1944–2015) 91**

Влияние опухолевого микроокружения рака молочной железы на прогноз и лечение

К.С. Титов^{1,2}, С.В. Чулкова^{3,4}, Г.М. Запиров², З.В. Лорие¹, М.В. Киселевский³

¹ГБУЗ г. Москвы «Московский многопрофильный научно-клинический центр им. С.П. Боткина Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский проезд, 5;

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

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1А

Контакты: Константин Сергеевич Титов ks-titov@mail.ru

По данным Всемирной организации здравоохранения, рак молочной железы (РМЖ) занимает 1-е место среди онкологических заболеваний у женщин как во многих развитых странах, так и в Российской Федерации. За последние 20 лет заболеваемость РМЖ в мире выросла и продолжает увеличиваться. Данное явление диктует необходимость более глубокого молекулярно-биологического, генетического и иммунологического изучения механизмов развития и прогрессии данной гетерогенной злокачественной опухоли.

В последнее время возрастает исследовательский интерес не только к непосредственным причинам развития опухолей, но и к факторам, способствующим их прогрессии, таким как клеточное микроокружение опухоли, состав которого оказывает большое влияние на развитие рака, лечение и прогноз заболевания. В составе клеточного микроокружения опухоли оцениваются мононуклеарные клетки, пропорция которых определяет выраженность и направленность иммунного ответа. Показано их значение для выбора приоритетного вида лекарственной терапии и оценки ее эффективности. В статье приведены актуальные данные по субпопуляциям Т-клеток (CD8⁺, CD4⁺), В-клеток (CD20⁺), натуральных киллеров. Обсуждается их роль в развитии и прогрессии РМЖ в зависимости от их фенотипа. Современные исследования уделяют внимание минорной субпопуляции Т-лимфоцитов – TCR-Vδ1⁺ клеткам. Эта субпопуляция представлена преимущественно в опухолевой ткани и оказывает иммуносупрессивное влияние на Т-эффекторы.

Не меньшее внимание исследователей вызывают клетки воспаления – макрофаги и нейтрофилы. Их роль в прогрессировании опухоли широко обсуждается. Известно, что дифференцировка макрофагов в фенотипы M1 или M2 определяется микросредой опухоли. Преобладание макрофагов с проопухолевой активностью способствует опухолевой прогрессии и метастазированию рака. Дополнительно макрофаги могут стимулировать миграцию нейтрофилов, которые, в свою очередь, посредством продукции матриксных металлопротеиназ поддерживают метастазирование РМЖ. Сообщается, что матриксная металлопротеиназа 9 способствует образованию васкулоэндотелиального фактора роста, что объясняет проопухолевые свойства нейтрофилов.

В контексте набирающей обороты иммунотерапии опухолей оценка факторов опухолевого микроокружения является перспективной как в отношении мониторинга эффективности терапии РМЖ, так и в отношении поиска потенциальных терапевтических мишеней. В обзоре систематизированы и обобщены сведения по данной проблематике на настоящий момент.

Ключевые слова: рак молочной железы, клеточное микроокружение, прогноз, лечение

Для цитирования: Титов К.С., Чулкова С.В., Запиров Г.М. и др. Влияние опухолевого микроокружения рака молочной железы на прогноз и лечение. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):10–7.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-10-17>

Impact of the tumor microenvironment of breast cancer on prognosis and treatment

Konstantin S. Titov^{1,2}, Svetlana V. Chulkova^{3,4}, Hajimurad M. Zapirov², Zoya V. Lorie¹, Mikhail V. Kiselevskiy³

¹S.P. Botkin Moscow Multidisciplinary Scientific and Clinical Center, Moscow Healthcare Department; 5, 2nd Botkinsky Proezd, Moscow 125284, Russia;

²Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

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

⁴N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1A Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia

Contacts: Konstantin Sergeevich Titov ks-titov@mail.ru

According to World Health Organization, breast cancer (BC) ranks first among cancer diseases in women in many developed countries of the world and in the Russian Federation. Over the past 20 years, the incidence of breast cancer in the world has increased and continues to increase. This phenomenon dictates the need for a more in-depth molecular biological, genetic and immunological study of the mechanisms of development and progression of this heterogeneous malignant tumor.

Recently, there has been increasing interest in the world not only in the direct causes of tumor development, but also in factors contributing to its progression, such as the cellular microenvironment of the tumor, the composition of which has a great influence on cancer development, treatment and prognosis. In the cellular microenvironment of the tumor, mononuclear cells are assessed, the proportion of which determines the severity and direction of the immune response. Their importance for choosing the priority type of drug therapy and assessing its effectiveness is shown. The article provides current data on subpopulations of T cells (CD8⁺, CD4⁺), B cells (CD20⁺), and natural killer. Their role in the development and progression of breast cancer is discussed depending on their phenotype. Modern research pays attention to a minor subpopulation of T lymphocytes – TCR-Vδ1⁺ cells. This subpopulation is represented predominantly in tumor tissue and has an immunosuppressive effect on T-effectors.

At the present stage, inflammatory cells – macrophages and neutrophils – are of no less interest. Their role in tumor progression is widely debated. It is known that the differentiation of macrophages into M1 or M2 phenotypes is determined by the tumor microenvironment. The predominance of macrophages with protumor activity promotes tumor progression and cancer metastasis. Additionally, macrophages can stimulate the migration of neutrophils, which, in turn, support the metastasis of breast cancer through the production of matrix metalloproteinases. Matrix metalloproteinase 9 has been reported to promote the formation of vascular endothelial growth factor, which explains the protumor properties of neutrophils.

In the context of growing tumor immunotherapy, assessment of tumor microenvironmental factors is promising both in relation to monitoring the effectiveness of breast cancer therapy and in relation to the search for potential therapeutic targets. The review systematizes and summarizes information on this issue to date.

Keywords: breast cancer, cellular microenvironment, prognosis, treatment

For citation: Titov K.S., Chulkova S.V., Zapirov H.M. et al. Impact of the tumor microenvironment of breast cancer on prognosis and treatment. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):10–7.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-10-17>

Введение

Исследования последних 50 лет в области иммунологии и биологии злокачественных опухолей меняют парадигму представлений об их природе. Установлено, что злокачественные опухоли гетерогенны и это обусловлено целым рядом молекулярных и иммунологических факторов [1–3]. Изучаются стволовые и адгезионные факторы, рецепторы роста и стероидных гормонов, белки дифференцировки иммунных клеток и др. [4, 5]. В результате многочисленных экспериментальных и клинических исследований выявлено прогностическое и предиктивное значение многих из них (например, экспрессия опухолью эстрогеновых рецепторов коррелирует с благоприятным течением рака молочной железы (РМЖ) [6–8]. Как молекулярные, так и иммунологические факторы оказались полезными в диагностике разных видов злокачественных опухолей и изучении их патогенеза [9, 10]. Установлены взаимосвязи иммунных факторов с экспрессией онкогенных микроРНК, экс-

прессия которых нарушена при злокачественных опухолях [11, 12].

Наравне с изучением молекулярно-биологических свойств опухоли широко изучается опухолевое микроокружение, которое формируется как результат взаимодействия между клетками опухоли и разными типами окружающих и опухоль-инфильтрирующих клеток (иммунные клетки – лимфоциты, дендритные клетки, моноциты, нейтрофилы, макрофаги, эндотелиальные, стромальные клетки и др.) [13, 14]. Доказано, что при РМЖ опухолевое микроокружение влияет на эффективность противоопухолевого иммунного ответа [15–17]. На современном этапе исследований известно, что для реализации иммунного противоопухолевого ответа система иммунитета вовлекает различные клеточные и гуморальные факторы, которые в тесной ассоциации приводят к процессу клональной селекции опухолеспецифических лимфоцитов и выделению соответствующих цитокиновых факторов [18, 19]. В этом сложном многоэтапном

процессе участвуют иммунные клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета, созревание и обучение которых проходит в центральных и периферических иммунорегуляторных органах [20, 21]. Качественная и количественная характеристика иммунных клеток позволяет оценивать эффективность лечения, скорость опухолевой прогрессии, прогноз заболевания, однако многие механизмы взаимодействия между различными компонентами опухолевого микроокружения еще изучены недостаточно [22].

Местный противоопухолевый клеточный иммунитет

В настоящее время научно обосновано то, что преобладание лимфоцитарного компонента (Т-лимфоцитов и натуральных киллеров — НК-клеток) над клетками воспаления (макрофагами, нейтрофилами) является прогностически более благоприятным фактором при РМЖ [23]. Однако важное значение имеет более тонкое исследование соотношений различных популяций лимфоцитов: $CD8^+$ - и $CD4^+$ -Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов ($CD20^+$), НК-клеток, $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ (forkhead box protein 3) — Т-регуляторных клеток и др. [24]. $CD8^+$ цитотоксические Т-лимфоциты и НК-клетки обладают выраженной противоопухолевой активностью. Инфильтрация опухоли цитотоксическими лимфоцитами наиболее выражена при трижды негативном РМЖ (опухоли с лимфоцитарной инфильтрацией более 50 %). Важно отметить, что при увеличении $CD8^+$ -инфильтрации на каждые 10 % преимущество в общей выживаемости (ОВ) возрастает на 18 % [25, 26].

Т-регуляторные лимфоциты — это $CD4^+D25^+FOXP3^+$ -популяция клеток, которые могут ингибировать киллерные свойства эффекторных клеток. Т-регуляторные клетки экспрессируют FOXP3 — транскрипционный фактор, регулирующий транскрипцию генов, ответственных за определенную дифференцировку Т-клеток, синтез цитокинов и других медиаторов, подавляющих иммунный ответ [27].

Схожими с $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -популяцией Т-лимфоцитов свойствами обладает субпопуляция

$CD4^+Th-17$ -клеток (T helper 17 cells, или Т-хелперы 17), которая может способствовать росту опухоли, инвазии, а также ее неоваскуляризации [28]. На рис. 1 представлены субпопуляции $CD4^+Th-17$ -клеток и продуцируемые ими биологически активные факторы. Лимфоциты Th-17 могут подавлять иммунные реакции за счет дифференцировки в клетки TR1 (T regulatory cells type 1), Th1 и Treg (regulatory T cells). Клетки Thf (follicular helper T cells) способны к потенцированию иммунного ответа, поддерживая В-клеточные реакции.

Цитокины, которые секретируются $CD4^+Th-17$ -клетками, тесно связаны со стволовыми опухолевыми клетками и микроокружением. V. Karpishev и соавт. сообщают, что содержание популяции $CD4^+Th-17$ -клеток в периферической крови больных РМЖ увеличено по сравнению со здоровыми донорами [28]. Популяция $CD4^+Th-17$ -лимфоцитов посредством продукции цитокинов — интерлейкинов (IL) — 22, 17, 21 и 6, фактора некроза опухоли α — способна значительно усиливать прогрессирование РМЖ. В исследовании S. Wang и соавт. провели метаанализ, по результатам которого обнаружено, что лимфоидная инфильтрация $CD4^+Th-17$ -клетками коррелировала с плохим прогнозом у больных РМЖ [29].

Еще 1 субпопуляция Т-лимфоцитов, которая привлекает внимание исследователей, — это TCR- $V\delta 1^+$ -лимфоциты. Показано, что именно субпопуляция $V\delta 1^+$ -клеток преимущественно представлена в опухолевой ткани и оказывает иммуносупрессивное влияние на Т-эффекторы [30].

Хотелось бы подчеркнуть, что результаты крупных научных исследований доказывают, что, несмотря на приведенные данные, преобладание лимфоцитов в опухолевом микроокружении над воспалительными клетками коррелирует с достоверно лучшим ответом на системную лекарственную терапию и более благоприятным прогнозом при РМЖ. Например, исследование, проведенное под эгидой BioMed Central, показало зависимость между типом патоморфологического ответа на неоадьювантную терапию

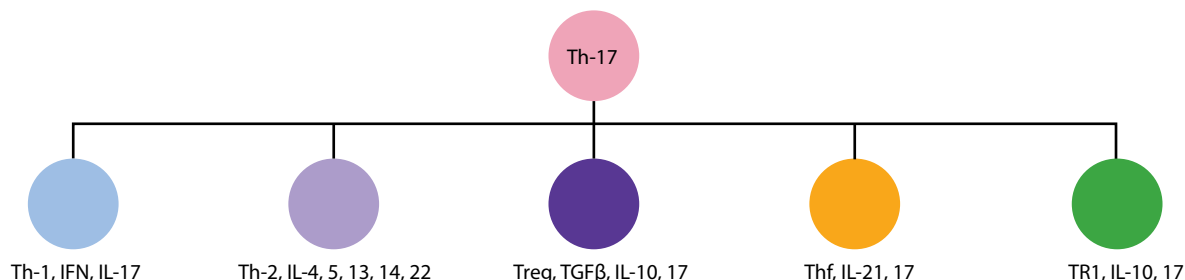


Рис. 1. Лимфоциты Т-хелперы (Th) 17 и их субпопуляции: IFN — интерферон; IL — интерлейкин; Treg — регуляторные Т-клетки; TGFb — трансформирующий фактор роста β; Thf — фолликулярные Т-хелперы; TR1 — регуляторные клетки 1-го типа

Fig. 1. Lymphocytes T helper (Th) 17 cells and their subpopulations: IFN — interferon; IL — interleukin; Treg — regulatory T cells; TGFb — transforming growth factor β; Thf — follicular helper T cells; TR1 — T regulatory cells type 1

(4 курса АС [доксорубин + циклофосфан] + 4 курса доцетаксела + трастузумаб) и характером иммунного инфильтрата у пациентов с люминальным В HER-2-положительным (т.е. с избытком рецепторов эпидермального фактора роста человека 2-го типа) РМЖ стадий IIВ и IIIА – С (протоковой аденокарциномой) с последующим хирургическим лечением и адъювантной гормонотерапией [31]. Полный патоморфологический ответ наблюдался достоверно чаще у пациентов с преобладанием в опухолевом инфильтрате $CD4^{+}$ - и $CD20^{+}$ -лимфоцитов. Не менее важное значение придают соотношению $CD8^{+}$ -/ $CD4^{+}$ -лимфоцитов, увеличение которого отражает преобладание противоопухолевого иммунного ответа [7]. Так, выявлена положительная корреляция между увеличением частоты полного ответа на лечение и уменьшением соотношения $CD4$ -/ $CD8^{+}$ -лимфоцитов [8]. Выраженная лимфоидная инфильтрация $CD4^{+}$ - и $CD8^{+}$ -клетками является прогностически благоприятным фактором для проведения курса неoadъювантной химио- и таргетной терапии при РМЖ, что подробно представлено в статье S. Dushyanthen и соавт. [32]. При местно-распространенном РМЖ при лимфоидной инфильтрации, составляющей более 50 %, полный патоморфологический ответ наблюдали гораздо чаще [33].

Зависимость опухолевой прогрессии от клеток воспаления

Важным компонентом опухолевого микроокружения РМЖ являются клетки воспаления, такие как макрофаги и нейтрофилы, большое количество которых расценивается как прогностически неблагоприятный фактор [34, 35]. Опухлеассоциированные макрофаги (tumor-associated macrophages – TAMs) проявляют в зависимости от их фенотипа как про-, так и противоопухолевое действие [36]. Это связано с наличием 2 полярных фенотипов макрофагов: М1-макрофагов, проявляющих противоопухолевую активность, и М2-макрофагов, оказывающих иммуносупрессивное влияние (рис. 2) [37].

Дифференцировка макрофагов в фенотипы М1 или М2 во многом зависит от влияния клеточного микроокружения опухоли. Макрофаги М1 образуются под влиянием интерферона γ и продуцируют фактор некроза опухоли α , IL-6, IL-12, IL-23, которые обладают противоопухолевой активностью. М2-фенотип макрофагов образуется под влиянием IL-10, цитокинов CCL (chemokine [C–C motif] ligand – лиганд хемокина мотива C-C) 2, 17 и 22, трансформирующего фактора роста, обладающих проопухолевой активностью; CCL22 имеет, в частности, способность к подавлению противоопухолевого иммунитета через

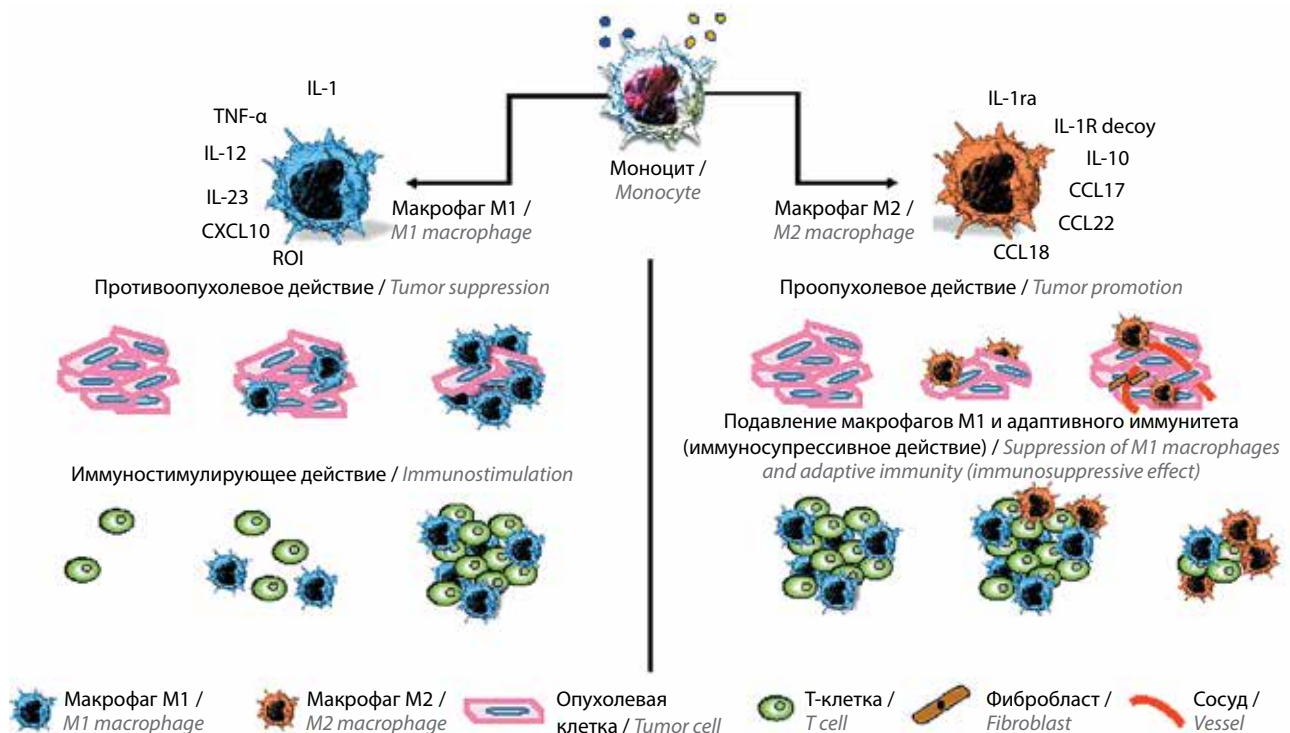


Рис. 2. Фенотипы макрофагов и их роль в развитии опухоли: IL – интерлейкин; TNF- α – фактор некроза опухоли α ; CXCL10 – лиганд хемокина мотива C-X-C 10; ROI – интересующий регион; CCL – лиганд хемокина мотива C-C

Fig. 2. Macrophage phenotypes and their role in tumor development: IL – interleukin; TNF- α – tumor necrosis factor α ; CXCL10 – C-X-C motif chemokine ligand 10; ROI – region of interest; CCL – chemokine (C-C motif) ligand

супрессию активности цитотоксических Т-лимфоцитов [38].

Следует отметить, что TAMs участвуют в процессе метастазирования РМЖ, способствуя дезорганизации и ремоделированию межклеточного матрикса, что приводит к прорастанию опухолевой ткани до кровеносных сосудов [39]. В исследованиях, проведенных на экспериментальных моделях РМЖ, а также в клинических исследованиях было доказано усиливающее прогрессию действие TAMs, которое ухудшало прогноз и результаты лечения больных РМЖ [40, 41].

Опухолеассоциированные нейтрофилы (tumor associated neutrophils – TANs) как клетки воспаления могут способствовать опухолевому росту и инвазии с дальнейшим метастазированием. Данное свойство является следствием продукции нейтрофилами матриксных металлопротеиназ (matrix metalloproteinases – MMPs) MMP-9, MMP-8 и эластаз, которые разрушают межклеточный матрикс, способствуя опухолевому ангиогенезу [42]. В исследовании, проведенном Е.М. Bekes и соавт. на модели РМЖ, было показано, что TANs, продуцирующие MMP-9, способствуют опухолевой прогрессии и метастазированию [43]. Более того, существуют данные, что MMP-9 способствует образованию васкулоэндотелиального фактора роста, что так же объясняет проопухолевые свойства TANs [44]. Известно, что клетки воспаления взаимодействуют и частично потенцируют действия друг друга. Так, макрофаги могут индуцировать миграцию нейтрофилов путем активации Src-киназ, что способствует хронизации воспаления и ухудшению прогноза РМЖ [45].

Влияние компонентов микроокружения опухоли на прогноз заболевания при раке молочной железы

Определение состава опухолевого микроокружения в настоящее время играет важную роль в выборе методов лечения. Например, назначение иммунотерапии ипилимумабом и анти-PD-1-ингибиторами (anti-programmed cell death protein 1) основано на определении степени лимфоцитарной инфильтрации и фенотипа лимфоцитов.

По данным работы С. Helwick, полная морфологическая регрессия (pCR) после химиоиммунотерапии РМЖ с выраженной лимфоидной инфильтрацией встречается на 17 % чаще, чем при полном отсутствии или слабой выраженности лимфоидной инфильтрации [46]. Степень выраженности лимфоидной инфильтрации также значительно влияет и на прогноз: 3-летняя ОВ при выраженной лимфоидной инфильтрации составляет 78 % против 58 % при ее отсутствии [47]. Как можно видеть, ОВ увеличивается примерно на 20 % при выраженной лимфоидной инфильтрации. Для трижды негативного РМЖ

с выраженной степенью лимфоидной инфильтрации показатели 5-летней безрецидивной выживаемости (92 % против 62 %: $p = 0,018$) и ОВ (92 % против 71 %: $p = 0,036$) выше, чем при слабовыраженной лимфоидной инфильтрации [48].

Увеличение в опухолевом микроокружении клеток воспаления CD68 и CD163 (маркеры фенотипа M2-макрофагов) достоверно ассоциируется с увеличением пролиферативной активности опухоли (индекса Ki-67). Кроме того, имеется связь между увеличением CD68 и уменьшением количества рецепторов стероидных гормонов (α -рецептора эстрогена, рецептора прогестерона). Все эти данные, бесспорно, указывают на связь между количеством M2-макрофагов и прогнозом при РМЖ [49].

Опухолевое микроокружение как перспективная мишень для персонализированного подбора системной лекарственной терапии

На основе изучения физиологии клеток воспаления (нейтрофилы, макрофаги) созданы лекарственные препараты – от глюкокортикостероидов (ГКС) до новых, на данный момент находящихся на доклинических и клинических исследованиях, демонстрирующих хорошие результаты лечения [50]. По данным множества исследований, ГКС-препараты, используемые при лечении РМЖ, не показали впечатляющих результатов по сравнению с монокимиотерапией, продлевая медиану ОВ на 3 мес [51]. При этом следует отметить: более современные обобщающие данные показывают, что эффект от ГКС-терапии при РМЖ неоднозначен, ситуативен и определяется различными комбинациями ГКС- и химиотерапии, клеточным составом опухолевого микроокружения [52]. Примером современных лекарственных препаратов, более прицельно воздействующих на клеточное микроокружение опухоли, могут служить антагонисты рецептора колониестимулирующего фактора-1 (CSF-1R), приводящие к уменьшению концентрации TAMs в опухолевом микроокружении. Данные препараты (PLX3397) демонстрируют низкие показатели токсичности, что делает возможным их назначение в комбинации с химиотерапией [53]. Примером может служить исследование фазы Ib/II PLX 3397 и эрибулина у пациентов с метастатическим РМЖ (NCT01596751), в котором оценивалась эффективность данной комбинации при метастатическом РМЖ. Другой точкой приложения может служить перепрограммирование макрофагов из M2-фенотипа в M1-фенотип. Например, богатый гистидином гликопротеин – HRG – стимулирует переход макрофагов из M2-фенотипа в M1-фенотип, что способствует уменьшению васкуляризации опухоли и потенцированию иммунного противоопухолевого ответа [54].

Другим примером может служить фермент глутамин-синтетаза, ингибирование которого также стимулирует поляризацию макрофагов в M1-фенотип с последующим проявлением их противоопухолевого потенциала: уменьшением неоваскуляризации, супрессии Т-клеточного иммунитета и частоты метастазирования. Все данные свойства были обнаружены в экспериментах на мышах, нокаутированных по гену, кодирующему белок глутамин-синтетазу [55]. Препараты, мишенью которых являются нейтрофилы, относятся к ингибиторам рецепторов CXCL8–CXCR1/2, находятся на стадии доклинических исследований [56].

Заключение

Таким образом, несмотря на то, что межклеточные взаимодействия опухолевого микроокружения при РМЖ изучены недостаточно, преобладание

Т-клеточной лимфоцитарной инфильтрации над клетками воспаления прогностически более благоприятно, что подтверждается современными исследованиями. Предмет активного изучения — клетки воспаления, что на данном этапе открывает широкие возможности для их ингибирования или перепрограммирования. Клетки опухолевого микроокружения являются как факторами, определяющими эффективность лечения и дальнейший прогноз заболевания, так и мишенями для системной лекарственной терапии.

Необходимость определения количественного и качественного клеточных составов опухолевого микроокружения диктуется современными критериями назначения системной терапии РМЖ, особенно касаясь современных иммуноонкологических препаратов (ингибиторов контрольных точек иммунитета — анти-PD-1/PD-1L).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Crabtree J.S., Miele L. Breast cancer stem cells. *Biomedicines* 2018;6(3):77. DOI: 10.3390/biomedicines6030077
- Титов К.С., Оганесян А.П., Ротин Д.Л. и др. Опухолевые стволовые клетки при раке молочной железы. Роль в патогенезе и подходы к терапии. *Злокачественные опухоли* 2016;2:22–7. DOI: 10.18027/2224-5057-2016-2-22-27
Titov K.S., Oganessian A.P., Rotin D.L. et al. Tumor stem cells in breast cancer. Role in pathogenesis and approaches to therapy. *Zlokhachestvennye opuholi = Malignant Tumors* 2016;2:22–7. (In Russ.). DOI: 10.18027/2224-5057-2016-2-22-27
- Тупицын Н.Н., Джуманазаров Т.М., Палладина А.Д. и др. Иммунологические показатели костного мозга больных немелкоклеточным раком легкого. *Российский биотерапевтический журнал* 2020;19(2):47–54. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-47-54
Tupitsyn N.N., Dzhumanazarov T.M., Palladina A.D. et al. Immunological parameters of the bone marrow of patients with non-small cell lung cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zhurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2020;19(2):47–54. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-2-47-54
- Чулкова С.В. Биомаркеры стволовых клеток рака желудка. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2018;21(10):11–7. DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02
Chulkova S.V. Biomarkers of gastric cancer stem cells. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii = Questions of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry* 2018;21(10):11–7. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2018-10-02
- Chernysheva O., Markina I., Demidov L. et al. Bone marrow involvement in melanoma. Potentials for detection of disseminated tumor cells and characterization of their subsets by flow cytometry. *Cells* 2019;8(6):627. DOI: 10.3390/cells8060627
- Wimberly H., Brown J.R., Schalper K. et al. PD-L1 expression correlation with tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Cancer Immunol Res* 2015;3(4):326–32. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0133
- Чулкова С.В., Маркина И.Г., Антипова А.С. и др. Роль стволовых опухолевых клеток в канцерогенезе и прогнозе меланомы. *Вестник Российского научного центра рентгено-радиологии* 2018;18(4):100–16.
Chulkova S.V., Markina I.G., Antipova A.S. et al. The role of stem tumor cells in carcinogenesis and the forecast of melanoma. *Vestnik Rossijskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of X-ray Radiology* 2018;18(4):100–16. (In Russ.).
- Рябчиков Д.А., Абдуллаева Э.И., Дудина И.А. и др. Роль микро-РНК в канцерогенезе и прогнозе злокачественных новообразований молочной железы. *Вестник Российского научного центра рентгено-радиологии* 2018;18(2):1–20.
Ryabchikov D.A., Abdullaeva E.I., Dudina I.A. et al. The role of microRNAs in carcinogenesis and prognosis of malignant neoplasms of the mammary gland. *Vestnik Rossijskogo nauchnogo centra rentgenoradiologii = Bulletin of the Russian Scientific Center of X-ray Radiology* 2018;18(2):1–20. (In Russ.).
- Титов К.С., Казаков А.М., Барышникова М.А. и др. Некоторые молекулярные и иммунологические факторы прогноза трижды негативного рака молочной железы. *Онкогинекология* 2019;32(4):26–34. DOI: 10.52313/22278710_2019_4_26
Titov K.S., Kazakov A.M., Baryshnikova M.A. et al. Some molecular and immunological factors for the prognosis of triple-negative breast cancer. *Onkoginekologiya = Oncogynecology* 2019;32(4):26–34. (In Russ.). DOI: 10.52313/22278710_2019_4_26
- Рябчиков Д.А., Воротников И.К., Талипов О.А. и др. Микро-РНК и их роль в патогенезе и диагностике рака молочной железы. *Медицинский алфавит* 2020;8:12–5. DOI: 10.33667/2078-5631-2020-8-12-15
Ryabchikov D.A., Vorotnikov I.K., Talipov O.A. et al. MicroRNAs and their role in the pathogenesis and diagnosis of breast cancer. *Medicinskij alfavit = Medical Alphabet* 2020;8:12–5. (In Russ.). DOI: 10.33667/2078-5631-2020-8-12-15
- Liu X., Feng D., Liu D. et al. Dissecting the origin of breast cancer subtype stem cell and the potential mechanism of malignant transformation. *PLoS One* 2016;11(10):e0165001.7. DOI: 10.1371/journal.pone.0165001
- Чулкова С.В., Рябчиков Д.А., Дудина И.А. и др. Перспективы использования микро-РНК в качестве диагностических и прогностических биомаркеров меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2019;18(4):51–6. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-51-56

- Chulkova S.V., Ryabchikov D.A., Dudina I.A. et al. Prospects for the use of microRNAs as diagnostic and prognostic biomarkers of melanoma. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2019;18(4):51–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-4-51-56
13. Soysal S.D., Tzankov A., Muenst S.E. Role of the tumor microenvironment in breast cancer. *Pathobiology* 2015;82(3-4): 142–52. DOI: 10.1159/000430499
 14. Coleman R.E., Gregory W., Marshall H. et al. The metastatic microenvironment of breast cancer: clinical implications. *Breast* 2013;22(Suppl. 2):S50–6. DOI: 10.1016/j.breast.2013.07.010
 15. Denkert C., Von Minckwitz G., Darb-Esfahani S. Tumour-infiltrating lymphocytes and prognosis in different subtypes of breast cancer: a pooled analysis of 3771 patients treated with neoadjuvant therapy. *Lancet Oncol* 2018;19(1):40–50. DOI: 10.1016/S1470-2045(17)30904-X
 16. Рябчиков Д.А., Безнос О.А., Дудина И.А. и др. Диссеминированные опухолевые клетки у пациентов с люминальным раком молочной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(1):53–7. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
 - Ryabchikov D.A., Beznos O.A., Dudina I.A. et al. Disseminated tumor cells in patients with luminal breast cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(1):53–7. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-1-53-57
 17. Mao Y., Qu Q., Chen X. et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016;11(4):e0152500. DOI: 10.1371/journal.pone.0152500
 18. Chang R.B., Beatty G.L. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol* 2020;108(1):363–76. DOI: 10.1002/JLB.3MIR0320-475R
 19. Gerada Ch., Ryan K.M. Autophagy, the innate immune response and cancer. *Mol Oncol* 2020;14(9):1913–29. DOI: 10.1002/1878-0261.12774
 20. Чулкова С.В., Стилиди И.С., Глухов Е.В. и др. Селезенка — периферический орган иммунной системы. Влияние спленэктомии на иммунный статус. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2014;25(1-2):21–5. Chulkova S.V., Stilidi I.S., Glukhov E.V. et al. The spleen is a peripheral organ of the immune system. The effect of splenectomy on immune status. *Vestnik RONC im. N.N. Blokhina RAMS = Bulletin of the Russian Research Center named after N.N. Blokhin RAMS* 2014;25(1-2):21–5. (In Russ.).
 21. Sonnenberg G.F., Hepworth M.R. Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2019;19(10):599–613. DOI: 10.1038/s41577-019-0194-8
 22. Чулкова С.В., Шолохова Е.Н., Грищенко Н.В. и др. Ключевая роль популяций В1-лимфоцитов в иммунном ответе у больных раком желудка. *Российский биотерапевтический журнал* 2018;17(4):64–70. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70
 - Chulkova S.V., Sholokhova E.N., Grishchenko N.V. et al. The role of B-1 lymphocytes in antitumor immunity in patients with gastric cancer. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy* 2018;17(4):64–70. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-64-70
 23. Place A.E., Huh S.J., Polyak K. The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Research* 2011;13(6):227. DOI: 10.1186/bcr2912
 24. Allen M., Louise J.J. Jekyll and hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer. *J Pathol* 2011;223(2):162–76. DOI: 10.1002/path.2803
 25. Čepmija T., Mrkljić I., Perić B.M. et al. Prognostic significance of lymphocyte infiltrate localization in triple-negative breast cancer. *J Pers Med* 2022;12(6):941. DOI: 10.3390/jpm12060941
 26. Dieci M.V., Mathieu M.C., Guarneri V. et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. *Ann Oncol* 2015;26(8):1698–704. DOI: 10.1093/annonc/mdv239
 27. Hadrup S.D.M., Thor St.P. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 2013;6(2):123–33. DOI: 10.1007/s12307-012-0127-6
 28. Karpishev V., Ahmadi M., Abbaszadeh-Goudarzi K. et al. The role of Th17 cells in the pathogenesis and treatment of breast cancer. *Cancer Cell Int* 2022;22(1):108. DOI: 10.1186/s12935-022-02528-8
 29. Wang S., Li Z., Hu G. Prognostic role of intratumoral IL-17A expression by immunohistochemistry in solid tumors: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(39):66382. DOI: 10.18632/oncotarget.18807
 30. Ye J., Ma C., Hsueh E.C. et al. Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. *J Immunol* 2013;190(5):2403–14. DOI: 10.4049/jimmunol.1202369
 31. Garcia-Martinez E., Gil G.L., Benito Ch.A. et al. Tumor-infiltrating immune cell profiles and their change after neoadjuvant chemotherapy predict response and prognosis of breast cancer. *Breast Cancer Research* 2014;16(6):488. DOI: 10.1186/s13058-014-0488-5
 32. Dushyanthen S., Beavis P.A., Savas P. et al. Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med* 2015;13:202. DOI: 10.1186/s12916-015-0431-3
 33. Zhou Y., Tian Q., Gao H. et al. Correlation between immune-related genes and tumor-infiltrating immune cells with the efficacy of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J Front Genet.* 2022;13:905617. DOI: 10.3389/fgene.2022.905617
 34. DeNardo D.G., Barreto J.B., Andreu P. et al. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* 2009;16(2):91–102. DOI: 10.1016/j.ccr.2009.06.018
 35. Dumitru C.A., Lang S., Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. *Semin Cancer Biol* 2013;23(3):141–8. DOI: 10.1016/j.semcancer.2013.02.005
 36. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers (Basel)* 2014;6(3):1670–90. DOI: 10.3390/cancers6031670
 37. Solinas G., Germano G., Mantovani A., Allavena P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86(5):1065–73. DOI: 10.1189/jlb.0609385
 38. Mantovani A., Locati M. Tumor-associated macrophages as a paradigm of macrophage plasticity, diversity, and polarization: lessons and open questions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33(7):1478–83. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.300168
 39. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):239–52. DOI: 10.1038/nrc2618
 40. Knutson K.L., Dang Y., Lu H. et al. IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neutransgenic mice. *J Immunol* 2006;177(1):84–91. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.84
 41. Kim J., Bae J.S. Tumor-associated macrophages and neutrophils in tumor microenvironment. *Mediators Inflamm* 2016;2016:6058147. DOI: 10.1155/2016/6058147
 42. Leifler K.S., Svensson S., Abrahamsson A. Inflammation induced by MMP-9 enhances tumor regression of experimental breast cancer. *J Immunol* 2013;190(8):4420–30. DOI: 10.4049/jimmunol.1202610

43. Bekes E.M., Schweighofer B., Kupriyanova T.A. et al. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *Am J Pathol* 2011;179(3):1455–70. DOI: 10.1016/j.ajpath.2011.05.031
44. Nozawa H., Chiu C., Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multi stage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(33):12493–8. DOI: 10.1073/pnas.0601807103
45. Tauzin S., Starnes T.W., Becker F.B. et al. Redox and Src family kinase signaling control leukocyte wound attraction and neutrophil reverse migration. *J Cell Biol* 2014;207(5):589–98. DOI: 10.1083/jcb.201408090
46. Helwick C. Tumor-infiltrating lymphocytes prognostic in the metastatic and neoadjuvant breast cancer settings. 2017. URL: <https://ascopost.com/issues/february-10-2017/tumor-infiltrating-lymphocytes-prognostic-in-the-metastatic-and-neoadjuvant-breast-cancer-settings/>
47. Furlow B. Tumor-infiltrating lymphocytes associated with HER2⁺ breast cancer survival. 2016. Cancer therapy advisor. URL: <https://www.cancertherapyadvisor.com/news/tumor-infiltrating-lymphocytes-associated-with-her2-breast-cancer-survival/>
48. Cvetanović A., Filipović S., Živković N. et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and breast cancer: are immune checkpoint inhibitors ready for prime time in breast cancer? *Acta Facultatis Medicae Naissensis* 2016;33(4):237–46. DOI:10.1515/afmnai-2016-0026
49. Lindsten Th., Hedbrant A.L., Ramberg A. et al. Effect of macrophages on breast cancer cell proliferation, and on expression of hormone receptors, uPAR and HER-2. *Int J Oncol* 2017;51(1):104–14. DOI: 10.3892/ijo.2017.3996
50. Criscitiello C., Esposito A., Curigliano G. Tumor-stroma crosstalk: targeting stroma in breast cancer. *Curr Opin Oncol* 2014;26(6):551–5. DOI: 10.1097/CCO.0000000000000122
51. Ingle J.N., Mailliard J.A., Schaid D.J. et al. A double-blind trial of tamoxifen plus prednisolone versus tamoxifen plus placebo in postmenopausal women with metastatic breast cancer. A collaborative trial of the North Central Cancer Treatment Group and Mayo Clinic. *Cancer* 1991;68(1):34–9. DOI:10.1002/1097-0142(19910701)68:1<34::aid-cncr2820680107>3.0.co;2-q
52. Bruce D.K. Systematic review of the clinical effect of glucocorticoids on nonhematologic malignancy. *BMC Cancer* 2008;8:84. DOI: 10.1186/1471-2407-8-84
53. Cannarile M.A., Weisser M., Jacob W. et al. Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy. *J Immunother Cancer* 2017;5(1):53. DOI: 10.1186/s40425-017-0257-y
54. Rolny C., Mazzone M., Tugues S. et al. HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. *Cancer Cell* 2011;19(1):31–44. DOI:10.1016/j.ccr.2010.11.009
55. Palmieri E.M., Menga A., Martín-Pérez R. et al. Pharmacologic or genetic targeting of glutamine synthetase skews macrophages toward an M1-like phenotype and inhibits tumor metastasis. *Cell Rep* 2017;20(7):1654–66. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.07.054
56. Khan M.N., Wang B., Wei J. et al. CXCR1/2 antagonism with CXCL8/interleukin-8 analogue CXCL8 (3-72) K11R/G31 Prestricts lung cancer growth by inhibiting tumor cell proliferation and suppressing angiogenesis. *Oncotarget* 2015;6(25):21315–27. DOI: 10.18632/oncotarget.4066

Вклад авторов

К.С. Титов: концепция и разработка дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи;
 С.В. Чулкова: написание статьи, перевод, подготовка рукописи;
 Г.М. Запиров: сбор и обработка данных литературы;
 З.В. Лорие: перевод и подготовка рукописи, сбор данных литературы;
 М.В. Киселевский: анализ и редактирование рукописи.

Author's contributions

K.S. Titov: concept and research design development, data analysis and interpretation, article writing;
 S.V. Chulkova: manuscript writing, translation, preparation of the manuscript;
 H.M. Zapirov: data collection and processing;
 Z.V. Lorie: translation and preparation of the manuscript, data collection.
 M.V. Kiselevskiy: analysis and editing of the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

К.С. Титов / K. S. Titov: <https://orcid.org/0000-0003-4460-9136>
 С.В. Чулкова / S.V. Chulkova: <https://orcid.org/0000-0003-4412-5019>
 Г.М. Запиров / H.M. Zapirov: <https://orcid.org/0000-0003-2347-4615>
 З.В. Лорие / Z.V. Lorie: <https://orcid.org/0000-0002-4698-7184>
 М.В. Киселевский / M.V. Kiselevskiy: <https://orcid.org/0000-0002-0132-167X>

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 13.03.2024. Принята в печать: 20.08.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.2024.

Article received: 13.03.2024. Accepted for publication: 20.08.2024. Published online: 00.00.2024.

Сывороточные белки как предикторы развития химиоиндуцированной полинейропатии

О.А. Тихонова¹, Е.С. Дружинина², О.П. Тучина¹, Д.С. Дружинин³, С.А. Докторова¹

¹ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта»; Россия, 236041 Калининград, ул. А. Невского, 14;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1А;

³ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 150000 Ярославль, ул. Революционная, 6

Контакты: Ольга Алексеевна Тихонова offelia78@mail.ru

Введение. Развитие полинейропатии на фоне применения цитотоксических препаратов является частым неврологическим осложнением, которое может значительно ухудшить качество жизни пациентов и ограничить возможности использования химиотерапии. Трудности в прогнозировании проявлений и тяжести неврологических осложнений обусловлены множеством факторов, включая индивидуальные особенности пациента, тип и дозу применяемого препарата, а также наличие сопутствующих заболеваний. В последние годы внимание исследователей сосредоточилось на выявлении сывороточных биомаркеров, которые могут помочь в ранней диагностике и мониторинге химиоиндуцированной полинейропатии. Понимание их роли в развитии полинейропатии может открыть новые возможности для разработки стратегий профилактики и лечения данного осложнения, что, в свою очередь, может повысить эффективность лечения и улучшить качество жизни пациентов. Данный обзор посвящен биомаркерам и их клиническому значению в развитии химиоиндуцированной полинейропатии.

Цель исследования – анализ и обобщение современных представлений о сывороточных биологических маркерах химиоиндуцированной полинейропатии на основании данных литературы.

Материалы и методы. Поиск литературы проводили с использованием баз данных PubMed и Medline. В анализ включали систематические обзоры, публикации оригинальных исследований и метаанализы в период с 2000 по 2023 г.

Результаты. За последние десятилетия появилось новое понимание роли биомаркеров в развитии химиоиндуцированной полинейропатии, среди которых наиболее специфичными являются нейрофиламенты. Использование доступных и чувствительных методик измерения концентрации биомаркеров позволит на ранней стадии прогнозировать и предотвращать развитие данного осложнения.

Заключение. Анализ данных литературы показал высокую значимость биомаркеров при повреждении структур периферической нервной системы, что может в ближайшем будущем отразиться на тактике ведения онкологических пациентов и, в свою очередь, улучшит качество их жизни.

Ключевые слова: химиоиндуцированная полинейропатия, биомаркеры, нейрофиламенты, сывороточные белки

Для цитирования: Тихонова О.А., Дружинина Е.С., Тучина О.П. и др. Сывороточные белки как предикторы развития химиоиндуцированной полинейропатии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):18–25. DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-18-25>

Serum proteins as predictors of the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy

Olga A. Tikhonova¹, Evgenia S. Druzhinina², Oksana P. Tuchina¹, Dmitry S. Druzhinin³, Svetlana A. Doktorova¹

¹Immanuel Kant Baltic Federal University; 14 A. Nevskogo St., Kaliningrad 236041, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1A Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia;

³Yaroslavl State Medical University, Ministry of Health of Russia; 6 Revolutionnaya St., Yaroslavl 150000, Russia

Contacts: Olga Alekseevna Tikhonova offelia78@mail.ru

Background. The development of polyneuropathy in the context of cytotoxic drug administration is a common neurological complication that can significantly impair patients' quality of life and limit the use of chemotherapy. The difficulties in predicting the manifestations and severity of neurological complications are due to multiple factors, including individual patient characteristics, the type and dosage of the drug used, as well as the presence of comorbid conditions. In recent years, researchers have focused on identifying serum biomarkers that may aid in the early diagnosis and monitoring of Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy. Understanding their role in the development of polyneuropathy may open new avenues for developing strategies for the prevention and treatment of this complication, which, in turn, could enhance treatment efficacy and improve patients' quality of life. This review is dedicated to biomarkers and their clinical significance in the development of Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy.

Aim. To analyze and summarize the current understanding of serum biological markers of Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy based on literature data.

Materials and methods. The literature search was performed using the following databases: PubMed, Medline. Systematic reviews, publications of original studies and meta-analyses between 2000 and 2023 were included in the analysis.

Results. Over the past decades, new insights into the role of biomarkers in the development of Chemotherapy-induced Peripheral Neuropathy have emerged, among which neurofilaments are more specific. The use of readily available and ultra-sensitive techniques for measuring biomarker concentrations will allow early prediction and prevention of this complication.

Conclusion. The analysis of literature data has shown the high relevance of the role of biomarkers in the damage of peripheral nervous system structures, which may in the near future affect the management tactics and in turn improve the quality of life of cancer patients.

Keywords: chemotherapy-induced peripheral neuropathy, biomarkers, neurofilaments, whey proteins

For citation: Tikhonova O.A., Druzhinina E.S., Tuchina O.P. et al. Serum proteins as predictors of the development of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Rossijskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):18–25.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-18-25>

Введение

Химиоиндуцированная полинейропатия (ХИПН) — распространенное осложнение на фоне применения цитотоксических препаратов, которое может привести к снижению дозы или прекращению лечения, а также к ухудшению качества жизни онкологического пациента. Степень ХИПН зависит от общей кумулятивной дозы используемого лекарственного средства. Наибольшей нейротоксичностью обладают препараты платины (оксалиплатин, карбоплатин, цисплатин), антитубулины (доцетаксел, паклитаксел), а также бортезомиб и др. [1]. Распространенность ХИПН, по данным метаанализа М. Seretny и соавт. [2], составляет 68,1 % в течение первого месяца химиотерапевтического лечения, 60,0 % — через 3 мес и 30,0 % — через 6 мес. Кроме того, ХИПН может дебютировать и прогрессировать через несколько месяцев после прекращения лечения [3–5].

Несмотря на высокую распространенность ХИПН, до сих пор не разработаны методы и алгоритмы диагностики [6], профилактики и лечения ХИПН, за исключением рекомендаций использования дулоксетина при развитии нейропатической боли [7, 8]. Поиск и применение биомаркеров ХИПН в рутинной практике — важный шаг в прогнозировании и предупреждении осложнений химиотерапии (ХТ). В на-

стоящее время существует острая потребность в легкодоступных и объективных маркерах. За последнее десятилетие мы наблюдаем увеличение количества исследований в этом направлении, однако до сих пор обнаруженные биомаркеры широко не применяются.

Целью данного обзора является анализ и обобщение современных представлений о сывороточных биологических маркерах ХИПН по результатам поиска в базе данных PubMed, Medline. Мы схематично на рис. 1 отображали известные маркеры и их взаимодействие при развитии ХИПН.

Нейрофиламенты

Основные структурные компоненты цитоскелета NFs относятся к семейству белков промежуточных филаментов; NFs представляют собой гетерополимеры из 5 различных белков: легкая цепь NF (neurofilament light, NFL), средняя цепь (neurofilament medium, NFM), тяжелая цепь (neurofilament heavy, NFH), интернексин-α и периферин. Они отвечают за радиальный рост и структурную стабильность миелинизированных аксонов, обеспечивая оптимальную скорость распространения возбуждения. При аксональной дегенерации NF выделяются во внеклеточное пространство и могут быть обнаружены в крови [9]. При развитии ХИПН наиболее изучена легкая цепь NF (см. рис. 1).

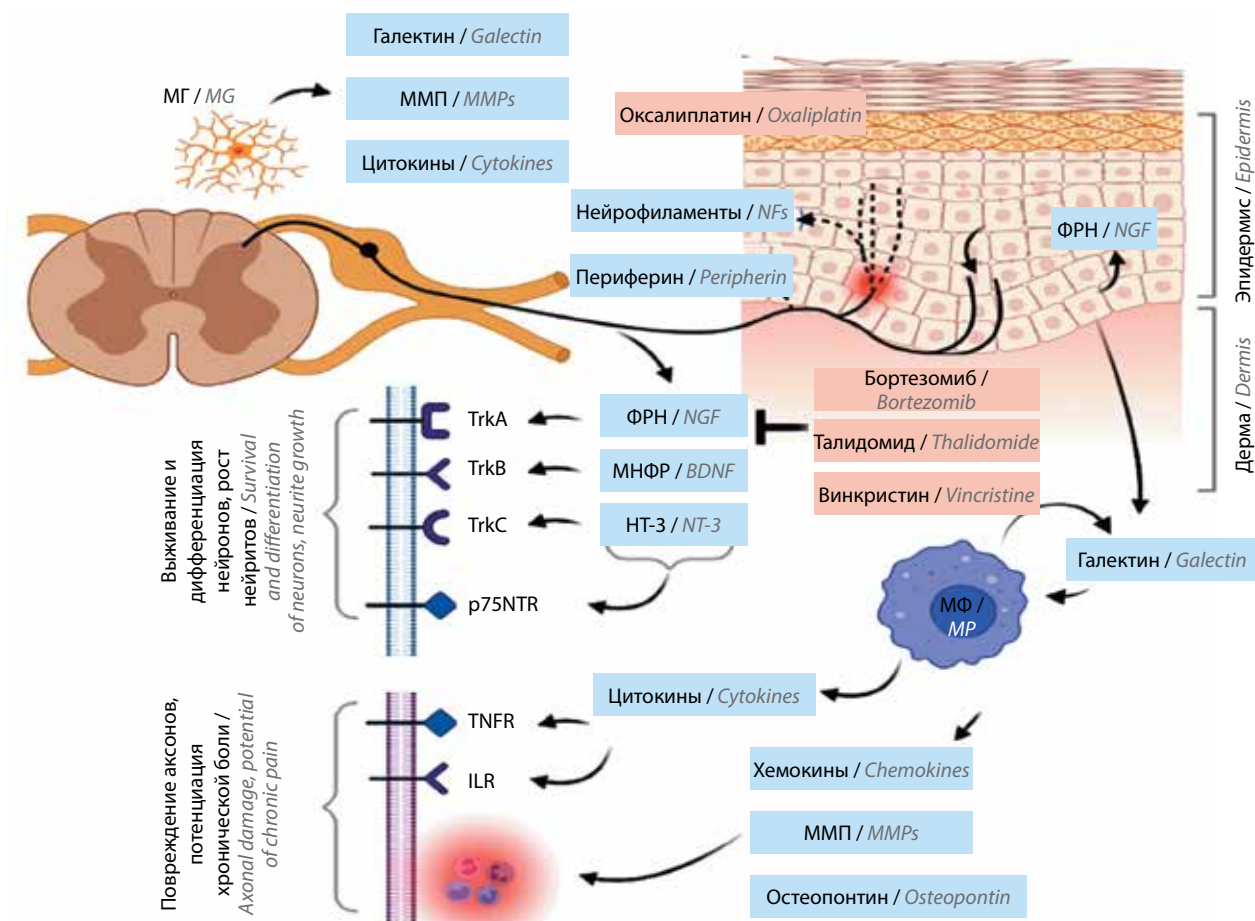


Рис. 1. Взаимодействие сывороточных маркеров при возникновении химиоиндуцированной полинейропатии: МНФР – мозговой нейротрофический фактор, ФРН – фактор роста нервов, НТ-3 – нейротрофин-3, МФ – макрофаг, МГ – микроглия, ММП – матричные металлопротеиназы, TrkA, TrkB, TrkC – экстраклеточные рецепторы нейротрофической тирозинкиназы, p75NTR – паннейротрофиновый рецептор-p75, TNF-α/TNFR – фактор некроза опухоли α и его рецептор, IL-1β – интерлейкин-1β, IL-6 – интерлейкин-6, ILRs – рецепторы интерлейкинов (обобщенно). Рисунок создан с помощью Biorender.com

Fig. 1. Interaction of serum markers in the occurrence of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: BDNF – brain-derived neurotrophic factor, NGF – nerve growth factor, NT-3 – neurotrophin-3, NFs-neurofilaments (summarized), MP – macrophage, MG – microglia, MMPs – matrix metalloproteinases, TrkA, TrkB, TrkC – extracellular neurotrophic tyrosine kinase receptors, p75NTR – panneurotrophin receptor-p75, TNF-α/TNFR – tumor necrosis factor-α and its receptor, IL-1α – interleukin-1β, IL-6 – interleukin-6, ILRs – interleukin receptors (summarized). Figure created with Biorender.com

Легкая цепь нейрофиламента

Повреждение аксонов приводит к высвобождению NFL в интерстициальную жидкость, и в образцах крови можно обнаружить повышенные его концентрации. В 2020 г. в Национальном онкологическом центре Кореи были впервые опубликованы клинические данные, свидетельствующие об увеличении уровня NFL при лечении оксалиплатином [10]. В исследовании показано, что у пациентов уровень NFL в сыворотке крови увеличивается во время ХТ через 3 и 6 мес, а затем снижается через 4–6 мес после завершения лечения. Более того, концентрация NFL была самой высокой у пациентов с более тяжелой нейропатией. Анализ ROC-кривой показал, что при пороговом значении 195 (пг/мл) NFL через 6 мес чувствительность и специфичность для ХИПН 3-й степени достигли 80 и 86,2 % соответственно [10]. В мар-

те 2022 г. в исследовании SICARO [11], в котором участвовали 72 пациента, было также показано увеличение концентрации NFL, связанное с тяжестью ХИПН у женщин, получавших паклитаксел. Среди участников было 35 пациенток с раком яичников и раком молочной железы (РМЖ), которые получали лечение паклитакселем/карбоплатином или только паклитакселем, 29 пациенток с РМЖ без ХТ и 8 – с доброкачественными опухолями без ХТ. ROC-анализ показал, что увеличение уровня NFL на +7,05 пг/мл при диагностике ХИПН обладает чувствительностью 86 % и специфичностью 87 % [11]. В августе 2022 г. Национальным онкологическим центром Кореи были опубликованы данные о повышении концентрации NFL у 48 пациенток с гинекологическим раком после 2–6 курсов ХТ на основе паклитаксела. После завершения лечения у пациентов с ХИПН 3-й степени

уровни NFL были выше (среднее значение: 506 пг/мл), чем у пациентов с оксалиплатининдуцированной полинейропатией 3-й степени в предыдущем исследовании 2020 г. (среднее значение: 373,4 пг/мл) [12].

Таким образом, авторы предполагают, что, вероятно, повреждение аксонов в миелинизированных волокнах большого калибра на фоне терапии таксанами приводит к более высоким уровням NFL в сыворотке крови у пациентов с ХИПН, чем у пациентов с применением платины, из-за большего присутствия NFL в волокнах большого калибра.

Данные результаты, полученные в клиническом исследовании, согласуются с ранее проведенными исследованиями на животных — крысах, где был обнаружен потенциал NFL как биомаркера ХИПН [13]. Стало известно, что период полувыведения NFL составляет от нескольких недель до 1 или 2 мес [14], поэтому нормализация уровня NFL через 6 мес после окончания ХТ может означать отсутствие дальнейшего прогрессирования нейроаксонального повреждения.

Периферин

Периферин представляет собой белок промежуточных филаментов III типа и экспрессируется в ДГ периферических нервов, вентральных мотонейронах и черепных нервах [15, 16]. В исследовании S. Keddie и соавт. [17] проведен высокочувствительный иммуноанализ с использованием технологии одиночных молекулярных массивов для определения концентрации периферина на основе Simoa. Результаты показали, что периферин может считаться специфическим биомаркером острого аксонального повреждения периферической нервной системы (ПНС), поскольку он в наибольшей степени обнаруживается в седалищном нерве и в меньшей мере — в лизатах тканей спинного мозга, но отсутствует в мозге и экстра-невральных тканях. Имеющиеся ограничения в использовании периферина в качестве биомаркера связаны с трудностями обнаружения его низких концентраций с помощью стандартных методов исследования.

Нейротрофические факторы (нейротрофины)

Нейротрофины в ПНС синтезируются в основном в ДГ и принадлежат к семейству трофических факторов, которые регулируют рост, восстановление и запрограммированную гибель нейронов [18]. Помимо своей роли в разных физиологических функциях, они модулируют центральную сенсibilизацию спинного мозга, которая лежит в основе поддержания нейропатической боли. На настоящий момент известно 4 нейротрофина: NGF, BDNF, NT-3 и NT-4/5. Они регулируют широкий спектр нервных функций,

взаимодействуя с паннейротрофиновым рецептором-р75 (p75NTR) и экстраклеточными рецепторами нейротрофической тирозинкиназы (TrkA, TrkB и TrkC). Механизм передачи сигналов NGF и BDNF через высокоаффинные TrkA и низкоаффинный рецепторы p75NTR лежит в основе нейропатической боли. Наиболее изученными являются NGF и BDNF [18, 19], но в последнее время пристальное внимание уделяется NT-3, который также участвует в патогенезе аксональной дегенерации [20]. Нейротрофические факторы, не обладая специфичностью при повреждении нервных волокон, играют значимую роль в механизмах реализации болевого синдрома при ХИПН, что перспективно в создании фармпрепаратов для коррекции болевого синдрома.

Фактор роста нервов

Фактор роста нервов (NGF) играет ключевую роль в функционировании сенсорных и симпатических нейронов ПНС через регуляцию синтеза нейротрансмиттеров, таких как норэпинефрин (нор-адреналин), и нейропептидов, например вещества Р (substance P, SP) и пептида, связанного с геном кальцитонина (calcitonin gene-related peptide, CGRP) в сенсорных и симпатических нейронах [21, 22].

NGF продуцируется любой тканью/органом, иннервируемой сенсорными и/или симпатическими волокнами, затем через специфические рецепторы на нервных окончаниях ретроградно транспортируется к телу нейрона, где он проявляет нейротрофическую активность (см. рис. 1).

Проспективное исследование 45 пациентов со злокачественными лимфопролиферативными заболеваниями, получавших бортезомиб, талидомид или винкристин, также показало значительное снижение NGF у участников с симптомами ХИПН, тогда как у участников без симптомов ХИПН не обнаружено изменений NGF ($\Delta\text{NGF} = -4,14 \pm 4,87$ пг/мл для группы ХИПН, $+2,52 \pm 8,39$ пг/мл — для группы без ХИПН; значение $p = 0,043$) [19]. В исследовании R. Velasco и соавт. выявлена взаимосвязь между нейропатической болью и уровнем NGF у пациентов с развившейся ХИПН [23]. Полученные данные показали, что у пациентов с болевой формой ХИПН наблюдался более высокий уровень NGF по сравнению с пациентами с безболевого или отсутствующей ХИПН ($8,7 \pm 11,9$ против $2,5 \pm 1,4$ пг/мл; $p = 0,016$). Несмотря на неспецифическое снижение уровня NGF при поражении как ПНС, так и ЦНС для пациентов с ХИПН, этот нейротрофический фактор может отражать степень нейротоксичности.

Нейротрофический фактор головного мозга

Нейротрофический фактор головного мозга — фактор роста нейронов, который имеет решающее

значение для выживания и восстановления нервных клеток. Он активно участвует в регуляции проноцептивной передачи сигналов при воспалительных и нейропатических болевых состояниях за счет взаимодействия с рецептором TrkB, активирует ионотропный рецептор глутамата, селективно связывающего N-метил-D-аспартат (NMDA), и блокирует механизм ингибирования котранспортера хлорида калия 2 (KCC2) и/или ГАМКергические ингибирующие сигнальные пути (см. рис. 1) [24]. Помимо нервной системы, BDNF также находится в сердце, скелетных мышцах, гладкомышечных клетках, клетках крови (тромбоциты, лимфоциты и моноциты) и легких, т. е. данный биомаркер не специфичен для заболеваний ПНС.

В исследовании А. Szudy-Szczyrek и соавт. [25] выявлена взаимосвязь ХИПН и снижения уровня BDNF у пациентов с множественной миеломой ($n = 91$), получавших бортезомиб или талидомид, где концентрация BDNF коррелировала с тяжестью полинейропатии ($p = 0,0463$). В исследовании D. Azoulay и соавт. [26] сделан вывод о том, что определение уровней белка BDNF перед началом ХТ может быть полезным инструментом для оценки риска ХИПН и модификации дозы препаратов.

Однако в исследовании S. Topyan и соавт. обнаружено, что уровень BDNF в сыворотке крови у больных РМЖ существенно не отличался от уровня этого биомаркера у здоровых добровольцев ($p = 0,33$) [27]. Полученные противоречивые данные об изменении концентрации BDNF, возможно, обусловлены разнородными группами пациентов и, соответственно, разными препаратами, применяемыми при их лечении, что требует дальнейших исследований.

Нейротрофин-3

Биологические эффекты NT-3 в основном реализуются посредством взаимодействия с высокоаффинным рецептором TrkC, экспрессируемым преимущественно на миелинизированных волокнах Аβ большого диаметра в ДГ и спинном мозге, а также на С-волокнах [28]; NT-3 способствует росту, выживанию и дифференциации существующих и новых сенсорных и симпатических нейронов аналогично NGF [29] (см. рис. 1). На доклинических моделях ранее обнаружен нейропротекторный и анальгетический эффект NT-3 при его применении как в острой фазе повреждения [30], так и при хронической компрессионной травме [31]. Ранее также было продемонстрировано участие NT-3 в регенерации нервов и восстановлении чувствительности на доклинических и клинических моделях [32, 33].

В исследовании S. Topyan и соавт. [27] обнаружено значимое повышение концентрации NT-3 в плазме крови пациентов с РМЖ и повреждением ПНС

после лучевой терапии и ХТ по сравнению с добровольцами ($p < 0,001$). Однако уровень NT-3 у пациентов с болевой формой ПНП был ниже, чем без болевого синдрома ($p = 0,026$). Это может означать, что его повышение характерно при повреждении ПНС, а истощение происходит при хронической боли. В исследовании X. Xu и соавт. [34] продемонстрировано участие NT-3 в регенерации периферических нервов после хронической денервации через активацию пути TrkC/ERK/c-Jun. Данный сигнальный путь был основным молекулярным механизмом усиления регенерации нервов после хронической денервации.

Галектин 3

Галектин 3 (ГАЛ-3) — небольшой белок, состоящий из 1 полипептидной цепи, член семейства β-галактозидсвязывающих лектинов [35]. В норме ГАЛ-3 принимает участие в процессах апоптоза, мешая апоптотическим белкам выполнять свои функции, а также участвует в процессе адгезии клеток и способен активировать макрофаги [35]. Экспрессия ГАЛ-3 повышается в микроглии при нейровоспалении [36]. В исследовании на доклинической модели в 2016 г. показана взаимосвязь ингибирования ГАЛ-3 с ослаблением нейропатической боли после повреждения периферических нервов (см. рис. 1) [37]. Результаты исследования М. Koyanagi и соавт. [38] на доклинической модели также продемонстрировали, что повышение уровня ГАЛ-3 в плазме крови связано с ХИПН. Однако в 2023 г. в исследовании у пациентов после лечения РМЖ не выявлено достоверных различий уровня ГАЛ-3 у больных ХИПН и группы контроля [27], что может быть ограничено выборкой пациентов и требует дальнейшего изучения.

Хемокины и цитокины

Экспериментальные исследования показали, что во время ХТ происходит инфильтрация нерва моноцитами/макрофагами, которые высвобождают провоспалительные цитокины, такие как TNF-α, IL-1β и IL-6, а также различные хемокины (CX3, CL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 и CXCL8) и другие медиаторы воспаления (брадикинин, простагландины и оксид азота), что приводит к сенсibilизации ноцицепторов и их волокон при периферической нейропатической боли (см. рис. 1) [39–41].

Активация и инициация провоспалительных цитокинов также происходит за счет увеличения секреции ММП, вследствие воздействия химических агентов, ММП продуцируются нейронами и сателлитными клетками в ДГ, они способны разрушать гемато-невральный барьер и миелин, а также поддерживают миграцию макрофагов и воспаление, что приводит к инициации и сохранению стойкого болевого синдрома [42].

Цитокины продуцируются не только иммунными клетками, но и глиальными, а также нейрональными. Значительное увеличение концентрации IL-1 β , IL-6 и TNF- α было зарегистрировано в нейронах ДГ после ХТ. Так, повреждение тонких А δ и С-волокон, вероятно, связывают с воздействием цитокинов, а именно IL-1 β , 6, 8 и TNF- α , но это остается до конца не изученным [41]. Увеличение экспрессии и высвобождение цитокинов может быть также связано с экспрессией хемокинов.

Хемокины играют важную роль в активации и инфильтрации макрофагов и глиальных клеток при возникновении нейропатической боли. Результаты исследований показывают, что уровень CCL2 коррелирует со степенью гипералгезии, наблюдаемой у крыс [42]. Понимание роли хемокинов, цитокинов и МПП в развитии ХИПН привело к разработке лечебных стратегий. Введение нейтрализующих антител к IL-1 β и TNF- α блокировало аллодинию, вызванную инъекциями ММП-2 и ММП-9 [43], а введение миноциклина — ингибитора ММП — может стать многообещающим методом в профилактике болевой нейропатии [44, 45].

Остеопонтин

Остеопонтин — это белок внеклеточного матрикса, участвующий в воспалении и прогрессировании рака [46], он также представляет собой новый биомаркер риска ХИПН, что было выявлено в 2020 г. у пациентов с РМЖ, получающих таксаны [47]. Остеопонтин активирует лейкоциты, стимулируя миграцию, накопление и удержание макрофагов в местах повреждения, модулирует выработку цитокинов [48] и индуцирует экспрессию ММП, в частности ММП-2 и ММП-9, которые участвуют в деградации матрикса, миграции клеток и ремоделировании тканей, что, в свою очередь, ведет к поддержанию боли.

Описанные биомаркеры предлагают нам новый подход к объективному выявлению и прогнозированию риска развития ХИПН у пациентов, а также дополняют наше представление о патогенезе и разработке лечебных подходов. Хотя количество исследований в этом направлении увеличилось за по-

следнее десятилетие, биомаркеры все еще не являются частью рутинной клинической практики. По имеющимся представлениям, снижение уровня NGF, по-видимому, коррелирует с тяжестью нейротоксичности, остеопонтин прогнозирует риск, а сывороточные NFL и NT-3 могут быть подходящими биомаркерами для мониторинга пациентов с ХИПН. Периферин требует дальнейшего изучения и проведения исследований, особенно в качестве специфического маркера поражения ПНС. Цитокины, хемокины, их рецепторы и сигнальные пути, участвующие в развитии болевой периферической нейропатии, вызванной ХТ, могут расширить наше представление о ХИПН. Все сказанное может привести к разработке эффективных стратегий по профилактике и/или лечению ХИПН. В этом направлении в последнее время активно ведутся исследования [49]. Концентрации BDNF и GAL-3 в крови у пациентов с ХИПН дали противоречивые результаты. Скорее всего, это связано с ненадежностью доклинических моделей, поскольку перенос результатов экспериментальных исследований в клиническую практику не всегда соответствует ожидаемому результату. Основным ограничением применения данных маркеров может служить их неспецифичность при развитии ХИПН. Одна из ключевых неудач — невозможность отличить дегенерацию клеток центральной нервной системы от ПНС. Тем не менее эти белковые молекулы эффективны при выявлении пациентов с периферической нейропатией, и их оценка важна до применения ХТ и в процессе лечения.

Заключение

Сывороточные белки являются легкодоступными биомаркерами для использования не только в исследовательских целях, но и для применения в рутинной практике, позволяя прогнозировать и оценивать риски развития и тяжесть нейротоксичности у пациентов, получающих ХТ, а также они могут быть одним из инструментов для принятия решения о модификации дозы препарата, минимизации последствий и улучшения качества жизни онкологических пациентов.

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

1. Zedan A.H., Vilholm O.J. Chemotherapy-induced polyneuropathy: major agents and assessment by questionnaires. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2014;115(2):193–200. DOI:10.1111/bcpt.12262
2. Seretny M., Currie G.L., Sena E.S. et al. Incidence, prevalence, and predictors of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: A systematic review and meta-analysis. *Pain* 2014;155(12):2461–70. DOI: 10.1016/j.pain.2014.09.020
3. Cavaletti G., Alberti P., Frigeni B. et al. Chemotherapy-induced neuropathy. *Curr Treat Options Neurol* 2011;13(2):180–90. DOI:10.1007/s11940-010-0108-3
4. Choi J., Kong K., Mozaffar T., Holcombe R.F. Delayed oxaliplatin-associated neurotoxicity following adjuvant chemotherapy for stage III colon cancer. *Anticancer Drugs* 2006;17(1):103–5. DOI: 10.1097/01.cad.0000185185.64980.70
5. Quasthoff S., Hartung H.P. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *J Neurol* 2002;249(1):9–17. DOI: 10.1007/pl00007853
6. Colvin L.A. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN): where are we now? *Pain* 2019;160:S1. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001540
7. Loprinzi C.L., Lacchetti C., Bleeker J. et al. Prevention and management of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in survivors of adult cancers: ASCO Guideline Update. *J Clin Oncol* 2020;38(28):3325–48. DOI:10.1200/JCO.20.01399
8. Hertz D.L., Childs D.S., Park S.B. et al. Patient-centric decision framework for treatment alterations in patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Cancer Treat Rev* 2021;99:102241. DOI: 10.1016/j.ctrv.2021.102241
9. Delaby C., Alcolea D., Carmona-Iragui M. et al. Differential levels of neurofilament light protein in cerebrospinal fluid in patients with a wide range of neurodegenerative disorders. *Sci Rep* 2020;10(1):9161. DOI: 10.1038/s41598-020-66090-x
10. Kim S.-H., Choi M.K., Park N.Y. et al. Serum neurofilament light chain levels as a biomarker of neuroaxonal injury and severity of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy. *Sci Rep* 2020;10(1):7995. DOI:10.1038/s41598-020-64511-5
11. Huehnchen P., Schinke C., Bangemann N. et al. Neurofilament proteins as a potential biomarker in chemotherapy-induced polyneuropathy. *JCI Insight* 2022;7(6):e154395. DOI: 10.1172/jci.insight.154395
12. Kim S.H., Kim K.H., Hyun J.W. et al. Blood neurofilament light chain as a biomarker for monitoring and predicting paclitaxel-induced peripheral neuropathy in patients with gynecological cancers. *Front Oncol* 2022;12:942960. DOI: 10.3389/fonc.2022.942960
13. Meregalli C., Fumagalli G., Alberti P. et al. Neurofilament light chain: a specific serum biomarker of axonal damage severity in rat models of chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Arch Toxicol* 2020;94(7):2517–22. DOI:10.1007/s00204-020-02755-w
14. Burgess B.L., Cho E., Honigberg L. Neurofilament light as a predictive biomarker of unresolved chemotherapy-induced peripheral neuropathy in subjects receiving paclitaxel and carboplatin. *Sci Rep* 2022;12(1):15593. DOI: 10.1038/s41598-022-18716-5
15. Romano R., Del Fiore V.S., Bucci C. Role of the intermediate filament protein peripherin in health and disease. *Int J Mol Sci* 2022;23(23):15416. DOI:10.3390/ijms232315416
16. Yuan A., Sasaki T., Kumar A. et al. Peripherin is a subunit of peripheral nerve neurofilaments: implications for differential vulnerability of CNS and peripheral nervous system axons. *J Neurosci* 2012;32(25):8501–8. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1081-12.2012
17. Keddle S., Smyth D., Keh R.Y.S. et al. Peripherin is a biomarker of axonal damage in peripheral nervous system disease. *Brain* 2023;146(11):4562–73. DOI:10.1093/brain/awad234
18. Meregalli C., Bonomo R., Cavaletti G., Carozzi V.A. Blood molecular biomarkers for chemotherapy-induced peripheral neuropathy: from preclinical models to clinical practice. *Neurosci Lett* 2021;749:135739. DOI: 10.1016/j.neulet.2021.135739
19. Youk J., Kim Y.S., Lim J.A. et al. Depletion of nerve growth factor in chemotherapy-induced peripheral neuropathy associated with hematologic malignancies. *PLoS One* 2017;12(8):e0183491. DOI: 10.1371/journal.pone.0183491
20. Omar N.A., Kumar J., Teoh S.L. Neurotrophin-3 and neurotrophin-4: The unsung heroes that lies behind the meninges. *Neuropeptides* 2022;92:102226. DOI: 10.1016/j.npep.2022.102226
21. Aloe L., Rocco ML, Bianchi P, Manni L. Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use. *J Transl Med* 2012;10:239. DOI: 10.1186/1479-5876-10-239
22. De Santis S., Pace A., Bove L. et al. Patients treated with antitumor drugs displaying neurological deficits are characterized by a low circulating level of nerve growth factor. *Clin Cancer Res* 2000;6(1):90–5. PMID: 10656436
23. Velasco R., Navarro X., Gil-Gil M. et al. Neuropathic pain and nerve growth factor in chemotherapy-induced peripheral neuropathy: prospective clinical-pathological study. *J Pain Symptom Manage* 2017;54(6):815–25. DOI: 10.1016/j.jpainsymman.2017.04.021
24. Wang X., Ratnam J., Zou B. et al. TrkB signaling is required for both the induction and maintenance of tissue and nerve injury-induced persistent pain. *J Neurosci* 2009;29(17):5508–15. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4288-08.2009
25. Szudy-Szczyrek A., Mlak R., Bury-Kamińska M. et al. Serum brain-derived neurotrophic factor (BDNF) concentration predicts polyneuropathy and overall survival in multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2020;191(1):77–89. DOI: 10.1111/bjh.16862
26. Azoulay D., Giryes S., Nasser R. et al. Prediction of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in patients with lymphoma and myeloma: the roles of brain-derived neurotrophic factor protein levels and A gene polymorphism. *J Clin Neurol* 2019;15(4):511–6. DOI: 10.3988/jcn.2019.15.4.511
27. Tonyan S., Pospelova M., Krasnikova V. et al. Neurotrophin-3 (NT-3) as a potential biomarker of the peripheral nervous system damage following breast cancer treatment. *Pathophysiology* 2023;30(2):110–22. DOI: 10.3390/pathophysiology30020010
28. Wilson-Gerwing T.D., Dmyterko M.V., Zochodne D.W. et al. Neurotrophin-3 suppresses thermal hyperalgesia associated with neuropathic pain and attenuates transient receptor potential vanilloid receptor-1 expression in adult sensory neurons. *J Neurosci* 2005;25(3):758–67. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3909-04.2005
29. Hernández-Echeagaray E. Neurotrophin-3 modulates synaptic transmission. *Vitam Horm* 2020;114:71–89. DOI: 10.1016/bs.vh.2020.04.008
30. Gandhi R., Ryals J.M., Wright D.E. Neurotrophin-3 reverses chronic mechanical hyperalgesia induced by intramuscular acid injection. *J Neurosci* 2004;24(42):9405–13. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0899-04.2004
31. Wilson-Gerwing T.D., Stucky C.L., McComb G.W., Verge V.M. Neurotrophin-3 significantly reduces sodium channel expression linked to neuropathic pain states. *Exp Neurol* 2008;213(2):303–14. DOI: 10.1016/j.expneurol.2008.06.002
32. Sahenk Z., Nagaraja H.N., McCracken B.S. et al. NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients. *Neurology* 2005;65(5):681–9. DOI: 10.1212/01.wnl.0000171978.70849.c5

33. Chaudhry V., Giuliani M., Petty B.G. et al. Tolerability of recombinant-methionyl human neurotrophin-3 (r-metHuNT3) in healthy subjects. *Muscle Nerve* 2000;23(2):189–92. DOI: 10.1002/(sici)1097-4598(200002)23:2<189:aid-mus7>3.0.co;2-8
34. Xu X., Song L., Li Y. et al. Neurotrophin-3 promotes peripheral nerve regeneration by maintaining a repair state of Schwann cells after chronic denervation *via* the TrkC/ERK/c-Jun pathway. *J Transl Med* 2023;21(1):733. DOI:10.1186/s12967-023-04609-2
35. Srejavic I., Selakovic D., Jovicic N. et al. Galectin-3: roles in neurodevelopment, neuroinflammation, and behavior. *Biomolecules* 2020;10(5):798. DOI:10.3390/biom10050798
36. Burguillos M.A., Svensson M., Schulte T. et al. Microglia-secreted galectin-3 acts as a toll-like receptor 4 ligand and contributes to microglial activation. *Cell Rep* 2015;10(9):1626–38. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.02.012
37. Ma Z., Han Q., Wang X. et al. Galectin-3 inhibition is associated with neuropathic pain attenuation after peripheral nerve injury. *PLoS One* 2016;11(2):e0148792. DOI: 10.1371/journal.pone.0148792
38. Koyanagi M., Imai S., Matsumoto M. et al. Pronociceptive roles of Schwann cell-derived galectin-3 in taxane-induced peripheral neuropathy. *Cancer Res* 2021;81(8):2207–19. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-20-2799
39. Sommer C., Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett* 2004;361(1-3):184–7. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.12.007
40. Tofaris G.K., Patterson P.H., Jessen K.R., Mirsky R. Denervated Schwann cells attract macrophages by secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) and monocyte chemoattractant protein-1 in a process regulated by interleukin-6 and LIF. *J Neurosci* 2002;22(15):6696–703. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06696.2002
41. Wang X.M., Lehty T.J. Discovering cytokines as targets for chemotherapy-induced painful peripheral neuropathy. *Cytokine* 2012;59(1):3–9. DOI: 10.1016/j.cyto.2012.03.027
42. Illias A.M., Gist A.C., Zhang H. et al. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in the dorsal root ganglion contribute to oxaliplatin-induced mechanical hypersensitivity. *Pain* 2018;159(7):1308–16. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001212
43. Schäfers M., Brinkhoff J., Neukirchen S. et al. Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor- α and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett* 2001;310(2-3):113–6. DOI: 10.1016/s0304-3940(01)02077-8
44. Liu C.C., Lu N., Cui Y. et al. Prevention of paclitaxel-induced allodynia by minocycline: effect on loss of peripheral nerve fibers and infiltration of macrophages in rats. *Mol Pain* 2010;6:76. DOI: 10.1016/s0304-3940(01)02077-8
45. Boyette-Davis J., Dougherty P.M. Protection against oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and intraepidermal nerve fiber loss by minocycline. *Exp Neurol* 2011;229(2):353–7. DOI: 10.1016/j.expneurol.2011.02.019
46. Castello L.M., Raineri D., Salmi L. et al. Osteopontin at the crossroads of inflammation and tumor progression. *Mediators Inflamm* 2017;2017:4049098. DOI: 10.1155/2017/4049098
47. Pizzamiglio C., Ripellino P., Prandi P. et al. Nerve conduction, circulating osteopontin and taxane-induced neuropathy in breast cancer patients. *Neurophysiol Clin* 2020;50(1):47–54. DOI: 10.1016/j.neucli.2019.12.001
48. Lund S.A., Wilson C.L., Raines E.W. et al. Osteopontin mediates macrophage chemotaxis *via* $\alpha 4$ and $\alpha 9$ integrins and survival *via* the $\alpha 4$ integrin. *J Cell Biochem* 2013;114(5):1194–202. DOI:10.1002/jcb.24462
49. Hu S., Huang K.M., Adams E.J. et al. Recent developments of novel pharmacologic therapeutics for prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Clin Cancer Res* 2019;25(21):6295–301. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-2152

Вклад авторов

О.А. Тихонова: разработка концепции и дизайна обзора, написание и редактирование текста статьи;
 Е.С. Дружинина: анализ данных литературы, экспертный анализ текста статьи;
 О.П. Тучина: редактирование статьи, оформление рисунка;
 Д.С. Дружинин, С.А. Докторова: сбор и анализ данных литературы, редактирование статьи.

Author's contribution

O.A. Tikhonova: development of the concept and design of the review, writing and editing the text of the article;
 E.C. Druzhinina: analysis of literature data, final expertize of the text;
 O.P. Tuchina: editing of the article, design of the figure;
 D.S. Druzhinin, S.A. Doktorova: collection and analysis of literature data, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

О.А. Тихонова / O.A. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-1796-0193>
 Е.С. Дружинина / E.C. Druzhinina: <https://orcid.org/0000-0002-1004-992X>
 О.П. Тучина / O.P. Tuchina: <https://orcid.org/0000-0003-1480-1311>
 Д.С. Дружинин / D.S. Druzhinin: <https://orcid.org/0000-0002-6244-0867>
 С.А. Докторова / S.A. Doktorova: <https://orcid.org/0000-0001-5858-7877>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Данная работа была поддержана из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. И. Канта.

Funding. This his work was supported from the Russian Federal Academic Leadership Program “Priority 2030” at the Immanuel Kant Baltic Federal University.

Статья поступила: 30.11.2023. **Принята в печать:** 15.08.2024. **Опубликована онлайн:** 00.00.2024.

Article received: 30.11.2023. **Accepted for publication:** 15.08.2024. **Published online:** 00.00.2024.

Использование средств искусственного интеллекта для молекулярного анализа профилей сенсibilизации у больных atopическим дерматитом и бронхиальной астмой

Д.С. Фомина¹⁻³, М.С. Лебекина¹, Е.А. Никитина^{1,2}, А.Д. Душкин^{1,4}, А.А. Чернов¹, Ю.Д. Юхновская², И.В. Евсегнеева², А.В. Караулов², М.А. Лысенко^{1,5}

¹ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница № 52 Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 123182 Москва, ул. Пехотная, 3;

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³НАО «Медицинский университет Астана»; Республика Казахстан, 010000 Астана, ул. Бейбитшилик, 49 а;

⁴ГБУЗ г. Москвы «Московская городская онкологическая больница № 62 Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 143515 Московская обл., городской округ Красногорск, пос. Истра, 27;

⁵ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России; Россия, 117513 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Марина Сергеевна Лебекина marina.ivanova0808@yandex.ru

Введение. В настоящее время обсуждается многообразие характеристик, которые должны учитываться при клиническом фенотипировании аллергических заболеваний. Одной из характеристик является спектр сенсibilизации. Важным этапом стало внедрение алергокомпонентов для выявления опосредованной реакции к специфическим иммуноглобулинам класса E.

Цель исследования – определить доминирующие фенотипы сенсibilизации у пациентов с тяжелыми atopическим дерматитом и бронхиальной астмой на основе результатов молекулярной диагностики методом ImmunoCAP Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC) с использованием машинного обучения.

Материалы и методы. В исследование включены 100 пациентов, являющихся кандидатами для проведения генно-инженерной биологической терапии по поводу тяжелых бронхиальной астмы ($n = 63$), atopического дерматита ($n = 20$), сочетания заболеваний ($n = 17$). Аллергодиагностику проводили методом ImmunoCAP ISAC.

Результаты. По результатам исследования выделено 6 фенотипов. В 1-м фенотипе лидирующее место занимают пыльцевые молекулы (Amb a1, Phl p4) и перекрестные пищевые молекулы (Mal d1, Ara h8, Gly m4, Act d8, Pru p3), среди эпидермальных молекул встречается Fel d1, среди грибковых – Asp f6. Для 2-го фенотипа характерны грибковые (Asp f6), эпидермальные (Can f1, Can f5, Can f6, Fel d1), пищевые (Gad c1) и перекрестные пищевые молекулы (Mal d1, Pru p1, Ara h8, Cor a1.0401). В 3-м фенотипе отмечается сочетание ранее обозначенных молекул. В 4-м фенотипе обнаружены 3 группы алергенов: эпидермальные (Fel d1, Fel d2, Can f5, Can f6, Can f3), грибковые (Asp f6) и перекрестной пищевой аллергии (Jug r3, Pru p3). В 5-м и 6-м фенотипах преобладают эпидермальные молекулы (Can f1 и Fel d1), алергены истинной пищевой аллергии (Gad c1 и Gal d1 и Gad c1, Gal d1, Gal d3 соответственно).

Заключение. Выявленные молекулы могут быть использованы в клинической практике с целью разработки усеченных панелей алергочипов, что сделает их доступнее.

Ключевые слова: бронхиальная астма, atopический дерматит, фенотипирование, молекулярная диагностика, ISAC ImmunoCAP, машинное обучение

Для цитирования: Фомина Д.С., Лебекина М.С., Никитина Е.А. и др. Использование средств искусственного интеллекта для молекулярного анализа профилей сенсibilизации у больных atopическим дерматитом и бронхиальной астмой. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):26–39.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-26-39>

Artificial intelligence tools for molecular analysis of sensitization profiles in patients with atopic dermatitis and bronchial asthma

Daria S. Fomina¹⁻³, Marina S. Lebedkina¹, Ekaterina A. Nikitina^{1,2}, Alexander D. Dushkin^{1,4}, Anton A. Chernov¹, Yulia D. Yukhnovskaya², Irina V. Evsegneeva², Alexander V. Karaulov², Mariana A. Lysenko^{1,5}

¹City Clinical Hospital No. 52, Moscow Healthcare Department; 3 Pekhotnaya St., Moscow 123182, Russia;

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia; Bld. 8, 2 Trubetskaya St., Moscow 119048, Russia;

³Astana Medical University; 49a Beybitshilik St., Astana 010000, Kazakhstan;

⁴Moscow City Oncology Hospital No. 62, Moscow Healthcare Department; 27 Istra, Krasnogorsk city district, Moscow region 143515, Russia;

⁵N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1A Ostrovityanova St., Moscow 117513, Russia

Contacts: Marina Sergeevna Lebedkina marina.ivanova0808@yandex.ru

Background. The variety of characteristics that should be taken into account in the clinical phenotyping of allergic diseases is currently being discussed. One of such characteristics is the individual spectrum of sensitization. An important stage in modern allergology has become the introduction of molecules/components for the detection of mediated reactions to specific class E immunoglobulins.

Aim. To determine the dominant phenotypes of sensitization in patients with severe atopic dermatitis and bronchial asthma based on the results of molecular diagnostics by the ImmunoCAP Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC) method using machine learning.

Materials and methods. The study included 100 patients who were candidates for genetically engineered biological therapy ($n = 63$), severe atopic dermatitis ($n = 20$), or their combination ($n = 17$) were included. Allergodiagnosis was performed by the ImmunoCAP ISAC method.

Results. Based on the results of the study, 6 phenotypes were identified. In phenotype 1, pollen molecules (Amb a1, Phl p4) and crossed reactive food molecules (Mal d1, Ara h8, Gly m4, Act d8, Pru p3) are the leading, among epidermal molecules only Fel d1 (epidermal allergen) and Asp f6 (fungal allergen) are found. For phenotype 2, the significant allergens were fungal (Asp f6), epidermal (Can f1, Can f5, Can f6, Fel d1), food (Gad c1) and cross reactive food molecules (Mal d1, Pru p1, Ara h8, Cor a1.0401). In phenotype 4, only 3 allergen groups are present: epidermal (Fel d1, Fel d2, Can f5, Can f6, Can f3), fungal (Asp f6), and cross food allergy (Jug r3, Pru p3). Phenotype 5 and 6 are dominated by epidermal molecules (Can f1 and Fel d1), true food allergies allergens (Gad c1 and Gal d1 and Gad c1, Gal d1, Gal d3, respectively). In phenotype 3, a combination of the previously labeled molecules is noted.

Conclusion. Each of the identified phenotypes reveals a different set of molecules that can be used in real clinical practice to develop reduced panels, making them more accessible.

Keywords: bronchial asthma, atopic dermatitis, component resolved diagnostic, ISAC ImmunoCAP

For citation: Fomina D.S., Lebedkina M.S., Nikitina E.A. et al. Artificial intelligence tools for molecular analysis of sensitization profiles in patients with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):26–39.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-26-39>

Введение

Одной из основных задач современной медицины является реализация индивидуального подхода в диагностических и лечебных алгоритмах, что продиктовано актуальностью внедрения канонов персонализированной медицины. Это концепция, согласно которой уникальные характеристики каждого пациента могут быть использованы для обеспечения применения только тех методов лечения, которые с наибольшей вероятностью будут эффективны для данного конкретного человека. Таким образом, пациент получает правильное лечение в нужное время, чтобы максимизировать эффективность терапии и минимизировать риски, заболеваемость, смертность и стоимость для здравоохранения [1, 2]. Фенотипирование

пациентов с аллергическими заболеваниями невозможно без определения точного спектра сенсibilизации, что становится возможным с использованием результатов инновационных подходов применения молекулярной компонентной аллергодиагностики. Данные подходы – новое поколение радиоаллергосорбентного тестирования, полностью удовлетворяющего требованиям персонализированного подхода к диагностике аллергических заболеваний [3]. Мультиплексный анализ (ImmunoCAP Immuno Solid-phase Allergen Chip (ISAC)) представляет собой фиксированный набор из 112 рекомбинантных или очищенных нативных компонентов аллергенов, полученных из более чем 50 источников [4]. Молекулярная диагностика имеет ряд бесспорных преимуществ, повышая

ее точность, помогая отделить истинную сенсibilизацию от перекрестной, уточняя спектр необходимых элиминационных мероприятий и диеты в рамках лечебного алгоритма [5]. Особенно важно корректное описание спектра сенсibilизации при тяжелых формах аллергических заболеваний, таких как тяжелый атопический дерматит (ТАТД) и тяжелая атопическая бронхиальная астма (ТБА). Именно при наличии критериев тяжелого течения заболевания имеются ограничения для проведения диагностики *in vivo*, а использование показателей специфических иммуноглобулинов класса Е к неинфекционным аллергенам может служить биологическим маркером не только на этапе диагностики, но и лечения. В связи с этим в качестве метода выбора может быть использована современная молекулярная компонентная аллергодиагностика. Разработка индивидуальных протоколов ведения пациентов с учетом уникального спектра сенсibilизации, возможно, опосредованно позволит снизить бремя тяжелых форм заболеваний.

Цель исследования — определить доминирующие фенотипы сенсibilизации у пациентов с ТАТД и ТБА на основе результатов молекулярной диагностики методом ISAC ImmunoCAP с использованием машинного обучения.

Материалы и методы

Дизайн исследования. Одноцентровое проспективное исследование.

Критерии соответствия

Критерии включения:

- пациенты от 18 лет;
- пациенты, являющиеся кандидатами на назначение генно-инженерной биологической терапии с подтвержденным ранее атопическим фенотипом ТБА, ТАТД или сочетанием данных заболеваний;
- наличие ТБА неконтролируемого течения, несмотря на соблюдение максимально оптимизированного лечения [6];
- наличие ТАТД с распространенным или диффузным характером поражения кожных покровов, текущего с длительными обострениями, редкими и непродолжительными периодами ремиссии (частота обострений — 5 раз в год и более, длительность ремиссии 1–1,5 мес) [7];
- для формирования 3-й группы — наличие сочетания ТБА и ТАТД.

Критерии не включения:

- отсутствие сенсibilизации при ранее проведенной верификации диагноза;
- легкая/среднетяжелая БА как основное заболевание;
- легкий/среднетяжелый АтД как основное заболевание.

Условия проведения. Исследование проводили на базе специализированного референс-центра г. Москвы.

Продолжительность исследования. Исследование проведено с апреля по август 2023 г.

Описание медицинского вмешательства. Проанализированы данные истории болезни 100 пациентов, являющихся кандидатами для проведения генно-инженерной биологической терапии по поводу ТБА ($n = 63$) — 1-я группа, ТАТД ($n = 20$) — 2-я группа или их сочетания ($n = 17$) — 3-я группа. Анализ спектра сенсibilизации производили с помощью аллергочипа ImmunoCAP ISAC. Данный анализ был выполнен пациентами амбулаторно в добровольном порядке с предоставлением результатов исследования. Ход исследования представлен на рис. 1.

Методы регистрации исходов. При проведении молекулярной диагностики проводили оценку статистической значимости различных компонентов аллергенов категориальным способом. При выявлении уровня аллергокомпонента в сыворотке выше 0,3 ISU-E регистрировали наличие сенсibilизации, ниже 0,3 ISU-E — ее отсутствие.

Статистический анализ. Балансировку данных проводили с использованием метода синтетического увеличения числа миноритарного класса. Итоговый набор данных содержал 189 наблюдений (табл. 1).

Таблица 1. Результат работы метода синтетического увеличения числа миноритарного класса

Table 1. The result of the synthetic minority over-sampling technique method

Группа Group	Число пациентов Number of patients		Прирост синтетических данных, % Increase in synthetic data, %
	исходное initial	итоговое final	
1-я 1 st	63	63	0
2-я 2 nd	20	63	+68,25
3-я 3 rd	17	63	+73,02

Фенотипирование пациентов произведено с использованием алгоритмов работы искусственного интеллекта. В основе разделения пациентов на фенотипы лежала агломеративная кластеризация (agglomerative clustering) [8]. Последняя проста в реализации: она строит иерархию кластеров, что позволяет анализировать данные на разных уровнях детализации, а количество кластеров определяется в процессе анализа иерархической структуры. В данном исследовании использовали интерпретатор

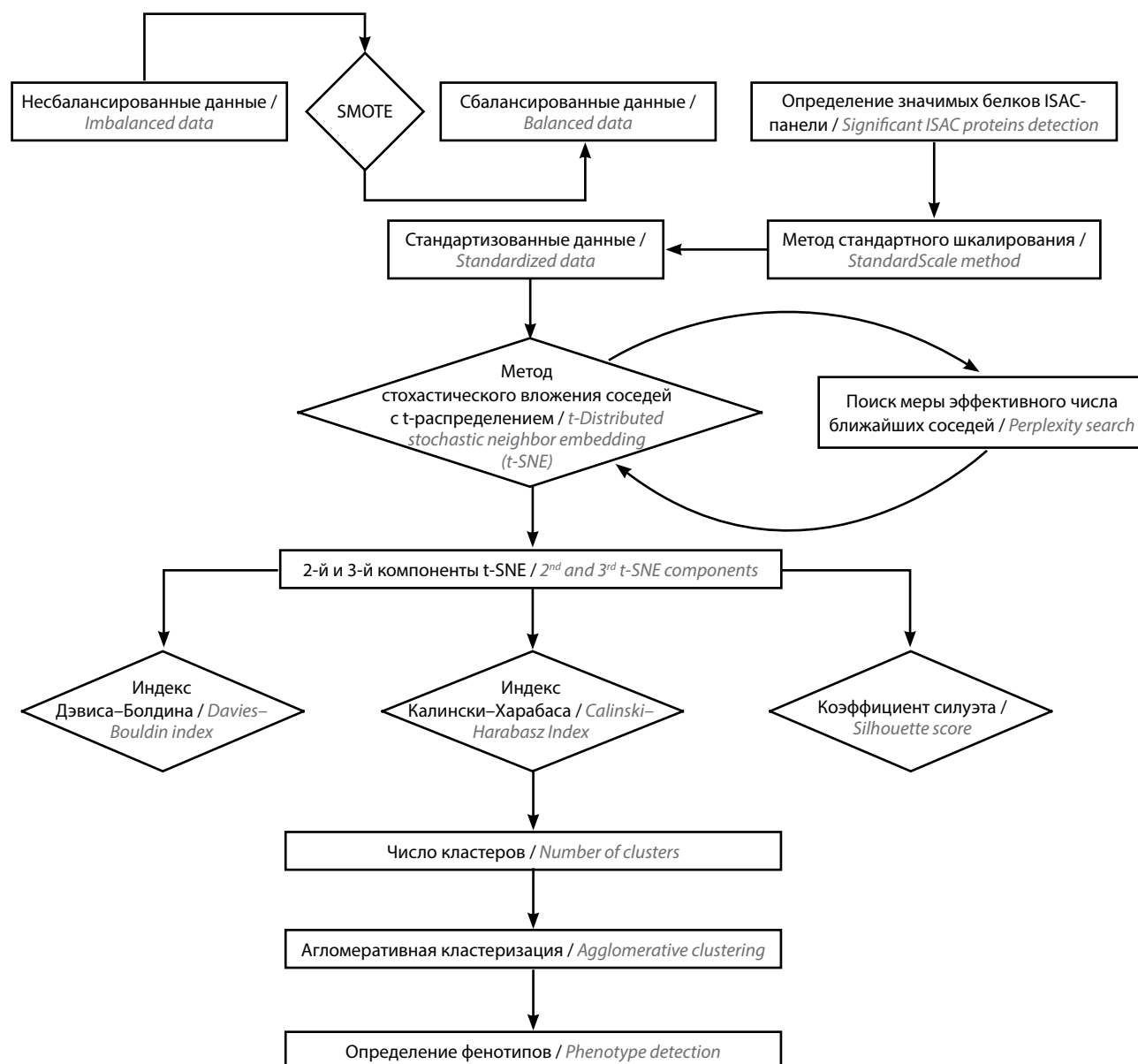


Рис. 1. Схема исследования

Fig. 1. Study design

Visual Studio Code v.1.76.1 (Universal) и язык программирования Python v.3.10. При первичной обработке данных применяли пакеты для статистической обработки (SciPy, NumPy, Pandas, Sklearn) и визуализации (Matplotlib, Seaborn, Plotly). Сбор и хранение данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft (пакет Excel v.16.75).

Для описания количественных признаков, подчиняющихся нормальному распределению, использовали среднее значение (M), стандартное отклонение (SD) и 95 % доверительный интервал (CI 95 %). При распределении, отличном от нормального, использовали медиану (Me) и значения межквартильного интервала (Q_{1-3}) квартилей. Категориальные признаки описыва-

ли с использованием процентных долей. Для оценки статистической значимости различий между категориальными признаками использовали критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса. Для оценки статистической значимости количественных признаков между группами при отличном от нормального распределения в данных применяли критерий Краскела–Уоллиса. Для оценки значимости различий между конкретными группами использовали тест Данна.

Корреляционный анализ признаков проводился с использованием построения тепловой карты корреляционной матрицы. Для оценки силы корреляционной связи применяли коэффициент корреляции Спирмена (r_s).

Уровень статистической значимости (p) был установлен 5 % (0,05).

Сравнение уровня белка-аллергена проводили на основе его доли относительно группы белков-аллергенов по формуле (1)

$$\text{Доля белка-аллергена} = \frac{ISU(\text{белка-аллергена})}{\sum ISU(\text{группы белков-аллергенов})} \quad (1)$$

где ISU (белка-аллергена) – ISAC standardised units IgE белка-аллергена; $\sum ISU$ – сумма из всей группы белков-аллергенов.

Стандартизацию данных для лучшей работы машинного обучения (ML) проводили методом стандартного шкалирования (StandardScale) по формуле (2)

$$X_{\text{stand}} = \frac{X - \text{Mean}(X)}{SD(X)}, \quad (2)$$

где X_{stand} – масштабированное значение доли белка-аллергена; X – доля белка-аллергена по формуле (1); $\text{Mean}(X)$ – среднее арифметическое доли белка-аллергена во всей выборке; $SD(X)$ – стандартное

отклонение значений доли белка-аллергена во всей выборке.

Оценку оптимальных значений гиперпараметров для снижения размерности данных при агломеративной кластеризации проводили с использованием значения дивергенции Кульбака–Лейблера (КЛ). Понижение размерности данных проводили при помощи метода стохастического вложения соседей с t -распределением (t-SNE). Основным гиперпараметром для t-SNE является perplexity (мера эффективного числа ближайших соседей).

Определение оптимального числа кластеров при фенотипировании пациентов проводили с использованием коэффициента силуэта (КС), индекса Дэвиса–Болдина (индекс ДБ), индекса Калински–Харабаса (индекс КХ). Оптимальное число кластеров считали при достижении целевых значений 2–3 из 3 метрик. При поиске оптимального числа кластеров целевыми значениями являются максимальные значения КС, индекса КХ и минимальное значение индекса ДБ.

Для воспроизводимости экспериментов машинного обучения во всех методах использовали параметр `random_state = 42`.

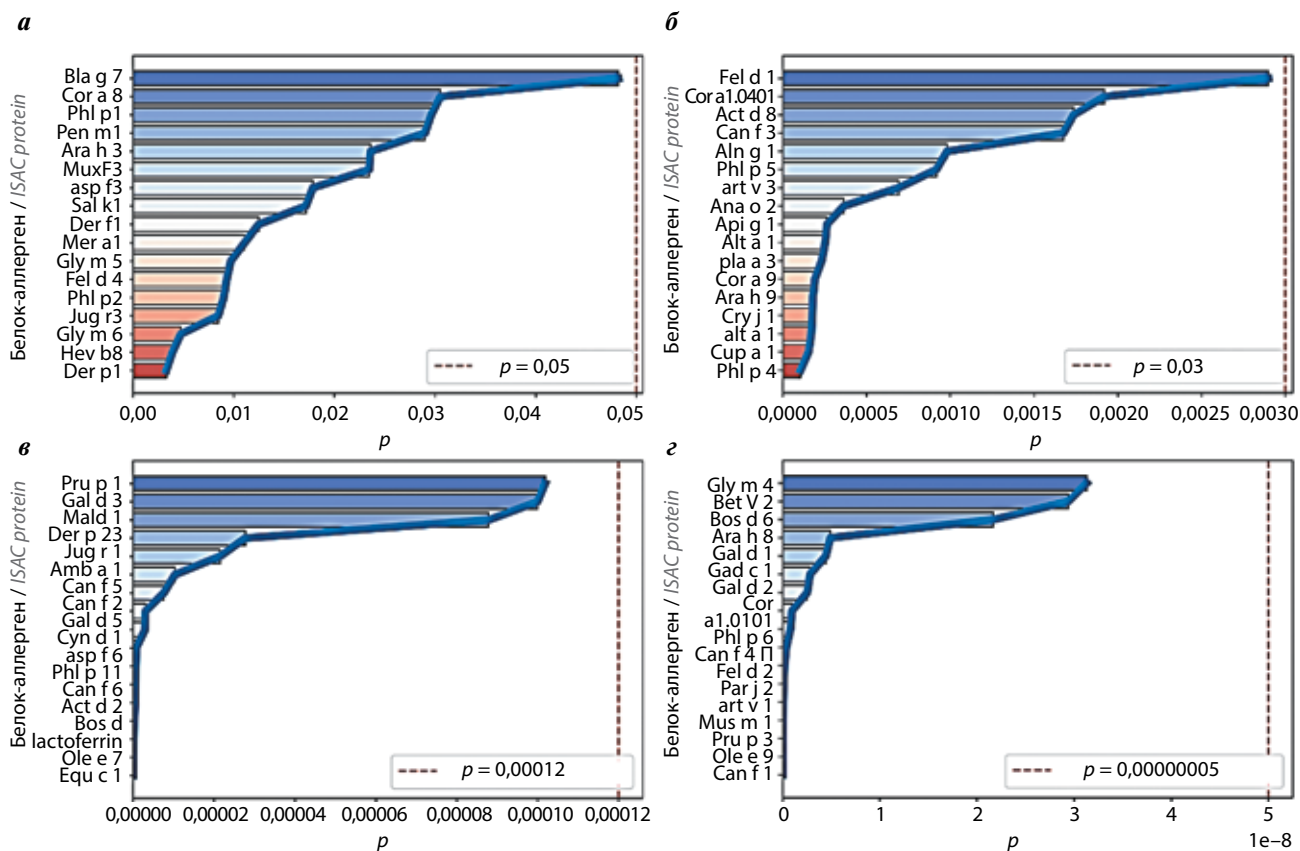


Рис. 2. Значимость белков-аллергенов из панели ISAC ImmunoCAP: а – от 0,00 до 0,05; б – от 0,000 до 0,003; в – от 0,00000 до 0,00012; г – от 0×10^{-7} до 5×10^{-7}

Fig. 2. Significance of allergen proteins from the ISAC ImmunoCAP panel: а – from 0,00 to 0,05; б – from 0,000 to 0,003; в – from 0,00000 to 0,00012; г – from 0×10^{-7} to 5×10^{-7}

Результаты

На I этапе проводили поиск наиболее значимых белков-аллергенов из панели ISAC. При сравнении доли белка-аллергена из всей панели (86 белков-аллергенов) определены 68 наиболее значимых из них (рис. 2). Среди последних выявлены такие аллергены, как Fel d 1, Asp f 6, Can f 1.

На II этапе из списка выявленных аллергенов удалены незначимые белки-аллергены, а значимые использовали для создания дву- и трехмерных таблиц с использованием t-SNE. После запуска цикла по поиску максимального значения дивергенции КЛ рассчитано значение perplexity, равное 16 (рис. 3).

Для поиска оптимального числа кластеров использовали диапазон подбора от 2 до 10. Оптимальное число кластеров по данным индекса ДБ и КС равно 6 (рис. 4 и табл. 2).

Результатом работы агломеративной кластеризации стало разделение пациентов на 6 фенотипов (рис. 5).

Аналогичный результат был получен для фенотипирования пациентов на основе 3 компонент t-SNE (рис. 6).

Таблица 2. Пересечение значений целевых метрик в зависимости от оптимального числа кластеров

Table 2. Intersection of target metrics values depending on the optimal number of clusters

Кластер Cluster	Индекс Дэвиса–Болдина Davis–Boldin index	Индекс Калински–Харабаса Calinski–Harabasz index	Коэффициент силуэта Silhouette score
2	1,940273	43,26288	0,182053
3	1,604465	44,09988	0,162132
4	1,394817	50,52562	0,186347
5	1,306113	52,73681	0,189505
6	1,205791	51,4918	0,196371
7	1,19617	49,24912	0,1844
8	1,190088	47,98359	0,177021
9	1,161925	47,59743	0,172594
10	1,165223	47,69457	0,171981

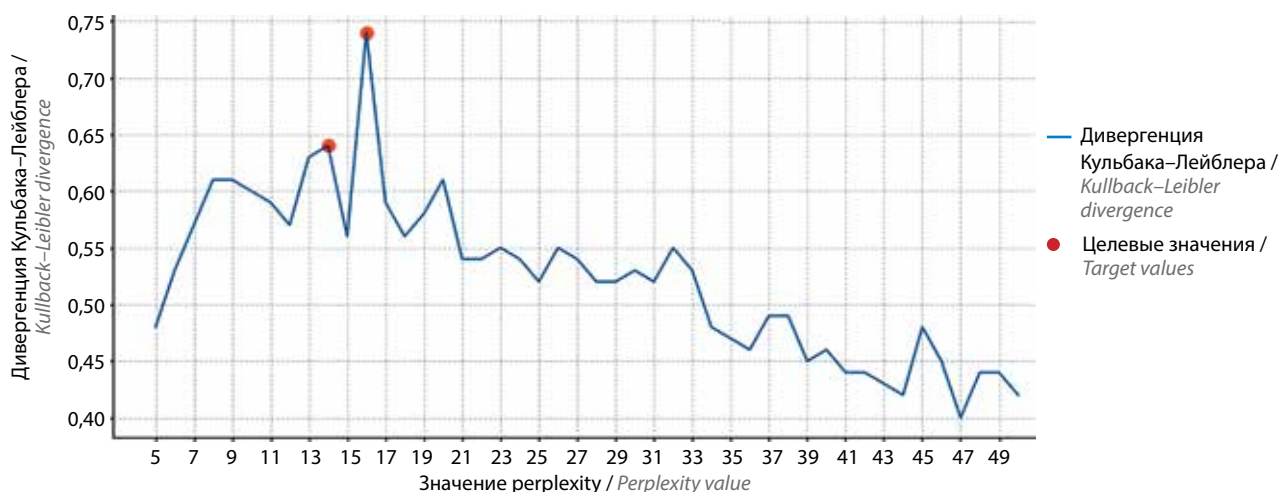


Рис. 3. Зависимость дивергенции Кульбака–Лейблера от значения perplexity для 2 компонент стохастического вложения соседей с t-распределением

Fig. 3. Kullback–Leibler divergence dependence on perplexity value for 2 components by t-distributed stochastic neighbor embedding

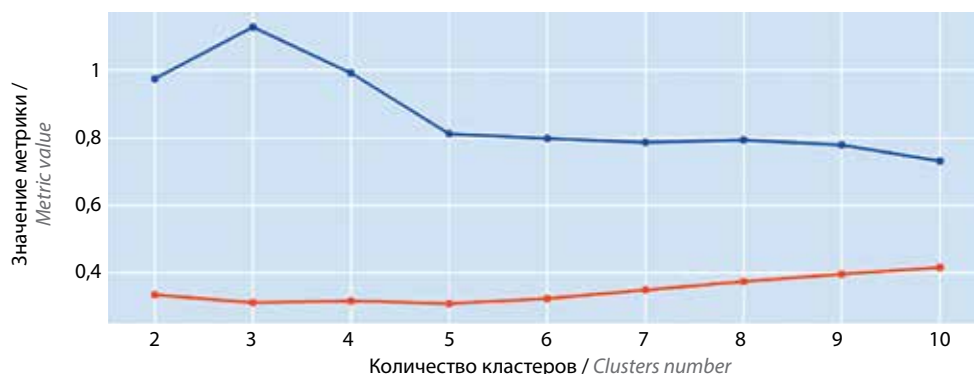


Рис. 4. Процесс поиска оптимального числа кластеров с использованием индекса Дэвиса–Болдина (график синим) и коэффициента силуэта (график красным) по 2 компонентам

Fig. 4. The process of finding the optimal number of clusters using Davis–Boldin index (graph in blue) and silhouette score (graph in red) on 2 components

На основе кластеризации каждому пациенту присвоен соответствующий фенотип. Затем проводили оценку значимости белка-аллергена в зависимости от фенотипа. Распределение пациентов по фенотипам представлено в табл. 3.

Таблица 3. Описательная статистика распределения пациентов по фенотипам

Table 3. Descriptive statistics of patient distribution by phenotype

Кластер Cluster	Описательная статистика Descriptive statistic			
	n	%	граница CI 95 % limit CI 95 %	
			нижняя lower	верхняя upper
1	39	20,63	20,45	20,82
2	44	23,28	23,09	23,47
3	31	16,4	16,23	16,57
4	35	18,52	18,34	18,7
5	26	13,76	13,6	13,91
6	14	7,41	7,29	7,53

Примечание. CI 95 % – 95 % доверительный интервал.
Note. CI 95 % – 95 % confidence interval.

После фенотипирования определены значимые различия между 38 белками-аллергенами (рис. 7).

Для описания фенотипов пациентов была построена тепловая карта процентной доли белка-аллергена внутри каждого фенотипа (рис. 8).

При post-hoc-анализе групп внутри фенотипов определены значимые различия между 1-м и 2-м фенотипами ($p = 0,0033$), 1-м и 5-м ($p = 0,0161$), 1-м и 6-м

($p = 0,0098$), 2-м и 4-м ($p = 0,0026$), 4-м и 5-м фенотипами ($p = 0,0438$).

На рис. 9 представлено распределение ТАТД, ТБА и ТАТД + ТБА в зависимости от фенотипа пациентов. При оценке частоты регистрации ТАТД, ТБА и ТАТД + ТБА в зависимости от фенотипа пациентов обнаружены значимые различия ($p < 0,0001$).

В 1-м фенотипе преобладала группа ТАТД (59 %), на II месте была группа ТБА (30,8 %), а на III – группа ТАТД + ТБА (10,3 %).

Во 2-м фенотипе преобладала группа ТАТД + ТБА (52,3 %), на II месте – группа ТАТД (29,5 %), а на III – группа ТБА (18,2 %).

В 3-м фенотипе распределение групп было равно сопоставимым. Пациенты из группы ТБА регистрировались в 38,7 % случаев. Группа ТАТД + ТБА встречалась в 32,3 % случаев, группа ТАТД – в 29 % случаев.

В 4-м фенотипе преобладала группа ТБА (60 %), на II месте была группа ТАТД (29,5 %), а на III – группа ТАТД + ТБА (14,3 %).

В 5-м фенотипе преобладала группа ТБА + ТАТД (50 %). Группы ТБА и ТАТД встречались в 23,1 и 26,9 % случаев соответственно.

В 6-м фенотипе преобладала группа ТАТД + ТБА (57,1 %), на II месте встречались пациенты из группы ТБА (28,6 %), пациенты из группы ТАТД регистрированы в 14,3 % случаев.

Для визуализации вклада белка-аллергена с кумулятивным эффектом при фенотипировании использовали диаграмму Парето (рис. 10).

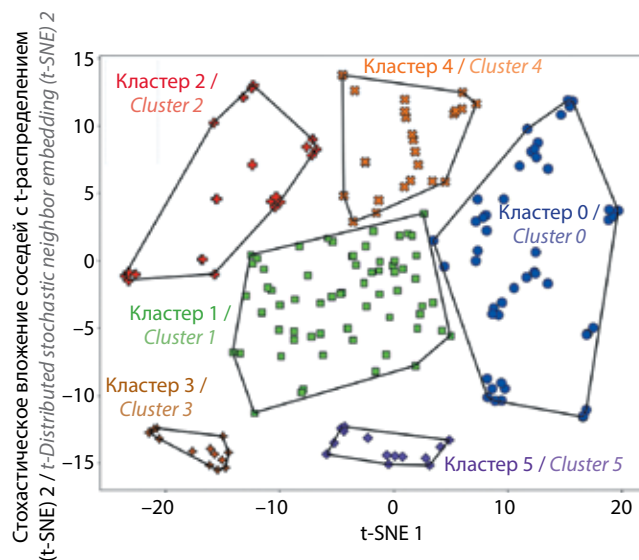


Рис. 5. Агломеративная кластеризация по 2 компонентам

Fig. 5. Agglomerative clustering by 2 components

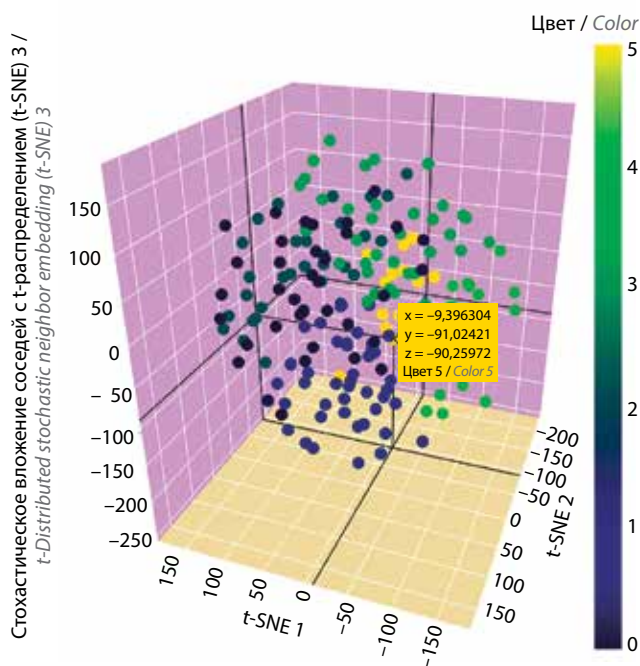


Рис. 6. Агломеративная кластеризация по 3 компонентам

Fig. 6. Agglomerative clustering by 3 components

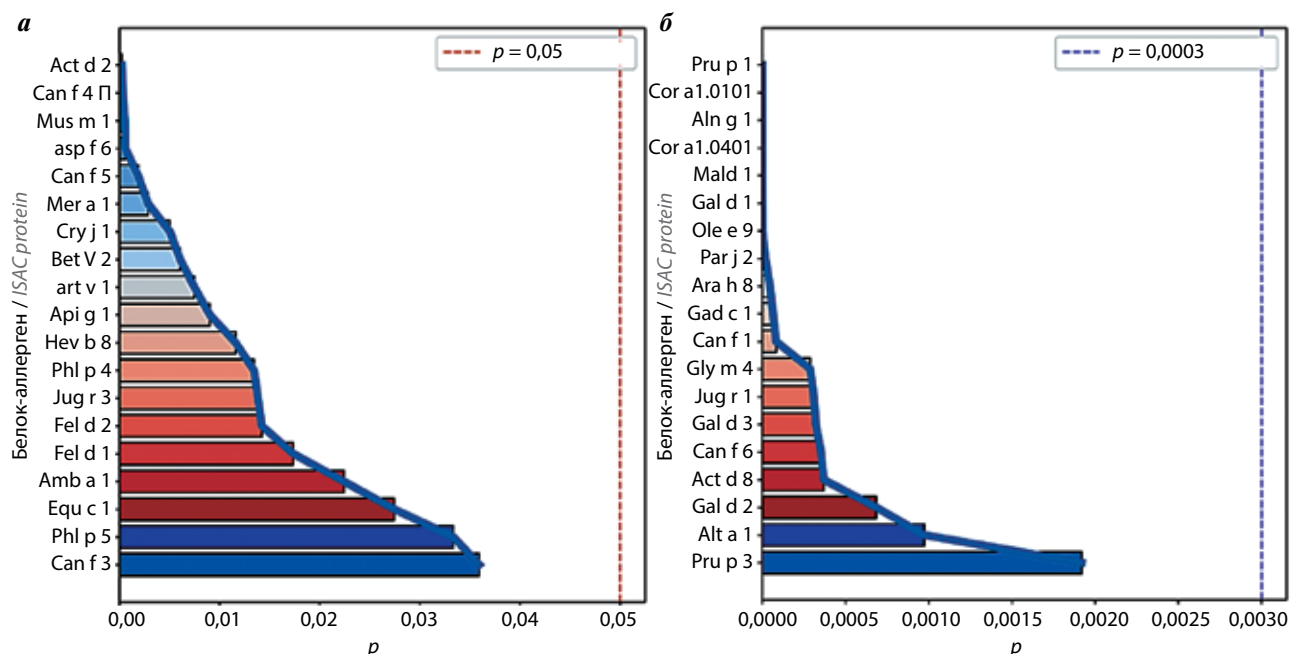


Рис. 7. Значимость белков-аллергенов после фенотипирования пациентов: а – от 0,00 до 0,05; б – от 0,000 до 0,003

Fig. 7. Significance of allergen proteins after phenotyping patients: а – from 0,00 to 0,05; б – from 0,000 to 0,003

Таблица 4. Топ-10 значимых белков-аллергенов в зависимости от фенотипа

Table 4. Top 10 significant allergen proteins according to phenotype

Ранжирование белков-аллергенов Allergen protein ranking	Фенотип Phenotype					
	1	2	3	4	5	6
Топ-1 Top-1	Fel d 1	Asp f 6	Fel d 1	Fel d 1	Can f 1	Fel d 1
Топ-2 Top-2	Mal d 1	Fel d 1	Gad c 1	Asp f 6	Fel d 1	Can f 1
Топ-3 Top-3	Ara h 8	Mal d 1	Can f 1	Ara h 8	Asp f 6	Gad c 1
Топ-4 Top-4	Can f 1	Pru p 1	Mal d 1	Can f 5	Mal d 1	Can f 5
Топ-5 Top-5	Amb a 1	Gad c 1	Art v 1	Fel d 2	Ole e 9	Gal d 1
Топ-6 Top-6	Gly m 4	Can f 1	Pru p 1	Can f 4	Phl p 4	Phl p 5
Топ-7 Top-7	Act d 8	Can f 5	Ara h 8	Can f 6	Gad c 1	Asp f 6
Топ-8 Top-8	Phl p 4	Ara h 8	asp f 6	Can f 3	Gly m 4	Gal d 3
Топ-9 Top-9	Asp f 6	Cor a 1.0401	Phl p 4	Jug r 3	Pru p 1	Art v 1
Топ-10 Top-10	Pru p 3	Can f 6	Can f 5	Pru p 3	Gal d 1	Can f 4

Исходя из кумулятивного эффекта был сформирован топ-10 значимых белков-аллергенов для каждого фенотипа (табл. 4).

Обсуждение

В результате фенотипирования и кластеризации обнаружено, что в разных фенотипах преобладают разные патологии.

При рассмотрении фенотипа 1, где преобладающей патологией является ТАТД (59 %), а также ТБА (30,8 %), обращает на себя внимание наличие молекул, ответственных за развитие сенсibilизации к пылевым компонентам (Amb a 1, Phl p 4). При этом белок Phl p 4 может обуславливать перекрестную реактивность с молекулами Amb a 1, Сун 4 [9]. В данном фенотипе также встречается широкий спектр перекрестных PR-10 молекул (Mal d 1, Ara h 8, Gly m 4, Act d 8, Pru p 3), что также может свидетельствовать о наличии перекрестной пищевой аллергии у пациентов с тяжелыми аллергическими заболеваниями, особенно с атопическим дерматитом. На I месте по значимости – мажорный аллерген кошки Fel d 1. Иных эпидермальных молекул в данном фенотипе нет. Грибковый аллерген asp f 6 в отличие от фенотипа 2, где он занимает I место, в данном фенотипе занимает только IX место, что может быть обусловлено высоким распространением бронхиальной астмы.

При анализе значимых аллергенов для 2-го фенотипа, в котором лидирующее место занимает комбинация ТАТД и ТБА белков, на первом месте находится молекула asp f 6. По данным литературы, данная

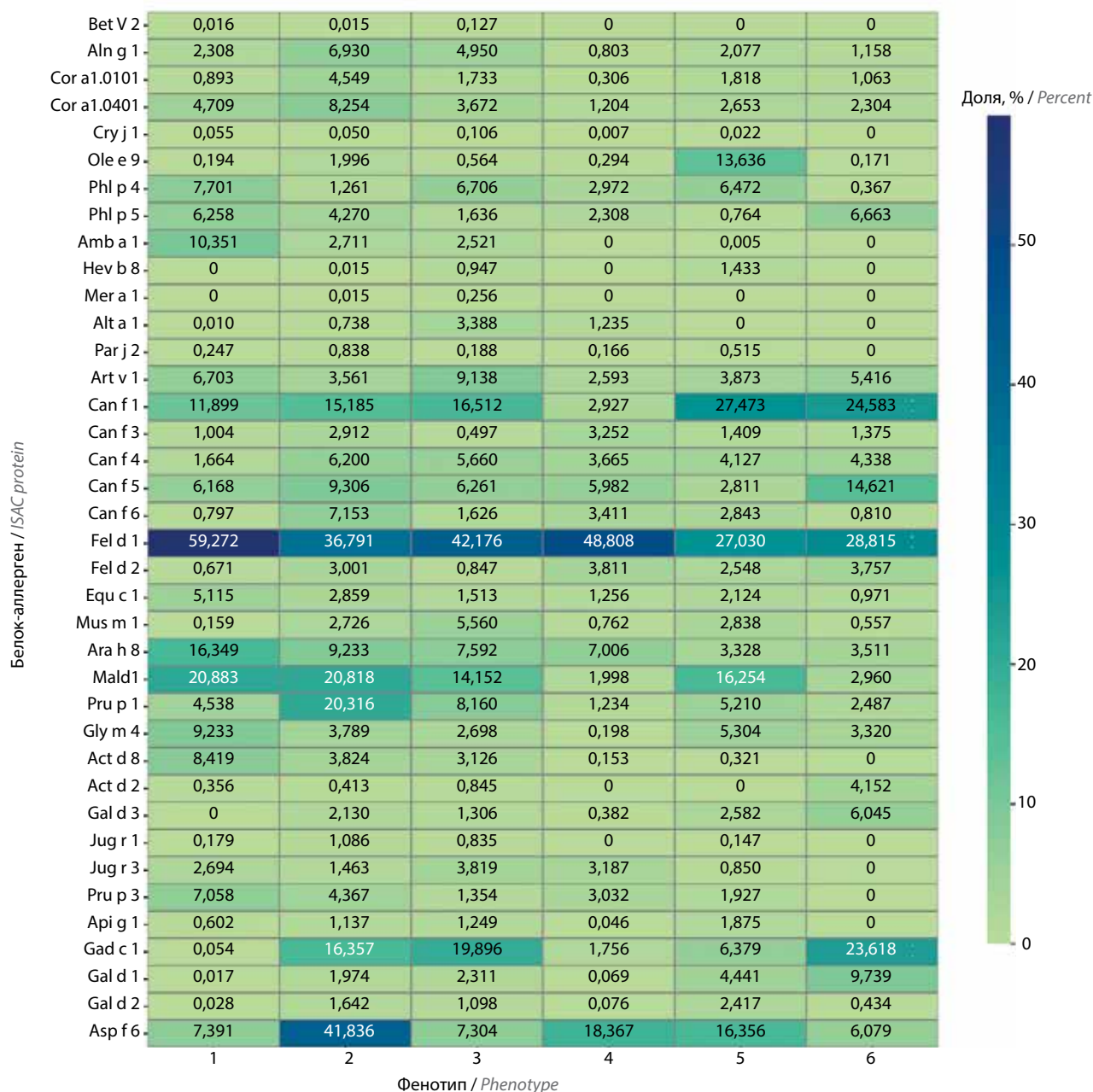


Рис. 8. Доля белка-аллергена в зависимости от фенотипа

Fig. 8. Protein-allergen fraction depending on phenotype

молекула часто сочетается с ТАТД, а также свидетельствует о раннем его дебюте до 5 лет [10, 11]. Грибковые аллергены у пациентов с atopическим дерматитом играют роль в повреждении кожного барьера [12], а также могут служить предиктором развития пищевой аллергии [13]. Также в данном фенотипе обращает на себя внимание наличие сенсибилизации к пищевым молекулам — Mal d 1, Pru p 1, Ara h 8, Cor a1.0401. Данная группа белков относится к белкам PR-10 семейства, отвечающим за развитие перекрестной пищевой аллергии [14]. Интересным является то, что сама молекула Bet V1 по результатам модели-

рования не влияет на формирование фенотипов тяжелых аллергических заболеваний, вероятно, ввиду своей повсеместной распространенности [15], однако она может обуславливать развитие перекрестной пищевой аллергии к широкому спектру продуктов, прежде всего у пациентов с atopическим дерматитом. Данный факт важно учитывать при определении спектра элиминационных мероприятий. При подобном фенотипе также обращает на себя внимание сенсибилизация к парвальбумину Gad c 1, что коррелирует с данными распространенности пищевой аллергии у взрослых [16, 17]. При этом влияние иных

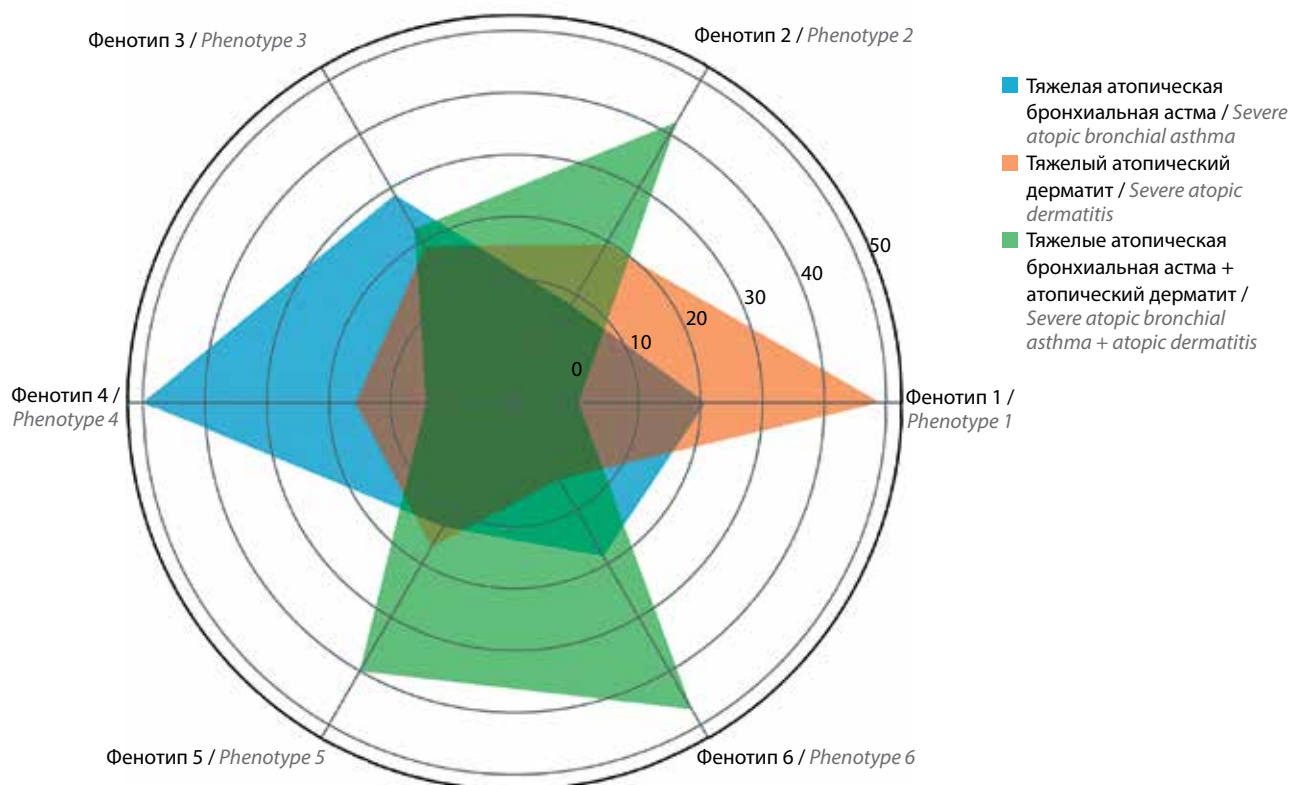


Рис. 9. Распределение исследуемых групп в зависимости от ISAC-фенотипа

Fig. 9. Distribution of the study groups according to ISAC phenotype

пищевых продуктов (яиц, молока, сои и др.) на фенотип с преобладанием тяжелого атопического дерматита не выявлено. Значимой также оказалась сенсibilизация к алергокомпонентам собаки (Can f 1, Can f 5, Can f 6). При этом сенсibilизация к Can f 6 будет ответственна за развитие кросс-реактивности с гомологичными молекулами лошади и кошки [18]. В данном фенотипе также встречается сенсibilизация к мажорному аллергену кошки Fel d 1.

При рассмотрении 4-го фенотипа, где преобладает ТБА (60 %), доминирующими молекулами являются эпидермальные аллергены (Fel d 1, Fel d 2, Can f 5, Can f 6, Can f 3). При этом, помимо ранее упомянутой перекрестной молекулы Can f 6, в данном фенотипе встречается Fel d 2, которая также является перекрестной [19], играющей особую роль в патогенезе развития синдрома «кошка — свинина» [20], что нужно учитывать при разработке элиминационных мероприятий. Показано, что эпидермальные аллергены играют роль в развитии атопического марша [21], бронхиальной астмы в детском возрасте [22], в ее тяжести [23]. На II месте в данном фенотипе находится молекула Asp f 6. Принимая во внимание наличие ТБА как преобладающего заболевания, в дифференциальном ряду необходимо учитывать аллергический бронхолегочный аспергиллез [24]. Среди молекул перекрестной пищевой аллергии встречаются

только 2 — Jug r 3, Pru r 3, занимающие последнее по значимости место.

В 5-м и 6-м фенотипах в 1/2 и более случаев преобладает комбинированная патология (50,0 и 57,1 % соответственно). Схожий момент, объединяющий оба эти фенотипа, — то, что преобладающие молекулы, занимающие 2 первых места, — это Can f 1 и Fel d 1, являющиеся мажорными аллергенами. В 6-м фенотипе также выявлены Can f 5 и 4. Как упоминалось ранее, эпидермальные аллергены могут играть роль в развитии атопического марша. С этим может быть связано преобладание в данном фенотипе сочетанной патологии. В 5-м и 6-м фенотипах обращает на себя внимание широкое распространение молекул, отвечающих за истинную пищевую аллергию (Gad c 1 и Gal d 1 и Gad c 1, Gal d 1, Gal d 3 соответственно). При назначении элиминационной диеты следует учесть, что Gal d 1 является термостабильной молекулой яйца, а Gal d 3 — термолабильной. В 5-м фенотипе, в отличие от 6-го фенотипа, обнаружены молекулы перекрестной пищевой аллергии (Mal d 1, Gly m 4, Pru p 1). В 6-м фенотипе обнаружена пыльцевая сенсibilизация к молекулам Phl p 5 и Art v 1, которые являются мажорными аллергенами. При этом Phl p 5 имеет широкую перекрестную реактивность с семейством мятликовых [9], что нужно учитывать при разработке элиминационных мероприятий. В 5-м фенотипе также

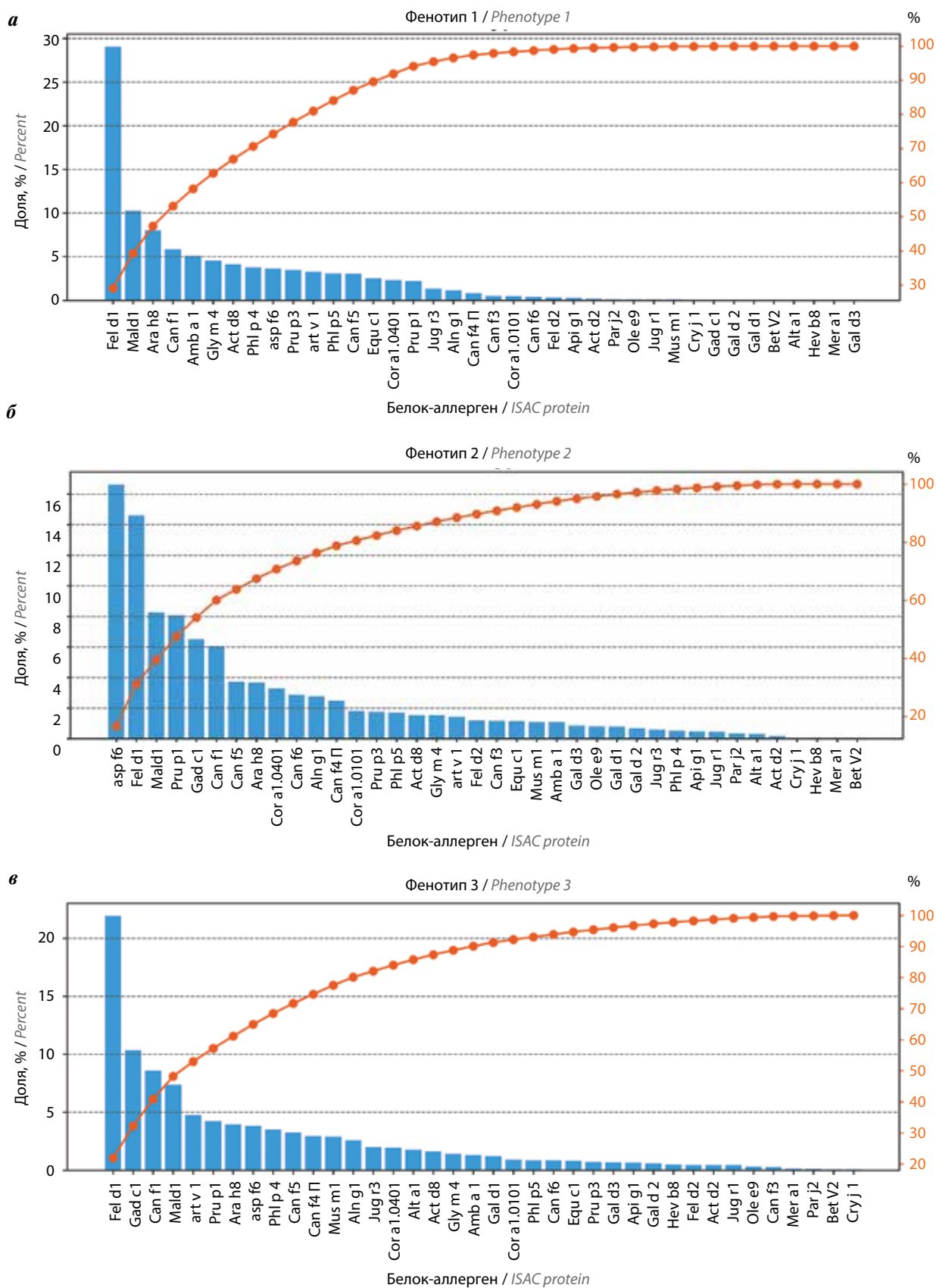


Рис. 10. Влияние белка-аллергена на фенотипы 1–3 (а–в) с кумулятивным эффектом

Fig. 10. Effect of protein allergen on phenotypes 1–3 (a–v) with cumulative effect

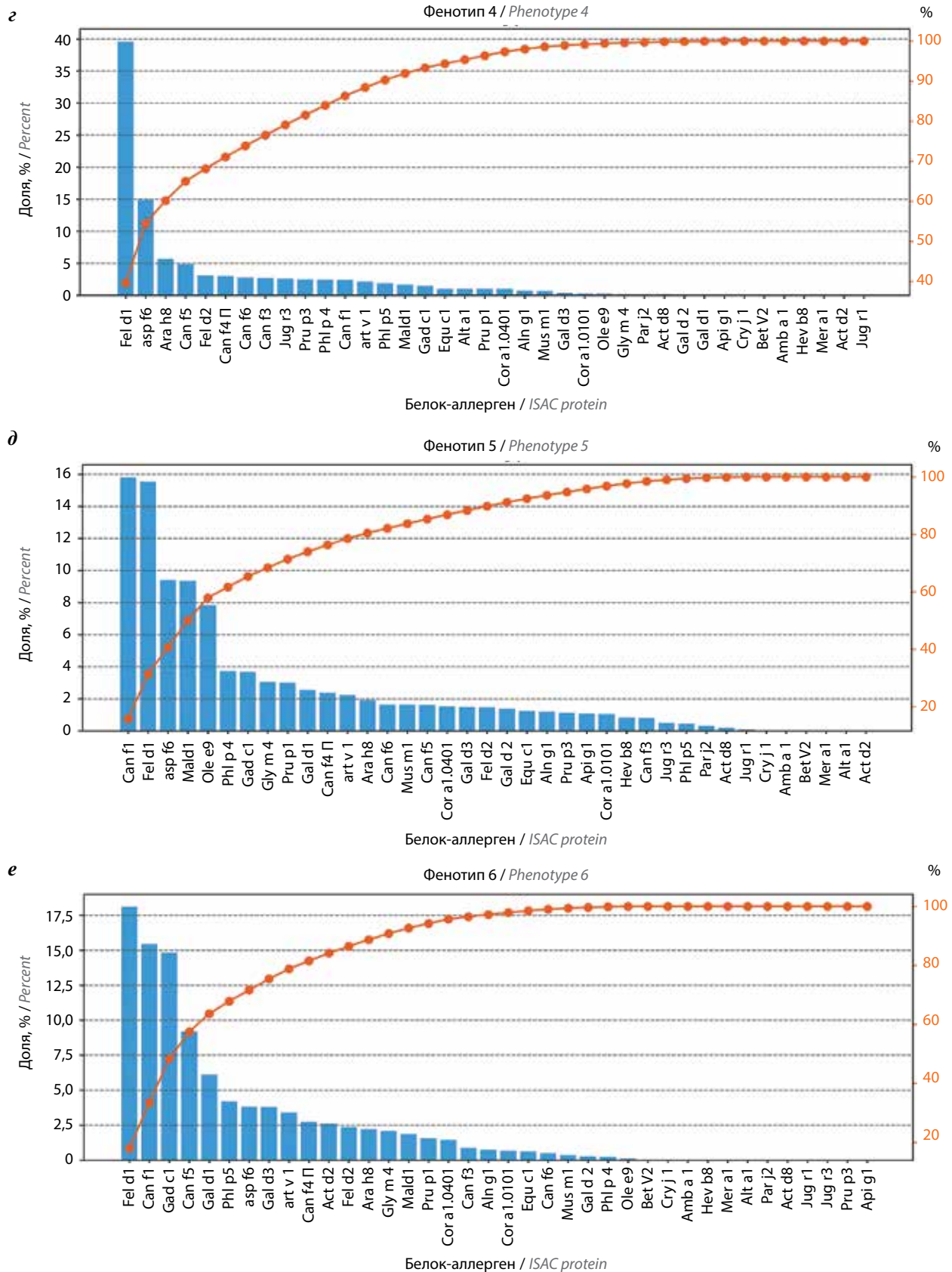


Рис. 10. (Окончание). Влияние белка-аллергена на фенотипы 4–6 (з–е) с кумулятивным эффектом

Fig. 10. (Ending). Effect of protein allergen on phenotypes 4–6 (z–e) with cumulative effect

обнаружены пыльцевые молекулы, однако они отличны — Ole e 9, Phl p 4. Стоит упомянуть о том, что молекула Ole e 9 ассоциирована с системными и локальными реакциями на пищу, возникновением АД, позволяет различать умеренную и тяжелую формы заболевания [25]. Молекула Asp f 6 находится в 5-м фенотипе на III месте, в 6-м — только на VI месте.

В 3-м фенотипе, в котором все группы распределены в относительно равных пропорциях, отмечается сочетание ранее обозначенных молекул: на I месте находится эпидермальный аллерген Fel d 1, далее на III и последнем месте — Can f 1 и Can f 5 соответственно. В данном фенотипе встречаются и молекулы, характерные для пыльцевой сенсибилизации (Art v 1, Phl p 4) и перекрестной пищевой аллергии (Mal d 1, Pru p 1, Ara h 8), а также молекула истинной пищевой аллергии (Gad c 1). Кроме того, в этом фенотипе, как и в остальных, есть молекула грибковой сенсибилизации — Asp f 6.

Закключение

Таким образом, при помощи подобного статистического анализа в каждом из выявленных фено-

типов обнаруживается свой набор молекул, которые могут быть использованы в реальной клинической практике. Во-первых, на основании полученных результатов возможна разработка более усеченного варианта аллергочипов, которые будут менее затратными для изготовления и станут более доступны для аллергообследования пациентов с тяжелыми аллергическими заболеваниями. Во-вторых, при более широком распространении аллергокомпонентной диагностики возможна разработка более четких рекомендаций по соблюдению элиминационных мероприятий (диеты, быта и т.д.), поскольку недостаточные меры будут приводить к обострению и отсутствию контроля основного заболевания, а чрезмерные ограничения — к снижению качества жизни, недостатку важных микроэлементов и питательных веществ. В-третьих, в дальнейшем возможно рассмотрение роли того или иного фенотипа сенсибилизации в ответе на проводимую генно-инженерную биологическую терапию у пациентов с тяжелыми аллергическими заболеваниями. Использование подобного статистического анализа может стать первым шагом к применению искусственного интеллекта в аллергологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Paller A.S., Spergel J.M., Mina-Osorio P., Irvine A.D. The atopic march and atopic multimorbidity: many trajectories, many pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143(1):46–55. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.11.006
2. Mersha T.B., Hershey K., Gurjit K. Precision medicine in allergic disorders. In: Middleton's allergy: principles and practice. 9th ed., vol. 2. New York: Elsevier, 2020. Pp. 1441–1450.
3. Valenta R., Duchene M., Vrtala S. et al. Recombinant allergens for immunoblot diagnosis of tree-pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88(6):889–94. DOI:10.1016/0091-6749(91)90245-J
4. van Hage M., Hamsten C., Valenta R. ImmunoCAP assays: pros and cons in allergology. *J Allergy Clin Immunol* 2017;140(4):974–7. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.05.008
5. Vaňková R., Čelakovská J., Bukač J. et al. Sensitization to molecular components in 104 atopic dermatitis patients in relation to subgroups of patients suffering from bronchial asthma and allergic rhinitis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2020;63(4):164–75. DOI: 10.14712/18059694.2020.59
6. Venkatesan P. 2023 GINA report for asthma. *Lancet Respir Med* 2023;11(7):589. DOI: 10.1016/S2213-2600(23)00230-8
7. Атопический дерматит. Проект клинических рекомендаций. 2020 г. РААКИ. URL: https://raaci.ru/dat/pdf/KR/atopic_dermatitis_2020.pdf?ysclid=li7geerqe3115604531. Atopicheskij dermatit. Proekt klinicheskikh rekomendacij. 2020 g. RAАКИ. URL: https://raaci.ru/dat/pdf/KR/atopic_dermatitis_2020.pdf?ysclid=li7geerqe3115604531
8. Ackermann M.R., Blömer J., Kuntze D., Sohler C. Analysis of agglomerative clustering. *Algorithmica* 2010;69(1):184–215. DOI:10.1007/s00453-012-9717-4
9. Ščevková J., Vašková Z., Sepšiová R. et al. Relationship between Poaceae pollen and Phl p 5 allergen concentrations and the impact of weather variables and air pollutants on their levels in the atmosphere. *Heliyon* 2020;6(7):e04421. DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04421
10. Čelakovská J., Bukač J., Cermáková E. et al. Analysis of results of specific IgE in 100 atopic dermatitis patients with the use of multiplex examination ALEX2-Allergy Explorer. *Int J Mol Sci* 2021;22(10):5286. DOI: 10.3390/IJMS22105286
11. Scala E., Abeni D., Guerra E.C. et al. β-1,3-glucanase rOle e 9 and MnSOD rAsp f 6 IgE reactivity are the signature of atopic dermatitis in the Mediterranean area. *Clin Exp Allergy* 2020;50(4):487–98. DOI: 10.1111/cea.13555
12. Gaitanis G., Magiatis P., Hantschke M. et al. The Malassezia genus in skin and systemic diseases. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(1):106–41. DOI: 10.1128/CMR.00021-11
13. Ott H., Fölster-Holst R., Merk H.F. et al. Allergen microarrays: a novel tool for high-resolution IgE profiling in adults with atopic dermatitis. *Eur J Dermatol* 2010;20(1):54–61. DOI: 10.1684/ejd.2010.0810
14. Aglas L., Soh W.T., Kraiem A. et al. Ligand binding of PR-10 proteins with a particular focus on the Bet v 1 allergen family. *Curr Allergy Asthma Rep* 2020;20(7):25. DOI: 10.1007/s11882-020-00918-4
15. Biedermann T., Winther L., Till S.J. et al. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy* 2019;74(7):1237–48. DOI: 10.1111/all.13758
16. Iweala O.I., Choudhary S.K., Commis S.P. Food allergy. *Curr Gastroenterol Rep* 2018;20(5):17. DOI: 10.1007/s11894-018-0624-y
17. Warren C.M., Jiang J., Gupta R.S. Epidemiology and burden of food allergy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2020;20(2):6. DOI: 10.1007/s11882-020-0898-7

18. Nilsson O.B., Binnmyr J., Zoltowska A. et al. Characterization of the dog lipocalin allergen Can f 6: the role in cross-reactivity with cat and horse. *Allergy* 2012;67(6):751–7. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02826.x
19. Niespodziana K., Focke-Tejkl M., Linhart B. et al. A hypoallergenic cat vaccine based on Fel d 1-derived peptides fused to hepatitis B PreS. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(6):1562–70.e6. DOI:10.1016/j.jaci.2011.02.004
20. Barradas Lopes J., Labrador-Horrilo M., Bartolomé B., Cunha L. The role of molecular allergens in the diagnosis of cat-pork syndrome: an unusual case report. *Acta Med Port* 2022;35(5):388–91. DOI: 10.20344/amp.15483
21. Čelakovská J., Ettlerová K., Ettler K. et al. Sensitization to aeroallergens in atopic dermatitis patients: association with concomitant allergic diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2015;29(8):1500–5. DOI: 10.1111/jdv.12891
22. Nordlund B., Konradsen J.R., Kull I. et al. IgE antibodies to animal-derived lipocalin, kallikrein and secretoglobulin are markers of bronchial inflammation in severe childhood asthma. *Allergy* 2012;67(5):661–9. DOI: 10.1111/j.1398-9995.2012.02797.x
23. Pónyai G., Hidvégi B., Németh I. et al. Contact and aeroallergens in adulthood atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008;22(11):1346–55. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2008.02886.x
24. Muthu V., Sehgal I.S., Dhooira S. et al. Utility of recombinant *Aspergillus fumigatus* antigens in the diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis: a systematic review and diagnostic test accuracy meta-analysis. *Clin Exp Allergy* 2018;48(9):1107–36. DOI: 10.1111/cea.13216
25. Wójciechowska M., Żbikowska-Gotz M., Marek-Józefowicz L. et al. Allergic phenotypes in adult patients with atopic dermatitis, determined with the ISAC test (ImmunoCAP ISAC). *Postepy Dermatol Alergol* 2018;35(4):351–9. DOI: 10.5114/ada.2018.77664

Вклад авторов

Д.С. Фомина: обзор литературы, сбор и анализ источников литературы, редактирование текста статьи;

М.С. Лебедкина, Е.А. Никитина: обзор литературы, сбор и анализ источников литературы, написание текста статьи, редактирование статьи;

А.Д. Душкин, А.А. Чернов: сбор и обработка статистических данных, формирование результатов исследования, редактирование статьи;

Ю.Д. Юхновская: сбор источников литературы, редактирование статьи;

А.В. Караулов, И.В. Евсегнеева, М.А. Лысенко: курирование работы, редактирование статьи.

Authors' contribution

D.S. Fomina: a literature review, a literature collection and analysis, editing of the article;

M.S. Lebedkina, E.A. Nikitina: a literature review, a literature collection and analysis, writing an article, editing of the article;

A.D. Dushkin, A.A. Chernov: collection and processing of statistical data, formation of research results, editing of the article;

Y.D. Yukhnovskaya: literature collection, editing of the article;

A.V. Karaulov, I.V. Evsegneeva, M.A. Lysenko: project supervision, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Д.С. Фомина / D.S. Fomina: <https://orcid.org/0000-0002-5083-6637>

М.С. Лебедкина / M.S. Lebedkina: <https://orcid.org/0000-0002-9545-4720>

Е.А. Никитина / E.A. Nikitina: <https://orcid.org/0000-0002-0865-8355>

А.Д. Душкин / A.D. Dushkin: <https://orcid.org/0000-0002-8013-5276>

А.А. Чернов / A.A. Chernov: <https://orcid.org/0000-0001-6209-387X>

Ю.Д. Юхновская / Yu.D. Yukhnovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-0928-2054>

И.В. Евсегнеева / I.V. Evsegneeva: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

А.В. Караулов / A.V. Karaulov: <https://orcid.org/0000-0002-1930-5424>

М.А. Лысенко / M.A. Lysenko: <https://orcid.org/0000-0001-6010-7975>

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все участники исследования были проинформированы об исследовании, принимали в нем участие добровольно и подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование одобрено локальным этическим комитетом, протокол № 01вн/0423 от 12.04.2023.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All study participants were informed about the study, took part in it voluntarily and signed an informed consent to participate in the study. The study was approved by the local Ethics Committee, Protocol No. 01vn/0423 dated 12.04.2023.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-75-30016 «Аллергочип РФ».

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation through the grant No. 23-75-30016 “AllergochipRUS”.

Статья поступила: 25.01.2024. Принята в печать: 15.08.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.2024.

Article received: 25.01.2024. Accepted for publication: 15.08.2024. Published online: 00.00.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-40-46>

Анализ изменения содержания уровней растворимых молекул CD50, CD54 и CD95 в сыворотке крови больных миомой матки в зависимости от особенностей течения заболевания (пилотное исследование)

А.В. Алясова¹, М.Е. Мамаева², Н.И. Кубышева³, В.В. Новиков^{4,5}

¹ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России; Россия, 603950 Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²ФБУЗ «Приволжский окружной медицинский центр» Федерального медико-биологического агентства России; Россия, 603005 Нижний Новгород, Нижневолжская наб., 2;

³ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420000 Казань, ул. Кремлевская, 18;

⁴ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Россия, 603950 Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71;

⁵ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»; Россия, 603022 Нижний Новгород, пр-кт Гагарина, 23

Контакты: Наилия Исхаковна Кубышева aibolit70@mail.ru

Введение. В настоящее время актуальным является поиск циркулирующих иммунологических и воспалительных маркеров, играющих весомую роль в патогенезе миомы матки (ММ).

Цель исследования – изучить изменения сывороточного содержания растворимых молекул CD50 (sCD50), CD54 (sCD54) и CD95 (sCD95) у больных ММ в зависимости от особенностей течения заболевания.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 78 пациенток с ММ в возрасте 31–59 лет и 45 клинически здоровых женщин сопоставимого возраста. Больные были разделены на группы в зависимости от локализации миоматозного узла (МУ): 1-я группа ($n = 17$) – интерстициально-субсерозная локализация, 2-я группа ($n = 16$) – субсерозная локализация, 3-я группа ($n = 15$) – субмукозная локализация, 4-я группа ($n = 15$) – интерстициально-субмукозная локализация и 5-я группа ($n = 15$) – интерстициальная локализация. У 34,6 % пациенток число МУ составило 4–6, у 46,2 % женщин – 2–3 МУ, у 19,2 % – 1 МУ. Определение сывороточной концентрации sCD50, sCD54 и sCD95 проводили с помощью иммуноферментного анализа и их содержание выражали в условных единицах (У/мл).

Результаты. Среднестатистическая сывороточная концентрация sCD95, sCD54 и sCD50 у всех больных ММ значимо превышала показатели контрольной группы ($p < 0,05$). Максимальный уровень тестируемых молекул обнаружен в сыворотке крови пациенток с субмукозной локализацией ММ и наличием 1 МУ. Сывороточная концентрация sCD50, sCD54 и sCD95 при субсерозной локализации ММ не отличалась от значений у здоровых женщин ($p > 0,05$).

Заключение. Обнаруженное увеличение содержания sCD50, sCD54 и sCD95 в сыворотке крови пациенток с ММ свидетельствует об участии данных белков в иммунопатогенезе этой патологии. Несбалансированность содержания исследуемых белков наиболее выражена при субмукозной локализации ММ, что может указывать на неблагоприятное течение заболевания и служить дополнительным критерием отбора пациенток в предоперационный период.

Ключевые слова: растворимые формы дифференцировочных молекул, растворимые молекулы адгезии, маркеры апоптоза, миома матки

Для цитирования: Алясова А.В., Мамаева М.Е., Кубышева Н.И., Новиков В.В. Анализ изменения содержания уровней растворимых молекул CD50, CD54 и CD95 в сыворотке крови больных миомой матки в зависимости от особенностей течения заболевания (пилотное исследование). Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):40–6.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-40-46>

Analysis of changes in the levels of soluble molecules CD50, CD54 and CD95 in the blood serum of patients with uterine fibroids depending on the characteristics of the disease (pilot study)

Anna V. Alyasova¹, Marina E. Mamaeva², Nailya I. Kubysheva³, Viktor V. Novikov^{4,5}

¹Privolzhsky Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 10/1 Minina and Pozharskogo Square, Nizhny Novgorod 603950, Russia;

²Privolzhsky District Medical Center of the Federal Medical and Biological Agency; 2 Nizhnevolskaya nab., Nizhny Novgorod 603005, Russia;

³Kazan (Volga region) Federal University; 18 Kremlyovskaya St., Kazan 420000, Russia;

⁴I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare; 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod 603950, Russia;

⁵National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod; 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod 603022, Russia

Contacts: Nailya Iskhakovna Kubysheva aibolit70@mail.ru

Background. Currently, the search for circulating immunological and inflammatory markers that play a significant role in the pathogenesis of uterine fibroids (UF) is relevant.

Aim. Changes in the serum levels of soluble molecules CD50 (sCD50), CD54 (sCD54) and CD95 (sCD95) in patients with UF depending on the characteristics of the disease.

Materials and methods. The study involved 78 patients with UF aged 31–59 years and 45 clinically healthy women of comparable age. The patients were divided into the following groups depending on the localization of the myomatous node: interstitial-subserous localization ($n = 17$), subserous localization ($n = 16$), submucosal localization ($n = 15$), interstitial-submucosal localization ($n = 15$), interstitial localization ($n = 15$). In 34.6 % patients, the number of myoma nodes was 4–6, in 46.2 % women there were 2–3 nodes, in 19.2 % – 1 node. Determination of the serum concentration of sCD50, sCD54 and sCD95 molecules was performed using a two-site enzyme immunoassay and expressed in conventional units (U/ml).

Results. The average serum concentration of sCD95, sCD54 and sCD50 in all patients with UF was significantly higher than in the control group ($p < 0.05$). The maximum level of the tested molecules was found in UF patients with submucosal localization and the presence of one myomatous node.

Conclusions. The detected increase in sCD50, sCD54 and sCD95 levels in UF patients indicates the participation of these proteins in the immunopathogenesis of this pathology. The imbalance in studied proteins levels is most pronounced in submucosal localization of fibroids, which may indicate an unfavorable course of the disease and serve as an additional criterion for selecting patients in the preoperative period.

Keywords: soluble forms of differentiation molecules, soluble adhesion molecules, apoptosis markers, uterine fibroids

For citation: Alyasova A.V., Mamaeva M.E., Kubysheva N.I., Novikov V.V. Analysis of changes in the levels of soluble molecules CD50, CD54 and CD95 in the blood serum of patients with uterine fibroids depending on the characteristics of the disease (pilot study). *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):40–6.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-40-46>

Введение

Миома матки (ММ) — доброкачественная опухоль в гладкомышечном слое матки. Распространенность этой опухоли составляет примерно 70–80 % у женщин разных возрастных групп. Диагноз ММ обычно устанавливается с помощью рентгенологических методов или хирургических вмешательств [1]. В то же время существует необходимость определения потенциальных биомаркеров для диагностики и мониторинга терапии ММ.

За развитие ММ ответственны многие факторы, к числу которых относятся генетические изменения, влияние таких гормонов, как эстрогены и прогестероны, избыточное накопление внеклеточного матрикса [1, 2]. Аккумуляция внеклеточного матрикса

предполагает воспалительную природу этой опухоли. За последнее время многие исследователи акцентируют внимание на изучении роли различных показателей воспаления и иммунитета в формировании патогенетических механизмов данной патологии [3].

На современном этапе молекулярные и клеточные биомаркеры воспаления ММ представлены в основном на локальном уровне: в перитонеальной жидкости и миометрии [4–7]. Внутри лейомиомы обнаружено высокое количество макрофагов, лимфоцитов, плазматических и тучных клеток, вовлеченных в патофизиологию данной опухоли [6]. Показано, что эти клетки в миометрии содержат многочисленные цитокины и медиаторы, которые участвуют в активации сигнальных путей и регуляции механизмов

развития ММ [7]. Установлено, что такие цитокины, как интерлейкины 1, 6, 11, 13, 15, 33, фактор некроза опухоли α и гранулоцитарный фактор, стимулирующий колонию макрофагов, вовлечены в патофизиологию лейомиомы и влияют на формирование воспаления, пролиферацию, ангиогенез и фиброзные процессы в матке [7, 8].

В настоящее время актуален поиск циркулирующих иммунологических и воспалительных маркеров, играющих весомую роль в патогенезе ММ [9, 10]. Продемонстрировано изменение сывороточной концентрации ряда цитокинов у пациенток с ММ по сравнению со здоровыми женщинами [6, 9–11]. Считается, что отклонение уровня данных медиаторов в циркуляции от нормы является одним из показателей дисфункции иммунной системы в ответ на развитие воспаления при ММ.

В реализации воспалительных процессов немаловажную роль играют растворимые формы дифференцировочных молекул (sCD), образующиеся за счет альтернативного сплайсинга и/или протеолитического отщепления с поверхности мембраны клеток [12]. Известны несколько десятков растворимых дифференцировочных форм, например модулирующие адгезивные клеточные реакции молекулы sICAM-1 (sCD54) и sICAM-3 (sCD50), опосредующие апоптоз растворимые молекулы Fas (sCD95), молекулы главного комплекса гистосовместимости (sHLA) и т. д.

Решающая роль в воспалительных процессах принадлежит молекулам клеточной адгезии ICAM-1 и ICAM-3, которые принимают активное участие в стимулировании перемещения клеток (нейтрофилов, моноцитов, Т-лимфоцитов) в область воспаления. Растворимые белки ICAM-1 (sCD54) и ICAM-3 (sCD50) могут ингибировать адгезию и миграцию клеток, а также блокировать инициацию процессов иммунного ответа [13, 14]. В настоящий момент роль sCD50 и sCD54 протеинов в развитии воспаления при ММ требует уточнения.

В развитии ММ существенное значение имеет дисрегуляция процессов апоптоза, что может быть причиной формирования доброкачественной опухоли при данной патологии [15]. Одним из специализированных клеточных рецепторов, инициирующих апоптоз, является CD95 (Fas) [16]. Исследование маркеров апоптоза в циркуляции у пациенток с ММ, в том числе в зависимости от локализации и количества миоматозных узлов (МУ), носит единичный характер и требует дальнейшего изучения.

Имеются немногочисленные публикации, посвященные оценке уровней ряда растворимых молекул у больных ММ. Так, P. Basta и соавт. обнаружили высокие сывороточные уровни sHLA-G у пациенток с лейомиомой матки [17]. В других работах представ-

лено, что развитие доброкачественной патологии тела матки сопровождается одновременным возрастанием уровней олигомерной и суммарной фракций растворимых молекул CD38, а также увеличением концентрации sHLA-I и sHLA-DR [18, 19]. Изменение концентрации данных белков также зависело от числа и локализаций МУ. Повышение уровня концентрации указанных растворимых молекул может свидетельствовать об их роли в патогенетических механизмах развития ММ. Представляется актуальным дальнейшее изучение изменений концентраций растворимых дифференцировочных белков с целью оценки диагностических и прогностических возможностей этих молекул в формировании иммуноопосредованных механизмов при ММ.

Цель исследования – изучить изменения сывороточного содержания растворимых молекул CD50 (sCD50), CD54 (sCD54) и CD95 (sCD95) у больных ММ в зависимости от особенностей течения заболевания.

Материалы и методы

В основу работы положены результаты обследования 78 больных ММ в возрасте 31–59 лет и 45 клинически здоровых женщин (контрольная группа), сопоставимых по возрасту с обследованными больными. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.) и одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Приволжский медицинский исследовательский университет» (протокол № 88 от 30.03.2007). Письменное информированное согласие получено от каждой пациентки до включения в исследование.

Во всех наблюдениях диагноз заболевания был подтвержден данными ультразвукового исследования. Больные разделены на следующие группы в зависимости от локализации МУ: 1-я группа – интерстициально-субсерозная локализация ($n = 17$; 21,8 %), 2-я группа – субсерозная локализация ($n = 16$; 20,5 %), 3, 4 и 5-я группы – субмукозная, интерстициально-субмукозная и интерстициальная локализации (по 15 больных в каждой группе, или 19,2 %).

У 27 (34,6 %) женщин число МУ составило 4–6, у 36 (46,2 %) пациенток – 2–3 узла, у 15 (19,2 %) исследуемых – 1 узел.

Образцы крови брали утром перед завтраком из срединной локтевой вены и сразу же центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Сыворотку экстрагировали и хранили при температуре – 80 °C.

Сывороточное содержание растворимых молекул определяли иммуноферментным методом с помощью моноклональных антител серии ИКО (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина», Москва, Россия). При определении концентрации sCD54 и sCD50

использовали козы поликлональные антитела против лейкоцитарных антигенов человека и мышинные моноклональные антитела ИКО-60 и ИКО-184 против антигенов CD54 и CD50, конъюгированных с пероксидазой хрена. Содержание sCD95 определяли с использованием козы поликлональных антител к поверхностным антигенам и мышинных моноклональных антител ИКО-160 к антигену CD95, конъюгированному с пероксидазой хрена. Измерение проводили с помощью ридера Multiscan MC для иммуноферментного анализа (Labsystems, Финляндия) при длине волны 405 нм. Результаты выражали в условных единицах (усл. ед./мл).

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Для определения нормальности распределения использовали критерий Шапиро—Уилка. Дальнейший анализ проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты

Средняя концентрация растворимых молекул sCD95, sCD54 и sCD50 у всех больных ММ значимо превышала показатели в контрольной группе ($p < 0,05$) (табл. 1).

Обнаружено различие в содержании исследуемых растворимых белков в сыворотке крови в зависимости от расположения МУ (табл. 2).

В случаях преимущественной интерстициальной, интерстициально-субмукозной, субмукозной локализации МУ уровень sCD50 и sCD95 превышал соответствующие значения в контрольной группе ($p < 0,001$). При интерстициально-субмукозном и интерстициально-субсерозном расположении МУ содержание

растворимых молекул CD54 не отличалось от показателей здоровых лиц. У больных с преимущественной субсерозной локализацией МУ содержание тестируемых растворимых молекул было сопоставимо с контрольной группой.

Максимальная концентрация растворимых белков отмечена при преимущественной субмукозной локализации МУ. Уровень растворимых молекул CD95, CD50, CD54 в данной группе больных был от 2,1 до 2,48 раза выше показателей здоровых лиц ($p < 0,001$).

В нашем исследовании выявлено снижение сывороточного уровня sCD50, sCD54 и sCD95 на фоне роста числа МУ (табл. 3).

Наиболее высокая концентрация данных растворимых молекул зафиксирована у пациенток с 1 МУ. Уровень данных белков в этой группе больных был значимо выше контроля ($p < 0,001$) и в 1,6–2 раза превышал значения при наличии 3–4 новообразований в ММ.

Уровни растворимых молекул CD95 и sCD54 у больных с 4–6 МУ не отличались от показателей в контрольной группе ($p > 0,05$).

Обсуждение

В настоящей работе были определены изменения в концентрации растворимых молекул CD50, CD54 и CD95 в крови у пациенток с различной локализацией ММ и числом МУ. Функциональное значение данных растворимых молекул определяется их участием в иммунологических механизмах на разных этапах реализации воспалительного процесса. Молекулы адгезии ICAM-1 и ICAM-3 и их растворимые формы играют важную роль в миграции клеток иммунной системы в место повреждения. Одними из маркеров апоптотических процессов являются sCD95, и их содержание может характеризовать интенсивность процессов запрограммированной гибели клеток [12]. Обнаруженное повышенное содержание sCD50, sCD54 и sCD95 у всех обследованных больных ММ может указывать на усиленное высвобождение данных молекул клетками-продуцентами, несущими гомологичные рецепторы, и на возможную роль этих растворимых форм в иммунопатогенезе ММ. Кроме того, рост концентрации данных белков в циркуляции может свидетельствовать об активации и наличии системного воспаления при ММ.

При сравнительном анализе уровня исследуемых растворимых молекул в зависимости от локализации МУ обнаружено, что максимальная концентрация sCD50, sCD54 и маркеров апоптоза sCD95 характерна для пациенток с субмукозной ММ. В то же время при серозной ММ уровень тестируемых белков не отличался от контрольной группы. Можно предположить, что для субмукозной локализации МУ свойственно развитие наиболее активного системного

Таблица 1. Содержание растворимых дифференцировочных молекул CD95, CD54 и CD50 в сыворотке крови пациенток с миомой матки

Table 1. Serum concentration of soluble differentiation molecules CD95, CD54 and CD50 in patients with uterine fibroids

Растворимые молекулы, U/ml Soluble molecules, U/ml	Контрольная группа, n = 45 Control group, n = 45	Больные с миомой матки, n = 78 Patients with uterine fibroids, n = 78
sCD95	374,3 $\pm$ 23,8	507,4 $\pm$ 49,8; $p = 0,001^*$
sCD54	65,3 $\pm$ 10,4	79,5 $\pm$ 11,8; $p = 0,001^*$
sCD50	353,7 $\pm$ 48,2	556,3 $\pm$ 61,0; $p = 0,001^*$

*Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

*Statistically significant differences compared to the control group ($p < 0.05$).

Таблица 2. Содержание sCD50, sCD54 и sCD95 в сыворотке крови больных с различной локализацией миоматозных узлов

Table 2. Concentration of sCD50, sCD54 and sCD95 in blood serum in patients with different localization of myomatous nodes

Исследуемая группа, n Study group, n	Содержание растворимых молекул, U/ml Soluble molecules content, U/ml		
	sCD50	sCD54	sCD95
Контрольная группа, n = 45 Control group, n = 45	353,7 ± 48,2	65,3 ± 10,4	374,3 ± 23,8
Группы пациенток в зависимости от локализации миоматозных узлов Patient groups depending on the localization of myomatous nodes			
интерстициальная, n = 15 interstitial, n = 15	591,9 ± 69,9; p = 0,001*	93,5 ± 9,9; p = 0,001*	483,1 ± 59,6; p = 0,001*
интерстициально-субмукозная, n = 15 interstitial-submucosal, n = 15	585,7 ± 59,1; p = 0,001*	71,7 ± 9,3; p = 0,19	468,5 ± 49,7; p = 0,001*
субмукозная, n = 15 submucosal, n = 15	877,1 ± 92,6; p = 0,001*	143,7 ± 19,1; p = 0,001*	783,7 ± 90,1; p = 0,001*
интерстициально-субсерозная, n = 17 interstitial-subserous, n = 17	451,1 ± 48,2; p = 0,001*	57,8 ± 8,3; p = 0,14	464,07 ± 58,9; p = 0,001*
субсерозная, n = 16 subserosal, n = 16	334,2 ± 36,7; p = 0,15	55,8 ± 6,8; p = 0,12	355,1 ± 41,5; p = 0,21

*Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой (p < 0,05).

*Statistically significant differences compared to the control group (p < 0.05).

Таблица 3. Содержание sCD50, sCD54 и sCD95 в сыворотке крови пациенток с миомой матки в зависимости от числа миоматозных узлов (МУ)

Table 3. Serum concentrations of sCD50, sCD54 and sCD95 in patients with uterine fibroids depending on the number of myomatous nodes (MN)

Растворимые молекулы, U/ml Soluble molecule, U/ml	1 МУ 1 MN n = 15	2–3 МУ 2–3 MN n = 36	4–6 МУ 4–6 MN n = 27	Контрольная группа Control group
sCD95	617,4 ± 60,2; p = 0,001*	469,1 ± 40,2; p = 0,001*	371,9 ± 33,7; p = 0,72	374,3 ± 23,8
sCD50	726,4 ± 83,1; p = 0,001*	500,8 ± 49,8; p = 0,001*	397,2 ± 56,3; p = 0,015*	353,7 ± 48,2
sCD54	118,3 ± 21,3; p = 0,001*	92,4 ± 14,1; p = 0,001*	57,7 ± 8,3; p = 0,35	65,3 ± 10,4

*Статистически значимые различия в сравнении с контрольной группой (p < 0,05).

*Statistically significant differences compared to the control group (p < 0.05).

воспалительного ответа, которое сопровождается усиленным высвобождением sCD50, sCD54 и sCD95 в периферической крови у пациенток с ММ.

Одним из основных механизмов иммуномодулирующего действия растворимых форм дифференцировочных молекул является связывание лиганда и предотвращение его взаимодействия с мембранной формой рецептора [12]. Растворимые молекулы sICAM-1 и sICAM-3 могут ингибировать активацию, адгезию и миграцию клеток. Возможно, избыточная продукция циркулирующих молекул sICAM-1 и sICAM-3 может быть частью рестриктивного

механизма, направленного на торможение чрезмерной миграции воспалительных клеток во флогогенный участок, и в итоге способна привести к нарушению адекватного иммунного ответа при ММ. Повышенное содержание растворимых CD95 молекул может быть причиной устойчивости клеток к Fas-зависимому апоптозу, поскольку sCD95 способны ингибировать апоптоз Fas-положительных клеток [12]. Таким образом, увеличение данных растворимых молекул отражает как активность воспаления, так и направленность к подавлению интенсификации этого процесса.

В нашей работе также был проведен анализ содержания тестируемых растворимых молекул в зависимости от числа МУ. Наиболее высокий уровень всех исследуемых белков в сыворотке крови обнаружен у пациенток с 1 МУ. По мере увеличения числа новообразований сывороточная концентрация sCD50, sCD54 и sCD95 белков снижалась. При этом уровень апоптотического маркера и sCD54 у больных с 4–6 МУ не отличались от контрольной группы. Вероятно, что с увеличением числа МУ происходит угнетение функциональной активности клеток-продуцентов данных белков в результате нарастания фиброзирующих процессов в ткани матки. Снижение сывороточного уровня sCD95 молекул до нормальных значений при росте количества новообразований мо-

жет привести к нарушению эффективной реализации механизмов Fas-зависимой программируемой клеточной гибели, что в конечном счете может создать условия для прогрессирования апоптоза патогенетически значимых клеток и неадекватного иммунного ответа при ММ.

Заключение

В настоящем исследовании обнаружено среднестатистическое увеличение содержания растворимых молекул CD50, CD54 и CD95 в крови у пациенток с ММ, что свидетельствует об их участии в иммунопатогенезе данного заболевания. Максимальная концентрация указанных белков зафиксирована у пациенток с субмукозной локализацией ММ и наличием 1 МУ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mathew R.P., Francis S., Jayaram V., Anvarsadath S. Uterine leiomyomas revisited with review of literature. *Abdom Radiol (NY)* 2021;46(10):4908–26. DOI: 10.1007/s00261-021-03126-4
- Dvorská D., Škovierová H., Braný D. et al. Liquid biopsy as a tool for differentiation of leiomyomas and sarcomas of corpus uteri. *Int J Mol Sci* 2019;20(15):3825. DOI: 10.3390/ijms20153825
- AlAshqar A., Reschke L., Kirschen G.W., Borahay M.A. Role of inflammation in benign gynecologic disorders: from pathogenesis to novel therapies. *Biol Reprod* 2021;105(1):7–31. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iaab054>
- Sahar T., Nigam A., Anjum S. et al. Interactome analysis of the differentially expressed proteins in uterine leiomyoma. *Anticancer Agents Med Chem* 2019;19(10):1293–312. DOI: 10.2174/1871520619666190206143523
- Governini L., Marrocco C., Semplici B. et al. Extracellular matrix remodeling and inflammatory pathway in human endometrium: insights from uterine leiomyomas. *Fertil Steril* 2021; 116 (5): 1404–14. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2021.06.023
- Protic O., Toti P., Islam M.S. et al. Possible involvement of inflammatory/reparative processes in the development of uterine fibroids. *Cell Tissue Res* 2016;364(2):415–27. DOI: 10.1007/s00441-015-2324-3
- Zannotti A., Greco S., Pellegrino P. et al. Macrophages and immune responses in uterine fibroids. *Cells* 2021;10(5):982. DOI: 10.3390/cells10050982
- Szydłowska I., Grabowska M., Nawrocka-Rutkowska J. et al. Markers of inflammation and vascular parameters in selective progesterone receptor modulator (ulipristal acetate)-treated uterine fibroids. *J Clin Med* 2021;10(16):3721. DOI: 10.3390/jcm10163721
- Малышкина А.И., Сотникова Н.Ю., Посисеева Л. В., Анциферова Ю.С. Прогностическое значение иммунологического исследования перитонеальной жидкости у больных миомой матки. *Медицинская иммунология* 2005;7(4):437–40. DOI: 10.15789/1563-0625-2005-4-437-440.
- Malyshkina A.I., Sotnikova N.J., Posiseeva L.V., Antzyferova J.S. Immune parameters of the peritoneal fluid in uterine myoma. Prognostic relevance. *Medicinskaja immunologija = Medical Immunology (Russia)* 2005;7(4):437–40. (In Russ.). DOI: 10.15789/1563-0625-2005-4-437-440
- Konenkov V.I., Koroleva E.G., Orlov N.B. et al. Blood serum levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8, IL-12p70, and IFN γ) in patients with uterine myoma. *Bull Exp Biol Med* 2018;165(5):698–701. DOI: 10.1007/s10517-018-4245-0
- Sikorski R., Kapeć E., Zaleska W. Serum levels of proinflammatory cytokines in women with uterine myomas. *Ginekol Pol* 2001;72(12A):1485–8. PMID: 11883301
- Novikov V.V., Karaulov A.V. Storm of soluble differentiation molecules in COVID-19. *Immunologiya* 2022;43(4):458–67. DOI: 10.33029/0206-4952-2022-43-4-458-467
- Bleijis D.A., Geijtenbeek T.B., Figdor C.G., van Kooyk Y. DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand. *Trends Immunol* 2001;22(8):457–63. DOI: 10.1016/S1471-4906(01)01974-3
- Wu M., Tong X., Wang D. et al. Soluble intercellular cell adhesion molecule-1 in lung cancer: A meta-analysis. *Pathol Res Pract* 2020;216(10):153029. DOI: 10.1016/j.prp.2020.153029
- Kovács P., Joó J.G., Tamás V. et al. The role of apoptosis in the complex pathogenesis of the most common obstetrics and gynaecology diseases. *Physiol International* 2020;107(1):106–19. DOI: 10.1556/2060.2020.00014
- Guégan J.P., Ginestier C., Charafe-Jauffret E. et al. CD95/Fas and metastatic disease: What does not kill you makes you stronger. *Semin Cancer Biol* 2020;60:121–31. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.004
- Basta P., Mach P., Pitynski K. et al. Differences in the blood serum levels of soluble HLA-G concentrations between the menstrual cycle phases and menopause in patients with ovarian endometriosis and uterine leiomyoma. *Neuro Endocrinol Lett* 2009;30:91–8. PMID: 19300397
- Мамаева М.Е., Новиков Д.В., Алясова А.В. и др. Содержание олигомерной и суммарной фракций растворимых молекул CD38 в сыворотке крови больных миомой матки.

Современные технологии в медицине 2014;6(4):140.
 Mamaeva M.E., Novikov D.V., Alyasova A.V. et al. The content of oligomeric and total fractions of soluble CD38 molecules in blood serum of patients with hysteromyoma. *Sovremennye tehnologii v medicine = Modern Technologies in Medicine* 2014;6(4):140. (In Russ.).

19. Мамаева М.Е., Шумилова С.В., Казацкая Ж.А. и др.
 Сывороточное содержание растворимых молекул HLA

I класса и HLA-DR у больных патологией шейки и тела матки. *Современные технологии в медицине* 2014;6(2):85.

Mamaeva M.E., Shumilova S.V., Kazatskaya Zh.A. et al. The content of soluble HLA Class I and HLA-DR molecules in serum in patients with uterine cervix and body pathology. *Sovremennye tehnologii v medicine = Modern Technologies in Medicine* 2014;6(2):85. (In Russ.).

Вклад авторов

A.B. Алясова: концепция и разработка дизайна исследования, анализ и статистическая обработка результатов, написание текста рукописи, редактирование;

M.E. Мамаева: концепция и разработка дизайна исследования, проведение исследования, анализ и статистическая обработка результатов, написание текста рукописи, редактирование;

N.I. Кубышева: анализ и статистическая обработка, написание текста рукописи, редактирование;

V.V. Новиков: концепция и дизайн исследования, написание текста рукописи, редактирование.

Author's contributions

A.V. Alyasova: conception and design of the study, analysis and statistical processing of the results, writing the text of the manuscript, editing;

M.E. Mamaeva: conception and design of the study, conducting research, analysis and statistical processing of the results, writing the text of the manuscript, editing;

N.I. Kubysheva: analysis and statistical processing, writing the text of the manuscript, editing;

V.V. Novikov: the concept and design of the study, writing the text of the manuscript, editing.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.B. Алясова / A.V. Alyasova: <https://orcid.org/0000-0003-2621-0359>

M.E. Мамаева / M.E. Mamaeva: <https://orcid.org/0000-0001-5961-7986>

N.I. Кубышева / N.I. Kubysheva: <https://orcid.org/0000-0002-5582-5814>

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

Конфликт интересов. Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Funding. The study was performed with out external funding.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты дали письменное информированное согласие на использование образцов крови в исследовательских целях.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to the use of their blood samples for research aims.

Статья поступила: 10.01.2024. Принята в печать: 20.08.2024. Опубликовано онлайн: .

Article received: 10.01.2024. Accepted for publication: 20.08.2024. Published online: .

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-47-56>

Действие штамма Р-92 реовируса человека на опухолевые клеточные линии

С.Ю. Филиппова¹, А.О. Ситковская¹, И.В. Межевова¹, Е.Ю. Златник¹, И.А. Новикова¹,
Л.Ю. Владимирова¹, Ю.В. Пржедецкий¹, Е.А. Дженкова¹, С.А. Колпаков², Е.П. Колпакова²,
Е.Ю. Кириченко³, А.К. Логвинов⁴

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

²ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора; Россия, 344000 Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119;

³ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет»; Россия, 344000 Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1;

⁴ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»; Россия, 344006 Ростов-на-Дону, ул. Б. Садовая, 105/42

Контакты: Ирина Валентиновна Межевова mezhevova88@gmail.com

Введение. Среди всех новых методов и подходов высокую эффективность в различных фазах клинических испытаний и хорошую переносимость пациентами показывает виротерапия онколитическими вирусами как в сочетании с иммунотерапией, так и без нее.

Цель – исследовать чувствительность некоторых иммортализованных клеточных линий рака к штамму Р-92 реовируса человека с характеристикой клеток на ультраструктурном уровне.

Материалы и методы. Исследование проводили на клеточных линиях HeLa, A549 и U87MG. Клетки высаживали по 15 тыс. на лунку 96-луночного планшета и после адгезии проводили инокуляцию вируса внесением среды, содержащей частицы вируса в четырех 10-кратных разведениях (примерно 10^9 – 10^6 частиц на 1 мл), культивировали 24 ч. После чего определяли количество живых клеток в лунках непрямым способом с применением метилтетразолиевого теста. Для изучения ультраструктуры зараженных вирусом клеток культуры высевали во флакон T25, проводили инокуляцию вирусом в максимальной концентрации. Спустя 24 ч культивирования клетки фиксировали в 2,5 % растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере в течение 1 ч, после чего трижды отмывали в фосфатном буфере и проводили образцы для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) по стандартной методике.

Результаты. Разведение вируса в 1000 раз приводило к снижению цитостатического эффекта во всех 3 культурах до уровня, практически не отличающегося от контроля. Наиболее чувствительной к реовирусу культурой оказалась HeLa. В эксперименте количество живых клеток сократилось до $60,4 \pm 10,2$ % по сравнению с контролем при инкубации с максимальным количеством вирусных частиц и до $63,7 \pm 16,2$ % – при 10-кратном разведении вируса. Данный показатель был достоверно ниже, чем в 2 других исследуемых культурах при данных условиях культивирования ($p < 0,001$). Кроме того, при максимальной концентрации вируса культура A549 оказалась менее чувствительной, чем культура U87MG ($p < 0,01$). При меньших концентрациях вирусных частиц значения средней жизнеспособности исследуемых клеточных линий достоверно не различались между собой. Анализ электронограмм показал, что вирус успешно реплицируется в цитоплазме исследуемых культур, однако не выделяется из клетки, что связано, видимо, с коротким периодом инкубации. На ТЭМ также были видны повреждения клеток, характерные для апо- или некроптоза, однотипно выраженные во всех исследованных культурах.

Закключение. Клеточные линии A549, HeLa и U87MG по результатам метилтетразолиевого теста демонстрируют разную чувствительность к штамму реовируса человека Р-92. Картина ТЭМ клеток зараженных культур продемонстрировала признаки развития апо- или некроптоза.

Ключевые слова: виротерапия, онколитические вирусы, реовирус, клеточная линия

Для цитирования: Филиппова С.Ю., Ситковская А.О., Межевова И.В. и др. Действие штамма Р-92 реовируса человека на опухолевые клеточные линии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):47–56.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-47-56>

Effect of human reovirus strain R-92 on tumor cell lines

Svetlana Yu. Filippova¹, Anastasiya O. Sitkovskaya¹, Irina V. Mezhevova¹, Elena Yu. Zlatnik¹, Inna A. Novikova¹, Lubov Yu. Vladimirova¹, Yuri V. Przhedetskiy¹, Elena A. Dzhenskova¹, Sergey A. Kolpakov², Elena P. Kolpakova², Evgeniya Yu. Kirichenko³, Alexander K. Logvinov⁴

¹National Medical Research Centre for Oncology; 63 14th line St., Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology, Rospotrebnadzor; 119 Gazetnij Pereulok, Rostov-on-Don 344000, Russia;

³Donskoy State Technical University; 1 Gagarin Square, Rostov-on-Don 344000, Russia;

⁴Southern Federal University; 105/42 B. Sadovaya St., Rostov-on-Don 344006, Russia

Contacts: Irina Valentinovna Mezhevova mezhevova88@gmail.com

Background. Among all the new methods and approaches, virotherapy with oncolytic viruses, both in combination with immunotherapy and without it, shows high efficiency in various phases of clinical trials and good tolerance by patients.

Aim. To study the sensitivity of some immortalized cancer cell lines to the R-92 strain of human reovirus with cell characteristics at the ultrastructural level.

Materials and methods. The study was carried out on cell lines of HeLa, A549, U87MG. Cells were planted in an amount of 15 thousand per well of a 96-well plate and after adhesion, the virus was inoculated by adding a medium containing virus particles in 4 tenfold dilutions (approximately 10^9 – 10^6 particles per ml). Next, the cells were cultured for 24 h, after which the number of living cells in the wells was determined indirectly using the methyl tetrazolium test, which was carried out according to standard methods. To study the ultrastructure of infected cells, cells were seeded into a T25 flask and inoculated with the virus at the maximum concentration. After 24 h of cultivation, the cells were fixed in a 2.5 % glutaraldehyde solution in phosphate buffer for 1 h, after which they were washed three times in phosphate buffer and samples were processed for TEM according to standard methods.

Results. Diluting the virus 1000 times led to a decrease in the cytostatic effect in all three cultures to a level practically no different from the control. HeLa turned out to be the most sensitive culture to reovirus. In the experiment, the number of living cells decreased to 60.4 ± 10.2 % compared to the control during incubation with the maximum number of viral particles and to 63.7 ± 16.2 % with a tenfold dilution of the virus. This indicator was significantly lower than in the other two studied cultures under these cultivation conditions ($p < 0.001$). In addition, at the maximum virus concentration, the A549 culture was less sensitive than the U87MG culture ($p < 0.01$). At lower concentrations of viral particles, the average viability of the studied cell lines did not differ significantly from each other. Analysis of electron diffraction patterns showed that the virus successfully replicates in the cytoplasm of the studied cultures, but is not released from the cell, which is apparently due to the short incubation period. TEM also showed cell damage characteristic of apoptosis or necroptosis, uniformly expressed in all studied cultures.

Conclusion. Cell lines A549, HeLa and U87MG, according to the results of the methyl tetrazolium test, demonstrate different sensitivity to the human reovirus strain P-92. The TEM picture of cells from infected cultures showed signs of the development of apoptosis or necroptosis.

Keywords: virotherapy, oncolytic viruses, reovirus, cell line

For citation: Filippova S.Yu., Sitkovskaya A.O., Mezhevova I.V. et al. Effect of human reovirus strain R-92 on tumor cell lines. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):47–56.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-47-56>

Введение

Одной из причин высокой смертности населения после сердечно-сосудистых заболеваний, как в России, так и в мире, являются онкологические заболевания. В нашей стране, несмотря на весь достигнутый прогресс, в профилактических и диагностических мероприятиях выявляется около полумиллиона злокачественных новообразований в год [1]. В борьбе с онкопатологией медицинскими работниками используется весь арсенал традиционных методов лечения рака (хирургическое лечение, лучевая терапия, химио-, иммуно- и таргетная терапия), и у большинства пациентов возникает стойкий ответ на лечение. Однако недостатком таких лечебных мероприятий

являются серьезные побочные эффекты, и часто возникает вопрос переносимости терапии пациентами [2]. В последние десятилетия исследователи активно борются с этими недостатками и разрабатывают новые подходы к лечению и снижению побочных эффектов у больных, проходящих тот или иной вид медицинского вмешательства.

Терапия онколитическими вирусами (ОЛВ) является перспективным направлением и активно изучается исследователями разных стран уже много лет. В 2004 г. в Латвии был одобрен 1-й препарат на основе энтеровируса группы ECHO Rignvir для лечения меланомы, за ним последовал Oncorine для лечения рака головы и шеи. Одним из первых препаратов

на основе ОЛВ, который был одобрен для лечения меланомы в США, а затем в Европейском Союзе, стал Talimogene laherparepvec, известный под коммерческим названием Imlygic, полученный на основе вируса простого герпеса 1 [3]. Известно также о клинических исследованиях препарата Реха-Vec (JX-594) на основе рекомбинантного штамма вируса осповакцины. В исследовании NCT02562755 проверяется эффективность Реха-Vec против гепатоцеллюлярной карциномы в сочетании с софатинибом, а в NCT02630368 — в сочетании с циклофосфамидом для лечения саркомы мягких тканей и распространенного рака молочной железы. В России также ведутся разработки в области виротерапии. В частности, доклинические исследования прошел препарат Канцеролизин, разработанный в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» на основе аденовируса 5-го серотипа [4]. В экспериментах на клеточных культурах и лабораторных животных проводятся исследования противоопухолевой активности энтеровирусов [5], рекомбинантного парвовируса и вируса осповакцины [6] и других вирусов, однако до клинических исследований эти разработки еще не доведены.

Противоопухолевую активность ОЛВ проявляют 2 путями: лизисом клеток опухоли (онколиз) или стимулированием клеток иммунной системы. После проникновения вируса в клетку ОЛВ самореплицируются, вирусные копии проникают далее в окружающие опухолевые клетки, что приводит к разрушению большей части опухолевого очага. Из-за опухолеспецифических особенностей клеток рака или генетических модификаций вируса некоторые ОЛВ избирательно реплицируются только в клетках опухоли и не проявляют цитотоксичности к здоровым клеткам, как было показано, в том числе и в наших работах [7]; также ОЛВ активируют врожденную и адаптивную иммунную систему, вызывая иммуногенную гибель опухолевых клеток [3]. Вирусы, используемые в настоящее время в качестве онколитических агентов, включают рео-, аденовирусы, вирус простого герпеса, вирус Коксаки, вирус коровьей оспы, вирус кори и вирус болезни Ньюкасла [8]. Реовирус млекопитающих (*Orthoreovirus*) является одним из 9 родов семейства *Reoviridae* и обладает наиболее широким кругом хозяев среди представителей данного семейства. Название «реовирус» произошло от аббревиатуры «рео» (respiratory enteric orphan — reo) в связи с тем, что он обычно выделяется из дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта человека; инфекция, как правило, имеет доброкачественное течение. Реовирус является одним из нескольких встречающихся в природе вирусов, которые, как было показано в ранних клинических исследованиях, обладают онколитическим потенциалом в отношении ряда трансформированных клеточных линий человека, клеточных линий рака и опухолевой ткани *ex vivo*.

Реовирус, так же, как и другие ОЛВ, инфицирует опухолевые клетки и разрушает их путем прямого онколиза, активирует противоопухолевый ответ Т-клеток, действуя таким образом и на метастазы [9]. Избирательная репликация вирусов в клетках опухоли и их лизис приводит к высвобождению растворимых антигенов (АГ), цитокинов, таких как интерфероны типа I (ИФН- γ) и фактор некроза опухоли α (ФНО- α). Эти цитокины управляют противоопухолевым иммунитетом, индуцируя созревание антигенпрезентирующих клеток, которые, в свою очередь, активируют клетки — натуральные киллеры, CD4⁺- и CD8⁺-Т-клетки, способствуя регрессии опухоли даже в местах, удаленных от первичного очага [3]. Таким образом, кроме непосредственного онколитического действия, перспективным направлением использования реовирусов для лечения опухолей может быть повышение эффективности противоопухолевых дендритно-клеточных (ДК) вакцин. Ранее мы уже исследовали возможность применения штамма реовируса Р-92, выделенного в ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора [10], в качестве адъюванта для получения ДК-вакцин. Данный штамм реовируса, выделенный в 1992 г., является непатогенным, депонирован в коллекции Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (номер ГКВ № 2363). Штамм Р-92 охарактеризован электронно-микроскопическими, серологическими методами и полимеразной цепной реакцией как относящийся предположительно к 3-му серотипу реовируса [10]. Мы обнаружили, что добавление данного штамма к культуре HeLa в качестве АГ способствует активации и созреванию ДК, а также снижению доли иммуносупрессивных Т-регуляторных клеток при сокультивировании полученных ДК с лимфоцитами. Кроме того, под действием реовируса наблюдается усиление цитолитической активности активированных таким образом лимфоцитов в отношении клеток HeLa [11, 12]. Наблюдаемый эффект может быть использован для совершенствования процесса получения ДК, что требует более детальных исследований лежащих в его основе молекулярных механизмов. Мы также установили, что данный штамм реовируса проявляет цитолитическую активность в отношении культур HeLa, рака молочной железы BT-20, рака предстательной железы PC3, колоректального рака HT29 и немелкоклеточного рака легкого A549 [13]. Признаки цитопатического действия вируса в виде ошаривания клеток и разрушения монослоя наблюдали уже через 24 ч после инокуляции, однако степень выраженности эффекта различалась между культурами. Через 48 ч в среде культивирования определяли большое количество вирусных частиц, что позволило предположить: наблюдаемый цитопатический эффект

связан с вызванным размножением вируса лизисом клеток.

В настоящем исследовании мы расширили круг тестируемых клеточных линий рака и провели количественное измерение их чувствительности к штамму Р-92 реовируса человека. Определили наиболее чувствительную клеточную линию и оптимальную дозу вирусных частиц для дальнейших молекулярно-генетических исследований и изучения возможности более широкого применения реовируса в качестве противоопухолевого агента и перспективного адъюванта для получения ДК вакцин. Мы выбрали экспозицию 24 ч, так как именно в этом промежутке времени наблюдаются наибольшие различия в цитопатическом эффекте между культурами. Кроме того, для изучения связи между размножением вируса и гибелью клеток в культуре при данной экспозиции мы охарактеризовали ультраструктурное строение зараженных клеток методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ).

Материалы и методы

Клеточные культуры рака шейки матки HeLa, аденокарциномы легкого A549 и глиобластомы U87MG культивировали в полной питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10 % фетальную бычью сыворотку (Hyclone, США), 1 % незаменимых аминокислот (Gibco, США), 1 % L-глутамин (Gibco, США), 1 % пенициллин-стрептомицина («Биолот», Россия), во влажной атмосфере при 37 °C, 5 % CO₂. Каждую культуру высевали в 96-луночный плоскостонный планшет в количестве 15 тыс. клеток на лунку. После адгезии клеток среду отбирали и вносили 10 мкл среды с реовирусом человека штамм Р-92 (в среде без добавления сыворотки) в четырех 10-кратных разведениях, начиная от максимальной концентрации, равной примерно 10⁹ действующих частиц на 1 мл. Данная концентрация была предварительно подсчитана на культуре почки эмбриона свиньи перед помещением образцов вируса на хранение в ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора [10]. Контроль — клетки без вируса. Клетки выдерживали 1 ч для адгезии вирусных частиц на клеточных мембранах и довели объем среды в лунках до 100 мкл. Затем клетки культивировали в течение 24 ч, после чего определяли количество живых клеток в лунках непрямым способом с применением метилтетразолиевого теста, который проводили по стандартной методике [14]. Жизнеспособность определяли по следующей формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = 100 \times (\text{ОП}_0 / \text{ОП}_k),$$

где ОП₀, ОП_к — оптическая плотность при 540 нм в опытных и контрольных лунках соответственно.

Каждый вариант опыта поставили в 15 повторях. Всего эксперимент провели 3 раза. Статистическая обработка включала вычисление средних значений жизнеспособности и стандартных отклонений от среднего. Сравнение средних значений проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента. В исследовании принят уровень значимости α , равный 0,01.

Для исследования при помощи ТЭМ культуры высевали на флаконе Т25, после адгезии проводили заражение вирусом в максимальной концентрации в 500 мкл среды без добавления сыворотки в течение 1 ч, далее довели объем среды с сывороткой до 3 мл и инкубировали еще 24 ч. По окончании инкубации клетки снимали с флакона при помощи скребка, затем центрифугировали 5 мин при относительном центробежном ускорении 300 g и фиксировали осадок в 2,5 % растворе глутарового альдегида в фосфатном буфере. Клетки выдерживали в растворе фиксатора в течение 1 ч, после чего трижды отмывали в фосфатном буфере и проводили образцы для ТЭМ по стандартной методике [15]. Изображения ультратонких срезов получали на электронном микроскопе Jem 1011 (Jeol, Япония).

Результаты и обсуждение

Реакция тестируемых культур спустя 24 ч культивирования зависела от дозы вируса. Разведение вируса в 1000 раз приводило к снижению цитостатического эффекта во всех 3 культурах до уровня, практически не отличающегося от контроля (табл. 1). При высоких вирусных нагрузках исследуемые культуры показали разную чувствительность к штамму реовируса Р-92. Наиболее чувствительной при максимальной концентрации вирусных частиц оказалась культура HeLa, в которой количество живых клеток сократилось до 60,4 ± 10,2 % по сравнению с контролем без добавления вируса. При этом разница средних значений жизнеспособности оказалась достоверной как с показателем культуры A549 (81,02 ± 7,8 %; $p < 0,001$), так с показателем культуры U87MG (72,9 ± 5,2 %; $p < 0,001$). При 10-кратном разведении вируса культура HeLa также показала наименьшую жизнеспособность (63,7 ± 16,2 %), что было достоверно ниже, чем в культурах A549 (78,6 ± 10,7 %; $p < 0,01$) и U87MG (78,8 ± 9,6 %; $p < 0,01$). Кроме того, при максимальной концентрации вируса культура A549 оказалась менее чувствительной, чем культура U87MG ($p < 0,01$). При разведениях вирусных частиц в 100 и 1000 раз средние значения жизнеспособности исследуемых клеточных линий достоверно не различались между собой.

Тот факт, что цитостатический эффект от добавления вируса оказался пропорционален его концентрации, говорит об отсутствии при данных условиях эксперимента значимого вторичного заражения

Таблица 1. Значения жизнеспособности клеток тестируемых культур при культивировании в течение 24 ч после инокуляции штаммом реовируса P-92

Table 1. Cell integrity values of the tested cultures when cultivated for 24 h after inoculation with the reovirus strain P-92

Культура Cell line	Кратность разведения вируса, % Virus dilution factor, %			
	1	10	100	1000
HeLa	60,4 ± 10,2	63,7 ± 16,2	91,61 ± 18,5	93,71 ± 10,7
A549	81,02 ± 7,8	78,6 ± 10,7	87,79 ± 11,8	94,76 ± 10,2
U87MG	72,9 ± 5,2	78,8 ± 9,6	89,78 ± 7,5	99,1 ± 5,4

клеток. При вторичном заражении, размножившись в 1 клетке, вирусные частицы выходят из нее и заражают другие клетки, вызывая лавинообразное нарастание количества погибших клеток, деструкцию монослоя и разрушение клеток культуры в лунке целиком даже при небольшой изначальной концентрации вируса в среде, чего в нашем эксперименте не наблюдалось. Вероятно, выявленная нами цитостатическая активность вируса в большей степени связана с реакцией внутриклеточных защитных механизмов на попадание в цитоплазму большого количества вирусных частиц. Тем не менее гипотеза об отсутствии вторичного заражения требует подтверждения в экспериментах с титрованием вирусных частиц из супернатанта зараженных культур. Помимо иммунного ответа на вирусы, развивающегося в условиях целостного организма и включающего активацию различных звеньев иммунной системы, не относящиеся к ней клетки, в том числе культивируемые, тоже имеют противовирусную защиту. Эта защита проявляется в виде активации ряда внутриклеточных сигнальных каскадов, приводящих к апоптозу в ответ на вирусное заражение. Известно, что распознавание геномной двуцепочечной РНК реовируса приводит к индукции синтеза ИФН I типа [9]. Описана ИФН-зависимая активация участвующих в программируемой клеточной гибели генов *ISG54* (*IFIT2*) и *ISG12b2* [16]. Кроме того, имеются данные о существовании не связанных с ИФН I типа событиях, приводящих к клеточной гибели на ранних стадиях заражения клетки, например о непосредственном встраивании высвобождающегося из вирусных частиц при входе в клетку вирусного белка $\mu 1$ в митохондриальные мембраны, что приводит к их дестабилизации и выходу в цитоплазму проапоптотических белков цитохрома С и SMAC/DIABLO, которые далее активируют каспазу-9 и осуществляют апоптоз [17]. Наблюдаемую у культуры A549 относительно более высокую, чем у культур HeLa и U87MG, устойчивость к цитостатическому действию вируса можно объяснить дефицитом одного из описанных ранее механизмов или различной тропностью вируса

к ним. Известно, что в некоторых культурах рака молочной железы прочность взаимодействия вируса с сиаловыми кислотами, являющимися рецепторами для реовирусов, снижается из-за наличия протеолитических ферментов, разрушающих белки капсида [18]. Кроме того, снижение количества сиаловых кислот на клеточных мембранах способно снижать способность вирусов к заражению клеток само по себе.

Таким образом, результаты теста на цитотоксическое действие вируса не дали однозначного ответа на вопрос о том, способен ли тестируемый штамм реовируса размножаться в клетках исследуемых культур, поэтому мы дополнительно исследовали ультраструктуру зараженных клеток с помощью ТЭМ. Результаты исследования показали, что в цитоплазме клеток всех 3 культур наблюдаются типичные признаки размножения вируса. Так, в культуре HeLa, показавшей наибольшую чувствительность к вирусу, практически во всех клетках на препаратах для ТЭМ в области цитоплазмы, окружающей ядро клетки, обнаруживали обширные области так называемых вирусных фабрик, или вироплазм (рис. 1, а, б), типичных по своему строению для реовирусов [19]. В наименее чувствительной культуре A549 наблюдали только небольшие скопления в единичных клетках (см. рис. 1, в, г), в то время как в культуре U87MG, демонстрирующей среднюю чувствительность к вирусу, обнаруживали обширные области вироплазмы (см. рис. 1, д, е). Вирусные фабрики реовирусов представляют собой не окруженные мембраной электронно-плотные компартменты цитоплазмы, в которых происходит сборка вирусных частиц из синтезируемых здесь же молекул вирусных белков и РНК [20]. Такие структуры служат для защиты белков и нуклеиновых кислот вируса от клеточных ферментов и взаимодействия с интерферирующими РНК. Известно, что изначально небольшие островки вирусных фабрик реовирусов формируются ближе к клеточной мембране, где начинается синтез вирусных РНК и белков сразу после проникновения вируса в клетку, позже отдельные островки двигаются к ядру, где сливаются в крупные облака, в которых начинают

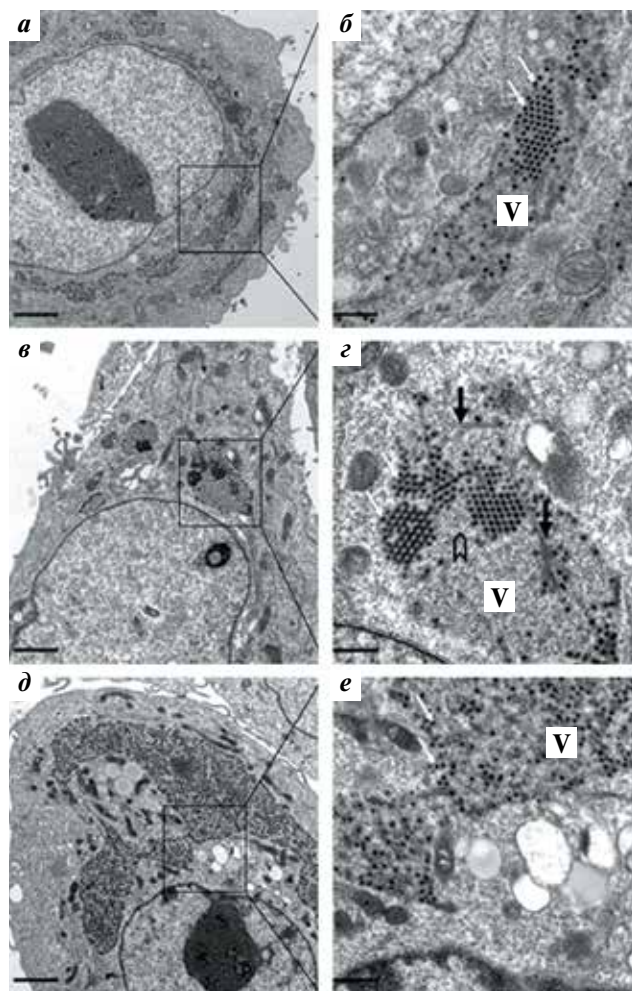


Рис. 1. Реовирус Р-92 в клетках исследуемых клеточных линий: а, б – культура HeLa; в, г – культура A549; д, е – культура U87MG. Размерная шкала, мкм: а, в, д – 2; б, г, е – 0,5. Обозначения: V – вироплазма; белые стрелки – вирусные структуры; черные заполненные стрелки – микротрубочки; черные пустотелые стрелки – фрагменты эндоплазматического ретикулума

Fig. 1. Reovirus R-92 in cells of the studied cell lines: а, б – HeLa culture; в, г – culture A549; д, е – culture U87MG. Dimensional scale, μm : а, в, д – 2; б, г, е – 0.5. Designations: V – viroplasm; white arrows – viral structures; black filled arrows – microtubules; black hollow arrows – fragments of the endoplasmic reticulum

образовываться и скапливаться уже зрелые вирусные частицы [21]. Вирусные структуры на полученных нами электронограммах отчетливо видны как округлые тела примерно 70–80 нм в диаметре, которые включены в вироплазмы как поодиночке, так в составе упорядоченных скоплений, напоминающих пчелиные соты (см. рис. 1). Зрелые частицы имеют электронно-плотную сердцевину из-за присутствия в них конденсированных молекул РНК вируса, в то время как незрелые частицы выглядят пустыми. Некоторые авторы предполагают, что по соотношению зрелых и незрелых частиц можно судить о чувствительности культуры к вирусу [19].

Кроме того, в составе вирусных фабрик, обнаруженных нами в цитоплазме всех исследуемых культур, наблюдаются фрагменты эндоплазматического ретикулума и микротрубочки (см. рис. 1, б, г, е). Согласно данным литературы, эти элементы цитоплазмы рекрутируются вирусом для сборки своих частиц [19, 22], при этом вирус использует внутренний сигнальный аппарат клетки для управления процессами перестройки эндоплазматического ретикулума, липосом и микротрубочек [21, 23].

Таким образом, штамм реовируса человека Р-92 успешно реплицируется в испытанных культурах, образуя типичные для данного рода вирусов структуры. На электронограммах не наблюдали признаков передвижения частиц вируса к плазмалемме или присутствия большого количества вирусов в межклеточном пространстве. Можно предположить, что везикулы с вирусами и отдельные вирусные частицы были утрачены во время подготовки препарата для ТЭМ, однако в препаратах все же встречаются многочисленные экстраклеточные везикулы, в которых тем не менее не содержатся вирусы (рис. 2, а). Помимо этого, очень редко встречаются отдельные частицы вируса вблизи плазмалеммы, о которых нельзя сказать, выделились ли они из зараженных клеток или остались на мембране после первичной инокуляции культуры (рис. 2, г). Следовательно, можно предположить, что на данной стадии заражения, а именно спустя 24 ч после инокуляции, вирус активно размножается в клетках культур HeLa и U87MG и в меньшей степени – A549, однако еще не покидает клетки.

Нужно отметить, что процесс выделения частиц реовируса из зараженных клеток остается малоизученным, большинство ученых сходятся во мнении о том, что выделение вируса не управляется какими-то специфическими сигнальными событиями, а происходит вместе с лизисом клеток [21]. Лизис клеток наступает вследствие апоптоза, запускаемого внешними сигналами через рецепторы смерти ФНО-R1, DR4/DR5 и Fas и соответствующими лигандами ФНО, TRAIL и FasL, взаимодействие которых способствует запуску реовирус-опосредованной каспазо-8-зависимой активации апоптоза. Кроме того, большое значение в связанной с размножением вируса смерти клеток играют внутренние сигналы, такие как классический митохондриальный путь апоптоза, который активируется во время инфекции посредством индуцированного клеточным стрессом расщепления белка Bid и следующей за этим активацией белка Bax, приводящей к нарушению структуры мембран митохондрий и высвобождению из них цитохрома С, способствующего активации каспазы 3 и клеточной гибели [17].

В зараженных культурах встречались ультраструктурные признаки клеточного стресса и контролируемой

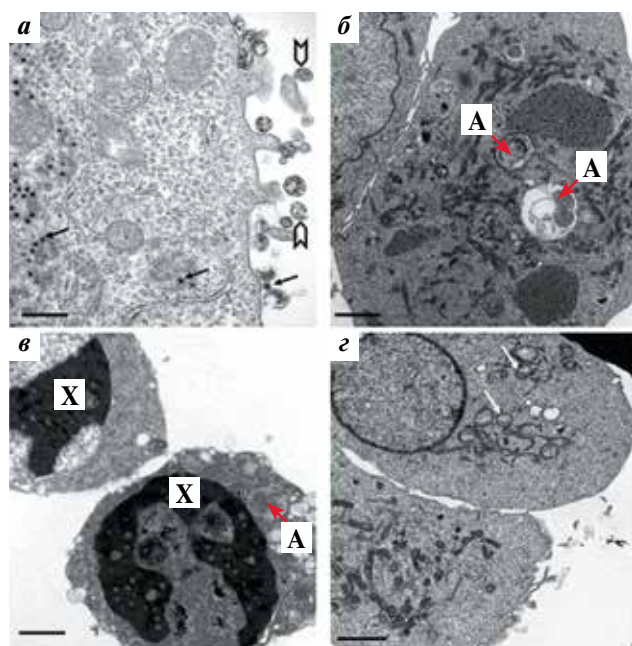


Рис. 2. Ультраструктурные характеристики клеток, зараженных реовирусом Р-92: а — выделение вирусных частиц из клетки, экзосомы в клетках культуры HeLa; б — аутофагосомы при ненарушенной структуре митохондрий в клетках культуры U87MG, характерные для ранней стадии апоптоза; в — конденсация цитоплазмы и ядра, конденсация хроматина в чашевидные образования, аутофагосомы в культуре HeLa, характерные для поздней стадии апоптоза; г — потеря микровыростов мембраны, набухание митохондрий в клетках культуры U87MG, характерные для некроптоза. Размерная шкала, мкм: а — 0,5; б, г — 2; в — 1. Обозначения: А — аутофагосома; X — конденсированный хроматин; белые стрелки — набухшие митохондрии; черные стрелки — частицы вируса; черные пустотелые стрелки — экзосомы

Fig. 2. Ultrastructural characteristics of cells infected with reovirus R-92: а — isolation of viral particles from cells, exosomes in HeLa culture cells; б — autophagosomes with undisturbed mitochondrial structure in U87MG culture cells, characteristic of the early stage of apoptosis; в — condensation of the cytoplasm and nucleus, condensation of chromatin into cup-shaped formations, autophagosomes in HeLa culture, characteristic of the late stage of apoptosis; г — loss of membrane microgrowths, swelling of mitochondria in U87MG culture cells, characteristic of necroptosis. Size scale, μm : а — 0.5; б, г — 2; в — 1. Designations: А — autophagosome; X — condensed chromatin; white arrows — swollen mitochondria; black arrows — virus particles; black hollow arrows — exosomes

гибели. Чаще всего мы наблюдали признаки раннего апоптоза, а именно присутствие в цитоплазме аутофагосом при ненарушенной структуре митохондрий (рис. 2, б) [24]. Более поздние стадии апоптоза наблюдали в культуре HeLa и единичных клетках 2 других исследованных культур: на электронограммах хорошо видны конденсация цитоплазмы и ядра, а также конденсация хроматина в чашевидные образования и формирование множественных аутофагосом, что характеризует данный тип запрограммированной клеточной гибели (рис. 2, в). Кроме того, в некоторых клетках культуры U87MG можно отметить признаки раннего некроптоза, такие как набухание мембраны и потеря микровыростов, как на

рис. 2 г, где рядом видны 2 клетки — с выростами и без таковых. При этом в клетке без микровыростов также наблюдается еще 1 признак раннего некроптоза — набухание митохондрий [24].

Ранее мы показали, что зараженные вирусом клетки культуры HeLa оказались более эффективными в качестве источника АГ для стимуляции ДК и последующего нацеливания и активации Т-клеток, чем лизат клеток этой же культуры, полученный традиционным методом многократного замораживания и оттаивания [11, 12]. С одной стороны, такое усиление активации ДК объясняется возможным увеличением продукции зараженными клетками HeLa таких цитокинов, как ИФН- γ и ФНО- α , управляющих созреванием ДК. Известно, что продукция этих и других цитокинов не является прерогативой иммунокомпетентных клеток, но может осуществляться и опухолевыми. С другой стороны, данный феномен объясняется высвобождением из зараженных клеток молекулярных фрагментов, ассоциированных с патогенами (PAMPs), и молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждением/опасностью (DAMPs). Природа взаимодействия этих сигналов с клеточными рецепторами ДК определяет генерацию костимулирующих молекул, таких как CD80, CD86, на ДК, взаимодействующих с CD28 на Т-клетках, и воспалительных цитокинов, которые стимулируют и поддерживают экспансию и дифференцировку Т-клеток. Без согласованного совместного действия этих факторов вместо активации Т-клеток может развиться их анергия или иммунная толерантность. Более того, определенные PAMPs/DAMPs могут индуцировать продукцию различных цитокинов, приводя к поляризации ответа по пути активации Th1 или Th2 [25]. Известно, что состав DAMPs во многом зависит от типа клеточной гибели и причины, ее вызвавшей. Некроз, вызванный замораживанием и оттаиванием клеток, приводит к высвобождению большого количества DAMPs (внеклеточные кальретикулин, аденозинтрифосфорная кислота, амфотерин и др.) [26], однако наши предыдущие данные свидетельствуют о том, что полученный таким способом клеточный лизат значительно проигрывает по способности активировать ДК как зараженным реовирусом клеткам, так и самому вирусу. При этом, несмотря на то что реовирус активировал ДК, как и вирусный лизат, именно последний вариант вызывал более эффективную активацию CD8⁺-Т-лимфоцитов при их сокультивировании с ДК. Специфическая активность лизата из зараженных клеток HeLa может быть связана с процессами контролируемой клеточной гибели, которые мы наблюдали на ультраструктурном уровне — апо- и некроптозом. По некоторым данным литературы, именно контролируемая клеточная гибель под действием ОЛВ, сопровождающаяся выделением

в среду аденозинтрифосфорной кислоты, кальретикулина и амфотерина, является более иммуногенным ее вариантом [3].

По-видимому, присутствие реовируса в таком лизате оказывает адъювантный эффект вследствие его способности активировать ДК и усиливать цитотоксическую активность Т-клеток после сокультивирования с этими ДК за счет таких RAMPs, как двуцепочечная РНК вируса [6].

Заключение

Иммортализованные культуры злокачественных клеток по результатам метилтетразолиевого теста демонстрируют разную чувствительность к штамму реовируса человека Р-92 при экспозиции 24 ч. Сокращение

концентрации вирусных частиц до 10^6 частиц в 1 мл раствора для инокуляции практически полностью нивелировало цитостатические свойства вируса. Картина ТЭМ клеток зараженных культур продемонстрировала признаки развития апо- или некроптоза. Кроме того, во всех культурах показано размножение вирусных частиц. Мы предполагаем, что в первые 24 ч после инокуляции цитопатические свойства вируса в культурах A549, HeLa и U87MG в большей степени обусловлены работой клеточных механизмов противовирусной защиты или прямым повреждением клеточных структур белками вируса при высокой вирусной нагрузке, чем процессами, связанными с размножением вируса в клетке. Данное предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, А.О. Шахзадовой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. 239 с. State of oncological care to the population of Russia in 2021. Ed. by A.D. Kaprin, V.V. Starinsky, A.O. Shakhzadova. Moscow: MNIIOI im. P.A. Gertsena – filial FGBU "NMITS radiologii" Minzdrava Rossii, 2022. 239 p. (In Russ.).
2. Тимошкина Н.Н., Богомолова О.А., Жужеленко И.А. и др. Исследование полиморфизмов генов *UGT1A1* и *DPYD* у пациентов с колоректальным раком. Сибирский онкологический журнал 2018;17(6):49–56. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-49-56
Timoshkina N.N., Bogomolova O.A., Zhuzhelenko I.A. et al. Study of polymorphisms of the *UGT1A1* and *DPYD* genes in patients with colorectal cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology* 2018;17(6):49–56. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-49-56
3. Lin D., Shen Y., Liang T. Oncolytic virotherapy: basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduct Target Ther* 2023;8(1):156. DOI: 10.1038/s41392-023-01407-6
4. Вдовиченко Г.В., Петрищенко В.А., Сергеев А.А. и др. Доклинические исследования противоракового лечебного аденовирусного препарата канцеролизин. Вопросы вирусологии 2006;51(6):39–42. PMID: 17214082
Vdovichenko G.V., Petrischenko V.A., Sergeev A.A. et al. Preclinical studies of the anticancer therapeutic adenoviral drug carcinoлизин. *Voprosy virusologii* = *Virology Issues* 2006;51(6):39–42. (In Russ.). PMID: 17214082
5. Желтухин А.О., Соболева А.В., Сосновцева А.О. и др. Энтеровирусы человека проявляют избирательную онколитическую активность на модели ксенотрансплантатов мультиформной глиобластомы человека в иммунодефицитных мышах. Вестник РГМУ 2018;(2):45–51. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.026
Zheltukhin A.O., Soboleva A.V., Sosnovtseva A.O. et al. Human enteroviruses exhibit selective oncolytic activity in xenograft models of human glioblastoma multiforme in immunodeficient mice. *Vestnik RGMU* = *Bulletin of RGMU* 2018;(2):45–51. (In Russ.). DOI: 10.24075/vrgmu.2018.026
6. Ткачева А.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А. и др. Таргетная терапия глиобластомы человека с использованием онколитического потенциала парвовируса и аттенуированных штаммов вируса осповакцины. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2019;37(2):83–91. DOI: 10.17116/molgen20193702183
Tkacheva A.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A. et al. Targeted therapy of human glioblastoma using the oncolytic potential of parvovirus and attenuated strains of the vaccinia virus. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* = *Molecular Genetics, Microbiology and Virology* 2019;37(2):83–91. (In Russ.). DOI: 10.17116/molgen20193702183
7. Кит О.И., Филиппова С.Ю., Тимофеева С.В. и др. Влияние онколитических штаммов новой неклассифицированной группы ротавирусов человека на лимфоциты периферической крови. Южно-Российский онкологический журнал 2021;2(3):23–30. DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-3-3
Kit O.I., Filippova S.Yu., Timofeeva S.V. et al. Effect of oncolytic strains of a new unclassified group of human rotaviruses on peripheral blood lymphocytes. *Yuzhno-Rossiyskiy onkologicheskii zhurnal* = *South Russian Journal of Cancer* 2021;2(3):23–30. (In Russ.). DOI: 10.37748/2686-9039-2021-2-3-3
8. Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Новикова И.А., Кит О.И. Вирус болезни Ньюкасла и иммунитет – эффективный альянс в борьбе против рака (обзор литературы). Сибирский онкологический журнал 2018;17(6):105–13. DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-105-113
Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A., Kit O.I. Newcastle disease virus – effective alliance in the fight against cancer. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal* = *Siberian Journal of Oncology* 2018;17(6):105–13. (In Russ.). DOI: 10.21294/1814-4861-2018-17-6-105-113
9. Müller L., Berkeley R., Barr T. et al. Past, present and future of oncolytic reovirus. *Cancers (Basel)* 2020;12(11):3219. DOI: 10.3390/cancers12113219
10. Колпаков С.А. Новые эритроцитарные тест-системы для выявления вирусов различных антигенных групп, разработанные в Ростовском НИИ: опыт использования и дальнейшие перспективы. В кн.: Профилактика инфекционных заболеваний на рубеже XXI века: сб. науч. тр. Хабаровск, 2001. С. 305–12.
Kolpakov S.A. New erythrocyte test systems for identifying viruses of various antigenic groups, developed at the Rostov Research Institute: experience of use and future prospects.

- In: Prevention of infectious diseases at the turn of the 21st century: Sat. scientific tr. Khabarovsk, 2001. P. 305–12. (In Russ.).
11. Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Межевова И.В. и др. Влияние онколитического реовируса Р-92 на созревание дендритных клеток и генерацию опухолеспецифических Т-лимфоцитов *in vitro*. Цитология 2019;61(7):529–35. DOI: 10.1134/S0041377119070095
Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Mezheva I.V. et al. The *in vitro* effect of oncolytic reovirus P-92 on dendritic cells maturation and the generation of tumor-specific T-lymphocytes. Tsitologiya = Cytology 2019;61(7):529–35. DOI: 10.1134/S0041377119070095
 12. Кит О.И., Златник Е.Ю., Новикова И.А. и др. Способ стимуляции презентирющей активности дендритных клеток: патент № 2728592 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/68, A61K 31/00 от 30.07.2020.
Kit O.I., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A. et al. Method for stimulating the presenting activity of dendritic cells: Patent No. 2728592 C1 Russian Federation, IPC C12Q 1/68, A61K 31/00 from 30.07.2020. (In Russ.).
 13. Ситковская А.О., Златник Е.Ю., Новикова И.А. и др. Исследование возможности онколитических эффектов *in vitro* вирусов из семейств *Reoviridae* и *Paramyxoviridae*. Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки 2018;4(200):124–30. DOI: 10.23683/0321-3005
Sitkovskaya A.O., Zlatnik E.Yu., Novikova I.A. et al. Study of the possibility of oncolytic effects *in vitro* of viruses from the families *Reoviridae* and *Paramyxoviridae*. Izvestiya vuzov. Severo-kavkazskiy region. Estestvennye nauki = News from universities. North Caucasus Region Natural Sciences 2018;4(200):124–30. (In Russ.). DOI: 10.23683/0321-3005
 14. Фрешни Р.Я. Культура животных клеток. Практическое руководство. Пер. с 5-го англ. изд.-я. М.: Бином; Лаборатория знаний, 2011.
Freshni R.Ya. Culture of animal cells. Practical management. Translation from the 5th English edition. Moscow: Binom; Laboratory of Knowledge, 2011. (In Russ.).
 15. Graham L., Orenstein J. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. Nat Protoc 2007;2(10):2439–50. DOI: 10.1038/nprot.2007.304
 16. Lu M., Liao F. Interferon-stimulated gene ISG12b2 is localized to the inner mitochondrial membrane and mediates virus-induced cell death. Cell Death Differ 2011;18(6):925–36. DOI: 10.1038/cdd.2010.160
 17. McNamara A., Roebke K., Danthi P. Cell killing by reovirus: mechanisms and consequences. Curr Top Microbiol Immunol 2023;442:133–53. DOI: 10.1007/82_2020_225
 18. Fernandes J.P., Cristi F., Eaton H.E. et al. Breast tumor-associated metalloproteases restrict reovirus oncolysis by cleaving the $\sigma 1$ cell attachment protein and can be overcome by mutation of $\sigma 1$. J Virol 2019;93(22):e01380–19. DOI: 10.1128/JVI.01380–19
 19. Fernández de Castro I., Risco C. Imaging RNA virus replication assemblies: Bunyaviruses and reoviruses. Fut Virol 2014;9(12):1089–104. DOI: 10.2217/fvl.14.95
 20. Fernández de Castro I., Zamora P.F., Ooms L. et al. Reovirus forms neo-organelles for progeny particle assembly within reorganized cell membranes. mBio 2014;5(1):e00931–13. DOI: 10.1128/mBio.00931–13
 21. Knier J., Dos Santos T., Eaton H.E. et al. Reovirus uses temporospatial compartmentalization to orchestrate core versus outercapsid assembly. PLoS Pathog 2022;18(9):e1010641. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010641
 22. Shah P.N.M., Stanifer M.L., Höhn K. et al. Genome packaging of reovirus is mediated by the scaffolding property of the microtubule network. Cell Microbiol 2017;19(12):10. DOI: 10.1111/cmi.12765
 23. Tenorio R., Fernández de Castro I., Knowlton J. et al. Reovirus σ NS and μ NS proteins remodel the endoplasmic reticulum to build replication neo-organelles. mBio 2018;9(4):e01253–18. DOI: 10.1128/mBio.01253–18
 24. Golla N., Hong L.J., Chefetz I. Visualization of necroptotic cell death through transmission electron microscopy. Methods Mol Biol 2021;2255:135–47. DOI: 10.1007/978-1-0716-1162-3_12
 25. Хаитов Р.М. Иммунология. 3-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. 496 с.
Khaitov R.M. Immunology. 3rd ed., reprint and add. Moscow: GEOTAR-Media, 2018. 496 p. (In Russ.).
 26. Galluzzi L., Vitale I., Warren S. et al. Consensus guidelines for the definition, detection and interpretation of immunogenic cell death. J Immunother Cancer 2020;8(1):e000337. DOI: 10.1136/jitc-2019-000337

Вклад авторов

С.Ю. Филиппова: обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, написание статьи;
А.О. Ситковская: разработка дизайна исследования, редактирование статьи;
И.В. Межевова: получение данных для анализа, редактирование статьи;
Е.Ю. Златник: разработка дизайна исследования, редактирование, анализ полученных данных;
И.А. Новикова, Л.Ю. Владимирова, Ю.В. Пржедецкий, Е.А. Дженкова: научное редактирование статьи;
С.А. Колпаков, Е.П. Колпакова: выделение, предоставление вирусов, научное редактирование статьи;
Е.Ю. Кириченко, А.К. Логвинов: электронная микроскопия, редактирование статьи.

Author's contributions

S.Yu. Filippova: review of publications on the topic of the article, analysis of the data obtained, article writing;
A.O. Sitkovskaya: research design development, editing of the article;
I.V. Mezheva: obtaining data for analysis, editing of the article;
E.Yu. Zlatnik: research design development; editing, analysis of the data obtained;
I.A. Novikova, L.Yu. Vladimirova, Yu.V. Przhedetskiy, E.A. Dzhenkova: scientific editing;
S.A. Kolpakov, E.P. Kolpakova: isolation, provision of viruses, scientific editing;
E.Yu. Kirichenko, A.K. Logvinov: electron microscopy, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.Ю. Филиппова / S.Yu. Filippova: <https://orcid.org/0000-0002-4558-5896>
А.О. Ситковская / A.O. Sitkovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-6035-1756>
И.В. Межевова / I.V. Mezhevova: <https://orcid.org/0000-0002-7902-7278>
Е.Ю. Златник / E.Yu. Zlatnik: <https://orcid.org/0000-0002-1410-122X>
И.А. Новикова / I.A. Novikova: <https://orcid.org/0000-0002-6496-9641>
Л.Ю. Владимирова / L.Yu. Vladimirova: <https://orcid.org/0000-0003-4236-6476>
Ю.В. Пржедецкий / Yu.V. Przhedetskiy: <https://orcid.org/0000-0003-3976-0210>
Е.А. Дженкова / E.A. Dzhenkova: <https://orcid.org/0000-0002-3561-098X>
Е.П. Колпакова / E.P. Kolpakova: <https://orcid.org/0000-0003-3528-785X>
Е.Ю. Кириченко / E.Yu. Kirichenko: <https://orcid.org/0000-0003-4703-1616>
А.К. Логвинов / A.K. Logvinov: <https://orcid.org/0000-0002-8873-3625>

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.
Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 31.10.2023. Принята в печать: 13.05.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.0000.
Article received: 31.10.2023. Accepted for publication: 13.05.2024. Published online: 00.00.0000.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-57-64>

Разработка модели лекарственной формы нового отечественного соединения (производное пирроло[3,2-*l*]акридинона) и изучение его цитотоксической активности

А.В. Ланцова¹, Е.В. Санарова¹, Л.Л. Николаева^{1, 2}, Д.А. Ланцова³, Ю.В. Шкляев⁴, А.Е. Бармашов¹, Н.Л. Соловьева², М.А. Барышникова¹

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

²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); Россия, 119048 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

³ГБОУ г. Москвы «Курчатовская школа»; Россия, 123060 Москва, ул. Маршала Конева, 10;

⁴Институт технической химии Уральского отделения Российской академии наук — филиал ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук; Россия, 614990 Пермь, ул. Ленина, 13, стр. А

Контакты: Анна Владимировна Ланцова lantsova1979@mail.ru

Введение. Расширение списка безопасных и эффективных лекарственных средств является главным направлением развития современной медицины и фармации. Производные акридинона – интересный объект изучения в связи с их доказанным противоопухолевым действием на лейкозах и лимфомах и присутствием на фармацевтическом рынке единственного зарубежного препарата из данной группы. Механизм их противоопухолевого действия заключается в способности к интеркаляции ДНК, а также к ингибированию топоизо- и теломераз, инициации окислительного стресса, опосредованного активными формами кислорода, остановке клеточного цикла, взаимодействию с гликопротеином-Р.

Цель исследования – разработка состава и технологии получения модели лекарственной формы (ЛФ) для парентерального применения нового отечественного производного пирроло[3,2-*l*]акридинона, обладающего противоопухолевой активностью.

Материалы и методы. Субстанция МОВ 265 S (ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Россия); вспомогательные вещества для парентерального применения: поливинилпирролидон (ПВП, Kollidon® 17PF, BASF, Германия), полиоксил-35-касторовое масло (Cremophor® ELP, BASF, Германия), макрогол 15 гидроксистеарат (Kolliphor® HS 15, BASF, Германия), вода для инъекций. В экспериментальной работе использованы технологические (солюбилизация, растворение, фильтрация, лиофилизация), аналитические (спектрофотометрия, потенциометрия) и биологические (*in vitro*) методы. Цитотоксическую активность определяли на клеточных линиях Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, карциномы простаты PC-3, карциномы легкого A549, карциномы толстой кишки HCT-116, аденокарциномы молочной железы MCF-7.

Результаты. В ходе экспериментальных исследований с применением различных солюбилизаторов получены модельные составы ЛФ на основе МОВ 265 S, в которых в качестве основного растворителя использовали воду для инъекций. Образование прозрачного раствора наблюдали только в модели с ПВП, которая была охарактеризована по основным фармацевтическим показателям и исследована *in vitro*. Ингибирующая концентрация, вызывающая гибель 50 % клеток на различных клеточных линиях, составила 29,6–65,5 мкМ.

Заключение. Разработан модельный состав ЛФ нового отечественного соединения (производного пирроло[3,2-*l*]акридинона) в виде лиофилизата с массовым соотношением МОВ 265 S: ПВП – 1:5, а также технология ее получения из 5 стадий. Подобраны основные показатели качества полученной модели. Результаты изучения цитотоксической активности показали, что композиция эффективна на всех использованных клеточных культурах, при этом максимальную цитотоксичность наблюдали на клеточной линии лейкоза Jurkat, что совпадает с данными литературы о цитотоксической активности производных акридина на лейкозах и злокачественных лимфомах. Новая модель ЛФ является перспективной для дальнейших исследований с целью импортозамещения в связи с отсутствием в России лекарственных средств производных акридинона.

Ключевые слова: солюбилизация, модель лекарственной формы, производное пирроло[3,2-*l*]акридинона, лиофилизация, цитотоксическая активность

Для цитирования: Ланцова А.В., Санарова Е.В., Николаева Л.Л. и др. Разработка модели лекарственной формы нового отечественного соединения (производное пирроло[3,2-*l*]акридинона) и изучение его цитотоксической активности. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):57–64.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-57-64>

Development of a model of a dosage form for a new domestic compound (pyrrolo[3,2-*l*]acridinone derivative) and studying its cytotoxic activity

Anna V. Lantsova¹, Ekaterina V. Sanarova¹, Ludmila L. Nikolaeva^{1,2}, Daria A. Lantsova³, Yuri V. Shklyayev⁴, Alexander E. Barmashov¹, Natalia L. Solovieva², Maria A. Baryshnikova¹

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

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russia (Sechenov University); Bld. 2, 8 Trubetskaya St., 119048 Moscow, Russia;

³Kurchatov School; 10 Marshala Koneva St., 123060 Moscow, Russia;

⁴Institute of Technical Chemistry of Ural Branch of Russian Academy of Sciences – Perm Federal Research Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences; Bld. A, 13 Lenin St., 614990 Perm, Russia

Contacts: Anna Vladimirovna Lantsova lantsova1979@mail.ru

Background. Expanding the list of safe and effective medicines are the main directions of development of modern medicine and pharmacy. Acridine derivatives are an interesting object of study due to their proven antitumor effect on leukemia and lymphoma. The mechanism of their antitumor effect is the ability to intercalate DNA, as well as to inhibit topoisomerases and telomerase, initiate ROS-mediated oxidative stress, arrest the cell cycle, and interact with glycoprotein-P.

Aim. To develop the composition and technology for obtaining a model pharmaceutical form (PF) for parenteral use of a new compound a pyrrolo [3,2-*l*] acridinone derivative with antitumor activity.

Materials and methods. Substance MOB 265 S (Institute of Technical Chemistry of Ural Branch of Russian Academy of Sciences – Perm Federal Research Center, Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Russia), polyvinylpyrrolidone (PVP, Kollidon® 17PF, BASF, Germany), polyoxyl-35-castor oil (Cremophor® ELP, BASF, Germany), macrogol (15) – hydroxystearate (Cremophor® ELP, BASF, Germany), water for injection. Technological (solubilization, dissolution, filtration, lyophilization), analytical (spectrophotometry, potentiometry) and biological (*in vitro*) methods were used in the experimental work. Cytotoxic activity was determined on cell lines of T-cell lymphoblastic leukemia Jurkat, PC-3 prostate carcinoma, A549 lung carcinoma, colon carcinoma HCT-116, breast adenocarcinoma MCF-7.

Results. In the course of experimental studies using various solubilizers, model compositions of a PF based on MOB 265 S were obtained, in which water for injection was used as a solvent. The formation of a clear solution was observed only in the model with PVP, which was characterized by basic pharmaceutical parameters and studied *in vitro*. The inhibitory concentration causing 50 % cell death on various cell lines was 29.6–65.5 µM.

Conclusion. Model of the PF a new domestic compound (pyrrolo [3,2-*l*] acridinone derivative) in the form of a lyophilisate with a mass ratio of MOB 265 S: PVP – 1:5, as well as a technology for its production in 5 stages. The main quality indicators of the resulting model were selected. The results of cytotoxic activity showed that the composition is effective in all used cell cultures, with maximum cytotoxicity observed in the Jurkat leukemia cell line, which coincides with literature data on the cytotoxic activity of acridine derivatives on leukemia and malignant lymphomas. The new PF is promising for further research as an import substitution, due to the lack of acridinone derivative drugs in Russia.

Keywords: solubilization, dosage form model, pyrrolo[3,2-*l*]acridinone derivative, lyophilization, cytotoxic activity

For citation: Lantsova A.V., Sanarova E.V., Nikolaeva L.L. et al. Development of a model of a dosage form for a new domestic compound (pyrrolo [3,2-*l*] acridinone derivative) and studying its cytotoxic activity. Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):57–64.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-57-64>

Введение

Расширение списка безопасных и эффективных лекарственных средств (ЛС) является главным направлением развития современной медицины и фармации. Перед выводением любого ЛС на фармацевтический рынок производитель оценивает соотношение риска, обусловленного побочными эффектами, и полезного действия. Все ЛС способны провоцировать нежелательные реакции организма, поэтому одна из главных задач при их получении — это минимизация этих эффектов путем модификации молекул активных фармацевтических субстанций (АФС), разработки технологии производства и создания оптимальной лекарственной формы (ЛФ) препарата [1].

Производные акридинона представляют собой плоские полициклические ароматические молекулы, которые прочно, но обратимо связываются с ДНК путем интеркаляции, однако обычно не взаимодействуют с ней ковалентно [2]. Изучение производных акридинового ряда в качестве противоопухолевых агентов началось с успешного клинического применения препарата Амсакрин (Amsacrine, Amsidine, производитель NordMedica, Дания) для лечения острых лейкозов и злокачественных лимфом, который также продемонстрировал высокую цитотоксическую активность (ЦТА) в отношении клеточных линий рака молочной железы человека (MCF-7) и аденокарциномы шейки матки (HeLa) [3].

Однако способность к интеркаляции не является единственным определяющим фактором в отношении противоопухолевой активности производных акридина. Другие, не менее важные характеристики — способность к ингибированию топоизо- и теломераз, инициации окислительного стресса, опосредованного активными формами кислорода, остановке клеточного цикла, взаимодействие с гликопротеином-Р [4].

Разработка новых ЛС на основе акридинового ядра включает совершенствование АФС путем введения радикалов, ионов металлов, комплексов и т. д. Эти модификации меняют физико-химические характеристики молекулы, тем самым повышая эффективность действия акридиновых производных [5].

На базе ФГБУН «Пермский федеральный исследовательский центр» Уральского отделения Российской академии наук (ФГБУН ПФИЦ УрО РАН) синтезировано новое производное акридина [6] (рис. 1), на основании которого в лаборатории разработки лекарственных форм НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина разработана инъекционная модель ЛФ.

Цель настоящей работы — разработка состава и технологии получения модели ЛФ для парентерального применения нового отечественного производ-

ного пирроло[3,2-1]акридинона, обладающего противоопухолевой активностью.

Материалы и методы

В работе использованы материалы и реактивы, соответствующие требованиям нормативной документации (государственных стандартов, технических условий, фармакопейных статей Государственной фармакопеи XV издания).

Объект исследования: субстанция МОВ 265 S (ФГБУН ПФИЦ УрО РАН), представляет собой аморфный порошок оранжевого цвета, умеренно растворимый в воде, растворимый в этиловом спирте. Структурная формула приведена на рис. 1.

Вспомогательные вещества для парентерального применения: поливинилпирролидон (ПВП, Kollidon® 17PF, BASF, Германия), полиоксил-35-касторовое масло (Cremophor® ELP, BASF, Германия), макрогол 15 гидроксистеарат (Kolliphor® HS 15, BASF, Германия). В качестве растворителя использовали воду для инъекций.

Оборудование: весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), магнитная мешалка с подогревом Heildolph MR Hei-Standard (Heildolph, Германия), сублимационная сушилка Edwards Minifast DO. 2 (Ero Electronic S. p. A., Италия), pH-метр HANNA HI 2211 (Hanna Instruments, Румыния), дозатор механический (флакон-диспенсер) Proline Prospenser (Sartorius AG, Германия), фильтрационная система Stericup GP Millipore Express Plus (Merck Millipore Ltd., Ирландия), спектрофотометр Agilent Cary 100 (Agilent Technologies, США).

Получение модельных растворов: композиции получали 2 путями: 1) МОВ 265 S растворяли при нагревании и перемешивании в Cremophor® ELP или Kolliphor® HS 15 и доводили водой для инъекций до требуемого объема; 2) смесь МОВ 265 S и ПВП растворяли при перемешивании в воде для инъекций до получения истинного раствора. Фильтрацию/стерилизацию растворов проводили с помощью Stericup

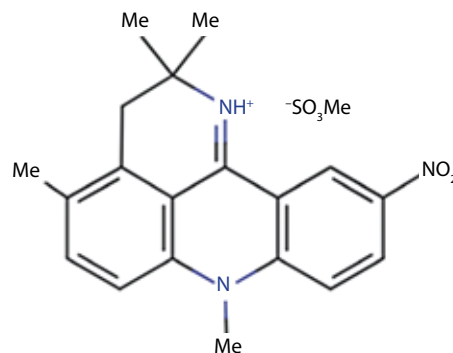


Рис. 1. Структурная формула субстанции МОВ 265 S

Fig. 1. Structural formula substance MOB 265 S

GP Millipore Express Plus с полиэфирсульфовыми фильтрами с диаметром пор 0,22 мкм.

Лиофилизация: флаконы с ЛФ на основе МОВ 265 S помещали в камеру сублимационной сушки при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$ и замораживали до $-45 \pm 2^\circ\text{C}$. Через 5 ч после достижения на препарате температуры $-45 \pm 2^\circ\text{C}$ включали вакуум, затем еще через 5 ч начинали нагрев полок. Максимально возможная скорость подъема температуры до 0°C составляла $2-3^\circ\text{C}/\text{ч}$. Далее подъем температуры проводили со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{ч}$. Продолжительность досушивания — от 3 до 5 ч. Контроль процесса сублимационной сушки осуществляли по приборам и регистрирующему устройству, расположенным на панели установки.

Анализ моделей. Значение pH определяли при $t = 20-25^\circ\text{C}$, лиофилизаты предварительно растворяли в 2 мл воды для инъекций. Определение подлинности и количественное определение проводили спектрофотометрически [7] при $\lambda = 244 \pm 2$ нм (рис. 2), поскольку вспомогательные вещества поглощают в диапазоне 200–215 нм и не влияют на спектр МОВ 265 S. При этом спектр поглощения МОВ 265 S имеет 3 максимума: при 310 ± 3 , 270 ± 2 и наиболее интенсивный — при 244 ± 2 нм [8].

Цитотоксическая активность. Исследование ЦТА проводили с помощью метилтетразолиевого теста на клеточных линиях опухолей человека: Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat, карциномы простаты РС-3, карциномы легкого A549, карциномы толстой кишки НСТ-116, аденокарциномы молочной железы MCF-7, полученных из биоресурсной коллекции ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клетки инкубировали с ЛФ МОВ 265 S в течение 72 ч и затем определяли процент

погибших клеток, характеризующий цитотоксичность (Ц, %), по формуле

$$\text{Ц} = (1 - (\text{ОП}_0 / \text{ОП}_\text{к})) \times 100 \%,$$

где $\text{ОП}_\text{к}$ — оптическая плотность в контрольных лунках, ОП_0 — оптическая плотность в опытных лунках.

Соединение считают цитотоксичным, если оно вызывает гибель 50 % клеток (IC_{50}) в концентрации ≤ 100 мкМ [9].

Результаты

Субстанция под шифром МОВ 265 S умеренно растворима в воде, что послужило основанием для выбора воды для инъекций в качестве основного растворителя, однако стабильность водных растворов в различных концентрациях от 0,5 до 10 % АФС невысокая, в течение 5–15 мин растворы мутнели, наблюдали выпадение оранжевого осадка. Для увеличения стабильности АФС в воде изучили возможность использования солюбилизаторов для парентерального применения в определенных концентрациях, получили несколько модельных составов ЛФ.

Образование истинного раствора МОВ 265 S происходило только в модельном составе ЛФ № 5 (табл. 1), в который в качестве солюбилизатора и формообразователя вводили ПВП. Важным моментом при получении данного состава являлось соразстворение водой для инъекций точных навесок смеси АФС: ПВП в массовом соотношении 1:5.

В фармацевтических композициях ПВП применяют как для умеренно растворимых, так и для малорастворимых в воде АФС в качестве солюбилизирующего агента, который способствует образованию комплекса с АФС, увеличивая при этом растворимость, стабильность и биодоступность субстанций. Он также используется в качестве наполнителя для образования структуры лиофилизата, являясь ингибитором кристаллизации при лиофилизации [10–13].

Изучив стабильность полученного раствора, установили, что при хранении он остается прозрачным при комнатной температуре в течение 7 сут, затем наблюдается его помутнение. В связи с этим для увеличения срока хранения данной модели провели разработку режима лиофилизации.

Определение оптимального режима лиофилизации начинали с установления эвтектической температуры водного раствора ЛФ с МОВ 265 S, которая составила -5°C . Отсутствие в составе ЛФ органических растворителей и других веществ, существенно влияющих на процесс сублимации, а также достаточно высокая температура эвтектики позволили выбрать в качестве условий лиофилизации режим с быстрым замораживанием и равномерным подъемом температуры.

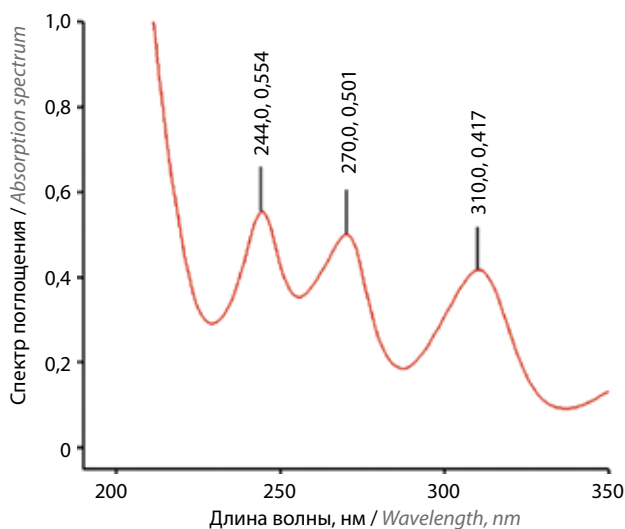


Рис. 2. Спектр поглощения модели лекарственной формы МОВ 265 S
Fig. 2. Absorption spectrum of the pharmaceutical form model MOB 265 S

Таблица 1. Модельные составы лекарственной формы на основе MOB 265 S

Table 1. Model compositions of pharmaceutical form based on MOB 265 S

Модельный состав Model composition	Компоненты модели Model components	Содержание, мг; мл — для воды Content, mg; ml — for water	Внешний вид Appearance
1	MOB 265 S	40	Мутный раствор Cloudy solution
	Cremophor® ELP	200	
	Вода для инъекций Water for injection	5*	
2	MOB 265 S	30	Мутный раствор Cloudy solution
	Cremophor® ELP	100	
	Вода для инъекций Water for injection	5*	
3	MOB 265 S	40	Прозрачный раствор, но в течение 15 мин мутнеет Transparent solution, but becomes cloudy within 15 min
	Kolliphor® HS 15	200	
	Вода для инъекций Water for injection	4*	
4	MOB 265 S	40	Прозрачный раствор, но в течение 10 мин мутнеет Transparent solution, but becomes cloudy within 10 min
	Kolliphor® HS 15	150	
	Вода для инъекций Water for injection	4*	
5	MOB 265 S	40	Прозрачный раствор Transparent solution
	Kollidon® 17PF	200	
	Вода для инъекций Water for injection	2*	

*Объем до указанного количества.

*Volume up to specified quantity.

Технология получения модели ЛФ на основе MOB 265 S включает 5 стадий, схема представлена на рис. 3.

Состав на 1 флакон:

- MOB 265 S — 40 мг;
- Kollidon® 17PF — 200 мг;
- вода для инъекций — до 2 мл.

По описанной технологии наработаны 80 флаконов данной модели ЛФ для изучения ЦТА и фармацевтических показателей качества сразу после получения лиофилизата и в процессе хранения для предварительной оценки срока годности.

Оценку качества полученного лиофилизата проводили по основным параметрам качества, рекомендованным Государственной фармакопеей XV издания (табл. 2, представленные в таблице данные статистически достоверны, каждое измерение проводили не менее 5 раз, результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение).

По внешнему виду образцы представляли собой сухую пористую массу желтого цвета. При растворе-

нии со встряхиванием в 2 мл воды для инъекций в течение 5 мин образуются прозрачные растворы желтого цвета.

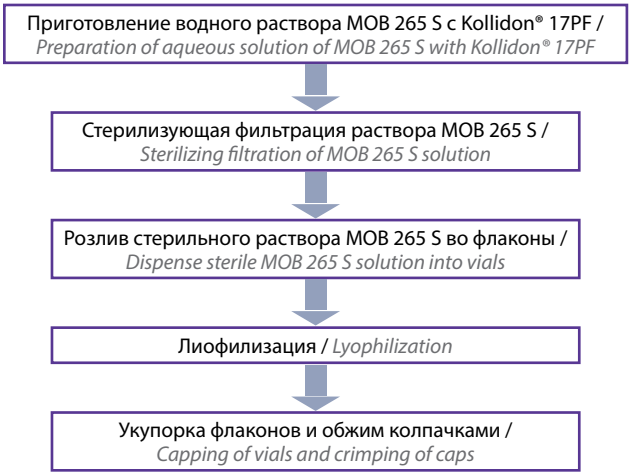


Рис. 3. Получение модели лекарственной формы на основе MOB 265 S
Fig. 3. Obtaining a pharmaceutical form model based on MOB 265 S

Таблица 2. Показатели качества лекарственной формы MOB 265 S

Table 2. Quality indicators of pharmaceutical form MOB 265 S

Показатель Quality	Норма Norm	Полученный результат Result
Описание Description	Сухая пористая масса желтого цвета, без запаха Dry porous mass of yellow color, odorless	Соответствует требованиям Conforming
Подлинность Authenticity	Ультрафиолетовые спектры в области от 200 до 350 нм должны иметь максимумы поглощения при 244 ± 2 , 270 ± 2 , 310 ± 2 нм Ultraviolet spectra in the region from 200 to 350 nm shall have absorption maxima at 244 ± 2 , 270 ± 2 , 310 ± 2 nm	Соответствует требованиям Conforming
Прозрачность Transparency	К содержимому флакона добавляют 2 мл воды для инъекций, интенсивно встряхивают в течение 5 мин. Полученный раствор должен быть прозрачным To the contents of the vial add 2 ml of water for injection, shake vigorously for 5 min. The resulting solution should be transparent	Соответствует требованиям Conforming
рН	6–7	$6,5 \pm 0,2$
Количественное определение, мг Quantitative assay, mg	$40,0 \pm 4,0$	$40,0 \pm 0,3$
Однородность по массе, мг Mass homogeneity, mg	$240,0 \pm 24,0$	$240,0 \pm 0,5$

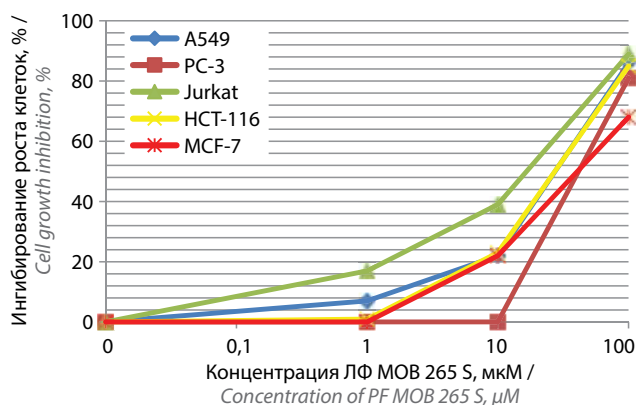


Рис. 4. Цитотоксическая активность лекарственной формы (ЛФ) MOB 265 S

Fig. 4. Cytotoxic activity of pharmaceutical form (PF) MOB 265 S

Таблица 3. Значение ингибирующей концентрации, вызывающей гибель 50 % клеток (IC_{50}), модели лекарственной формы MOB 265 STable 3. Inhibitory concentration causing 50 % cell death value (IC_{50}) of the model pharmaceutical form MOB 265 S

Модель Model	IC_{50} , мкМ IC_{50} , μM				
	A549	PC-3	Jurkat	HCT-116	MCF-7
Лекарственная форма MOB 265 S MOB 265 S pharmaceutical form	49,4	65,5	29,6	49,1	64,7

Так, ЦТА модели ЛФ MOB 265 S исследовали в концентрациях от 0 до 100 мкМ (4 контрольные точки: 0, 1, 10 и 100 мкМ) (рис. 4). Показано, что IC_{50} ЛФ MOB 265 S меньше 100 мкМ на всех использованных в исследовании клеточных линиях (табл. 3). Из представленных данных следует то, что модель ЛФ MOB 265 S обладает высокой ЦТА в отношении клеточных линий опухолей человека.

Заключение

В результате проведенных исследований по созданию моделей ЛФ для парентерального введения для нового отечественного соединения группы пирроло[3,2-1]акридинона разработана модель ЛФ в виде лиофилизата с массовым соотношением MOB 265 S: ПВП — 1:5, а также технология ее получения. Подобраны основные параметры оценки качества полученной модели: описание, подлинность, прозрачность, рН, количественное содержание, однородность по массе. ЛФ MOB 265 S обладает высокой ЦТА в отношении клеточных линий опухолей человека, но наибольшая активность наблюдается на модели лейкоза Jurkat, что подтверждает данные литературы о ЦТА производных акридина на лейкозах и злокачественных лимфомах. Новая модель ЛФ является перспективной для дальнейших исследований с целью импортозамещения в связи с отсутствием в России противоопухолевых ЛС производных акридинона.

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

1. Линькова Ю.Н. Отечественная регуляторная система в области клинических исследований соответствует международным подходам. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств 2023;13(4):488–92. DOI: 10.30895/1991-2919-2023-13-4-488-492
Linkova Yu.N. Russian regulatory system for clinical trials is consistent with international approaches. Vedomosti Nauchnogo centra jekspertizy sredstv medicinskogo primeneniya = Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation 2023;13(4):488–92. (In Russ.). DOI: 10.30895/1991-2919-2023-13-4-488-492
2. Cichorek M., Ronowska A., Gensicka-Kowalewska M. et al. Novel therapeutic compound acridine–retrotuftsin action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. J Cancer Res Clin Oncol 2019;145(1):165–79. DOI: 10.1007/s00432-018-2776-4
3. Byvaltsev V.A., Bardanova L.A., Onaka N.R. et al. Acridine orange: A review of novel applications for surgical cancer imaging and therapy. Front Oncol. 2019;9:925. DOI: 10.3389/fonc.2019.00925
4. Braña M.F., Cacho M., Gradillas A. et al. Intercalators as anticancer drugs. Curr Pharm Des 2001;7(17):1745–80. DOI: 10.2174/1381612013397113
5. Prasher P., Sharma M. Medicinal chemistry of acridine and its analogue. Med Chem Comm 2018;9(10):1589–618. DOI: 10.1039/c8md00384j
6. Rozhkova Y.S., Vshivkova T.S., Morozov V.V. et al. Synthesis of new pyrrolo[3,2-l]acridinones and pyrrolo[3,2-c][1,8] naphthyridinones by condensation of methoxybenzenes or phenols with isobutyric aldehyde and o-aminonitriles. Chem Heterocycl Com 2017;53(11):1228–41. DOI: 10.1007/s10593-018-2195-0
7. Игнатъева Е.В., Ярцева И.В., Шпрах З.С. и др. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического таннина в лекарственной форме. Разработка и регистрация лекарственных средств 2020;9(4):93–8. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98
Ignateva E.V., Yartseva I.V., Shprakh Z.S. et al. Development and validation of dimeric macrocyclic tannin assay method in dosage forms. Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv = Drug Development & Registration 2020;9(4):93–8. (In Russ.). DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98
8. Бутюгина М.Д. Разработка методики количественного определения для соединения из группы пирроло-[3,2-l]-акридинов, обладающего противоопухолевой активностью. Научная весна 2023. XIII межвузовская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием. Вестник медицинского института «РЕАВИЗ». Реабилитация, Врач и Здоровье 2023;13(2):203.
Butyugina M.D. Development of a quantitative determination method for a compound from the pyrrolo-[3,2-l]-acridinone group, which has antitumor activity. Scientific spring 2023. XIII interuniversity scientific and practical conference of students and young scientists with international participation. Vestnik medicinskogo instituta «REAVIZ». Reabilitacija, Vrach i Zdorov'e = Bulletin of the Medical Institute "REAVIZ". Rehabilitation, Doctor and Health 2023;13(2):202. (In Russ.).
9. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К., 2012. С. 642–57.
Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif and K., 2012. P. 642–57. (In Russ.).
10. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Оборотова Н.А. и др. Основные методы повышения растворимости гидрофобных и труднорастворимых веществ. Разработка и регистрация лекарственных средств 2016;2(15):52–9.
Gulyakin I.D., Nikolaeva L.L., Oborotova N.A. et al. Common methods increasing the solubility of poorly soluble hydrophobic substances. Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv = Drug Development & Registration 2016;2(15):52–9. (In Russ.).
11. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Оборотова Н.А. и др. Разработка технологии получения инъекционной лекарственной формы на основе отечественной субстанции производной индолокарбазола – ЛХС-1208. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(3):25–32.
Lantsova A.V., Sanarova E.V., Oborotova N.A. et al. Development of technology for injectable dosage form based on the national substance from the class of indolocarbazoles – LHS-1208. Rossijskij bioterapevticeskij jurnal = Russian Journal of Biotherapy 2014;13(3):25–32. (In Russ.).
12. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Орлова О.Л. et al. Lyophilization as a method for stabilizing pharmaceuticals. Pharm Chem J 2017;51(4):307–11. DOI: 10.1007/s11094-017-1604-5
13. Oborotova N.A., Sanarova E.V. Role of new pharmaceutical technologies in enhancing the selectivity of antitumor drugs. Russian Journal of General Chemistry 2013;83(12):2541–7. DOI: 10.1134/S1070363213120529

Вклад авторов

А.В. Ланцова: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста статьи;

Е.В. Санарова, Л.Л. Николаева: разработка дизайна исследования, обзор публикаций по теме статьи, анализ полученных данных, редактирование статьи;

Д.А. Ланцова: участие в разработке модельных составов лекарственной формы, оформление статьи в соответствии с требованиями журнала;

Ю.В. Шкляев, Н.Л. Соловьева: получение данных по субстанции, редактирование статьи;

А.Е. Бармашов, М.А. Барышников: разработка дизайна исследования цитотоксической активности, редактирование статьи.

Author's contributions

A.V. Lantsova: research design development, review of publications on the topic of the article, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;

E.V. Sanarova, L.L. Nikolaeva: research design development, review of publications on the topic of the article, analysis of the obtained data, article editing;

D.A. Lantsova: participation in the development of the composition of the pharmaceutical form, preparation of the article in accordance with the requirements of the journal;

Yu.V. Shklyayev, N.L. Solovieva: obtaining data on the substance, editing the article;

A.E. Barmashov, M.A. Baryshnikova: cytotoxic activity design development, editing the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

A.B. Ланцова / A.V. Lantsova: <https://orcid.org/0000-0002-0650-2023>

E.B. Санарова / E.V. Sanarova: <https://orcid.org/0000-0002-5592-5137>

Л.Л. Николаева / L.L. Nikolaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8003-8241>

Д.А. Ланцова / D.A. Lantsova: <https://orcid.org/0009-0009-1407-5947>

Ю.В. Шкляев / Yu.V. Shklyayev: <https://orcid.org/0000-0001-7016-1190>

A.E. Бармашов / A.E. Barmashov: <https://orcid.org/0000-0002-7440-6404>

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 04.11.2023. Принята в печать: 13.05.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.0000.

Article received: 04.11.2023. Accepted for publication: 13.05.2024. Published online: 00.00.0000.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-65-77>

Наночастицы оксида железа как потенциальные агенты для комбинированной лучевой терапии

М.В. Шестовская, А.Л. Лусс, В.В. Макаров, В.С. Юдин, А.А. Кескинов

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 119121 Москва, Шухоминская ул., 5

Контакты: Мария Владимировна Шестовская MShestovskaya@cspfmbs.ru

Введение. Наночастицы (НЧ) оксида железа представляют собой перспективную тераностическую платформу для комбинированной лучевой терапии: реакционная способность оксида железа усиливает окислительный стресс опухолевых клеток, ассоциированный с облучением, а магнитные свойства могут обеспечить дополнительное преимущество в виде контролируемой доставки.

Цель исследования – изучение потенциала гепаринизированных НЧ оксида железа в экспериментальной противоопухолевой терапии.

Материалы и методы. Синтез НЧ оксида железа осуществляли химическим осаждением с магнитной сепарацией, полученный золь стабилизировали гепарином. Для каждой партии вновь синтезированных частиц проводили ИК-спектроскопию, рентгеноструктурный анализ, сканирующую электронную микроскопию и определяли гидродинамический диаметр. Выбранную для исследования опухолевую модель рабдомиосаркомы МХ-7 переливали самкам мышей линии СЗНА, введение НЧ осуществляли внутрь опухоли или внутривенно, 1 раз в день, по схеме «5–2–5». Фракционное облучение (1–2 Гр/фракция; $1,3 \pm 0,15$ Гр/мин) проводили после введения НЧ. Для мышей экспериментальных групп определяли увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %), степень торможения роста опухоли (ТРО, %), проводили патоморфологическую оценку образцов легкого, печени, селезенки и опухолевого узла.

Результаты. В результате исследования установлено, что при внутриопухолевом введении гепаринизированные НЧ оксида железа задерживаются внутри опухоли, оказывая умеренный аддитивный эффект по сравнению с изолированной радиотерапией на 1-й неделе облучения: ТРО = 40 % (6-е сутки), суммарная очаговая доза (СОД) = 10 Гр; $p < 0,05$, однако при увеличении объема опухоли к концу 2-й недели схема лечения не превосходила радиотерапию по эффективности. При комбинации радиотерапии и внутривенного введения НЧ эффект наблюдали в течение 2 нед: ТРО = 43 % (6-е сутки), ТРО = 29 % (14-е сутки), СОД = 10 Гр; $p < 0,05$; УПЖ = 54 %, СОД = 20 Гр; $p < 0,05$.

Закключение. Изучаемый нанопрепарат оксида железа повышал способность лучевой терапии ингибировать рост рабдомиосаркомы при внутривенном введении и последовательном облучении экспериментальных мышей.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, рабдомиосаркома, ионизирующее облучение, комбинированная терапия, противоопухолевая активность

Для цитирования: Шестовская М.В., Лусс А.Л., Макаров В.В. и др. Наночастицы оксида железа как потенциальные агенты для комбинированной лучевой терапии. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3): 65–77.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-65-77>

Iron oxide nanoparticles as potential agents for combined radiotherapy

Maria V. Shestovskaya, Anna L. Luss, Valentin V. Makarov, Vladimir S. Yudin, Anton A. Keskinov

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Federal Medical Biological Agency; 5/1 Shchukinskaya St., Moscow 119121, Russia

Contacts: Maria Vladimirovna Shestovskaya MShestovskaya@cspfmbs.ru

Background. Iron oxide nanoparticles (NP) represent a promising theranostic platform for combined radiotherapy: the reactivity of iron oxide enhances oxidative stress of tumor cells associated with irradiation while magnetic properties may provide additional feature as controlled delivery.

Aim. To study the potency of heparinized iron oxide NP in experimental antitumor therapy.

Materials and methods. The synthesis of iron oxide NP was carried out by chemical precipitation followed by magnetic separation, the resulting sol was stabilized with heparin. For each batch of newly synthesized particles, the hydrodynamic diameter was determined, IR spectrometry, X-ray diffraction analysis, and scanning electron microscopy were performed. The MX-7 tumor model of rhabdomyosarcoma chosen for the study was transplanted into female C3HA mice; NP were administered intratumorally or intravenously, once a day, according to the “5–2–5” scheme. Fractional irradiation (1–2 Gy/fraction; 1.3 ± 0.15 Gy/min) was carried out after NP administration. Increasing life expectancy (ILE), the degree of tumor growth inhibition (TGI), a pathomorphological assessment of the lung, liver, spleen and tumor node was carried out for all experimental mice.

Results. As a result of the study, it was found that when administered intratumorally, heparinized iron oxide NP are retained inside the tumor, providing a moderate additive effect, compared with isolated radiotherapy in the first week of irradiation (TGI = 40 % (day 6), TFD = 10 Gy, $p < 0.05$), however, with an increase in tumor volume by the end of the second week, the treatment regimen was not more effective than radiotherapy. With a combination of radiotherapy and intravenous administration of NP, the effect was observed within two weeks (TGI = 43 % (day 6), TGI = 29 % (day 14), TFD = 10 Gy; $p < 0.05$; ILE = 54 %, TFD = 20Gy; $p < 0.05$).

Conclusion. The studied iron oxide nanopreparation enhanced capacity of radiation therapy to inhibit tumor growth when administered intravenously in experimental mice with rhabdomyosarcoma and irradiated subsequently.

Keywords: iron oxide nanoparticles, rhabdomyosarcoma, ionizing radiation, combined therapy, antitumor activity

For citation: Shestovskaya M.V., Luss A.L., Makarov V.V. et al. Iron oxide nanoparticles as potential agents for combined radiotherapy. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):65–77.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-65-77>

Введение

Последние десятилетия развитие нанотехнологий находится в центре исследовательского внимания благодаря физико-химическим свойствам наночастиц (НЧ): высокой механической и термической стабильности, обширной площади поверхности, а также уникальным оптическим, электрическим и в ряде случаев — магнитным свойствам [1, 2]. Так, НЧ благородных металлов (серебра, золота, платины), а также полимерные и липосомальные НЧ применяют в качестве наночастиц для различных химиотерапевтических и диагностических агентов при злокачественных новообразованиях (ЗНО) [2–4]. Одной из предшествующих этому причин стал открытый в 1980-х годах эффект повышенной проницаемости и удержания (ППУ) [5]. Суть эффекта ППУ заключается в том, что чрезмерное разрастание сосудов солидной опухоли, вызванное ее повышенной потребностью в кислороде и питании, способствует микроразрывам стенок сосудов и делает их пористыми и проницаемыми для макромолекул, а из-за нарушенного оттока межклеточной жидкости, сопутствующего разрастанию опухоли, поглощенные макромолекулы задерживаются и накапливаются в структурах опухолевой ткани [5, 6].

Конъюгация наночастиц с терапевтическими молекулами и дополнительная функционализация различными лигандами *de novo* предоставляет НЧ неограниченные возможности применения в терапии ЗНО. В качестве лиганда могут выступать органические и неорганические высокомолекулярные

соединения, белки, пептиды, моноклональные антитела и другие биоактивные молекулы, в зависимости от предполагаемой мишени [2, 4]. Особенный интерес представляют собой такие наночастицы, как суперпарамагнитные НЧ оксида железа и гадолиния, которые используют в качестве контрастного средства для магнитно-резонансной томографии [4]. Суперпарамагнитные НЧ обладают сверхмалыми размерами и преимуществом контролируемой доставки с помощью магнитного поля. Нанопрепарат (НП) на основе оксида железа может рассматриваться как потенциальный агент для противоопухолевой терапии не только благодаря контролируемой доставке, но и реакционной способности оксида железа, которую можно использовать для усиления стресса ионизации опухолевых клеток при лучевой терапии (ЛТ): циклы Фентона и Габера–Вейса и эффект Варбурга [7, 8].

В рамках разработки терапевтической платформы для комбинированной ЛТ была изучена стабильность и эффективность НЧ оксида железа II/III *in vivo* при комбинации с ЛТ. Для модификации поверхности частиц использовали гепарин — гликопротеин, который служит биосовместимым антикоагулянтом и сорбируется на поверхности частиц, образуя стабильный комплекс при нейтральном pH. Помимо этого, было показано, что гепарин обладает низкой токсичностью *in vivo* и снижает тромбоэмболические проявления у онкологических больных, что может быть дополнительным преимуществом в ряде случаев [9]. В качестве модельной линии для исследования была выбрана рабдомиосаркома — саркома мягких

тканей, на которую, по разным оценкам, приходится 3–7 % случаев ЗНО детского возраста [10, 11]. Данная опухоль может сформироваться практически из любого типа мышечной ткани любой локализации, в результате чего клинические проявления сильно варьируются. Большинство больных с локализованной рабдомиосаркомой излечимы, однако прогнозы для пациентов с метастазами остаются неблагоприятными. Опухоль обычно обнаруживают при компьютерной или магнитно-резонансной томографии, что особенно важно для разработки тераностического средства, локализацию которого будет возможно контролировать магнитным полем.

Целью настоящего исследования являлась оценка эффективности комбинированного лучевого лечения с гепаринизированными НЧ оксида железа в сравнении с изолированной радиотерапией мышинной рабдомиосаркомы.

Материалы и методы

Синтез наночастиц оксида железа

Сначала 2,5 г хлорида железа (II) 4-водного («Ленреактив», Россия) и 5 г хлорида железа (III) 6-водного («Реахим», Россия) смешивали в плоскодонной колбе в 100 мл очищенной деионизированной воды и перемешивали с помощью магнитного перемешивающего устройства со скоростью 500 об/мин в течение 10 мин до образования гомогенного раствора. Затем добавляли раствор аммиака (25 %, «Ленреактив», Россия) в объеме 10 мл и вновь перемешивали в течение 10 мин. Далее производили 6-кратную магнитную сепарацию на постоянном магните (0,5 Тл) в 50–100 мл деионизированной воды со сменой надосадочной жидкости. Промывку прекращали при pH 7,1–7,5. Полученные НЧ помещали в реактор, снабженный перемешивающим устройством (37 кГц) и ультразвуковым излучателем (110 Вт), и выдерживали в течение 120 мин при термостатировании (25 °C) и постоянном перемешивании (500 об/мин). Определяли массовую долю НЧ путем высушивания 1 мл суспензии образца до постоянной массы. Среднее содержание НЧ в золе после отмывки составляло 2,5 %. Суспензию разводили деионизированной водой и раствором гепарина натрия (5000 Ед/мл, «Белмедпрепараты», Беларусь) так, чтобы массовая доля НЧ составляла 1,4 %, и перемешивали 500 об/мин в течение 15 мин. Несвязанный гепарин очищали диализом против воды (диализные мешки Spectra/Por, Spectrum Laboratories, Inc., США, с отсечкой по молекулярной массе 12–14 кДа) в течение 24 ч с 5-кратной сменой воды. Содержание гепарина в препарате определяли по содержанию гексозаминов [12], в качестве стандарта использовали чистый гепарин. Содержание гепарина по отношению к введенному в реакционную смесь составило 73 %.

Определение физико-химических характеристик наночастиц оксида железа

Гидродинамический диаметр НЧ определяли методом динамического светорассеяния на приборе Nanotracs Flex II (Microtrac, США) [13]. Инфракрасные спектры исследовали на спектрометре Nicolet 380 (Thermo Scientific, США) с использованием таблеток KBr. Лиофилизаты НП анализировали методом рентгеновской порошковой дифракции на приборе Rigaku SmartLab (Япония) [14] в соответствии с инструкцией к прибору (скорость сканирования 1–2 °/мин в диапазоне 2θ 20–80 °). Микрофотографии НЧ оксида железа снимали на сканирующем электронном микроскопе Tescan VEGA 3 SBH (США).

Моделирование рабдомиосаркомы мышей

Клетки линии рабдомиосаркомы мышей MX-7 культивировали в ростовой среде (90 % DMEM [dulbecco's modified eagle's medium], 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 50 мкг/мл гентамицина) 4 пассажа. Затем клетки переосаждали в бессывороточной среде DMEM, не содержащей антибиотика, и перевивали мышам линии СЗНА (питомник РАМН «Рапполово»). Перевивку опухоли осуществляли путем введения 10^7 опухолевых клеток в 75 мкл полученной суспензии в подвздошную область. В течение всего эксперимента 1 раз в 2 дня животных взвешивали, пальпировали опухоль и проводили замеры с помощью электронного штангенциркуля производства Adolf Wirth GmbH (Германия). Условием для начала эксперимента являлось наличие опухоли диаметром более 4 мм.

Проведение комбинированной лучевой терапии

В рамках исследования противоопухолевой активности НП мышам с рабдомиосаркомой проводили курс ЛТ в сочетании с внутривенным или внутриопухолевым введением НЧ. Исходя из серии предварительных экспериментов, доклинических рекомендаций [15], а также экспериментов, проведенных коллегами [16], доза препарата для внутриопухолевого введения составила 2 мл/кг/день (2,8 мг/кг/день по $\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$) и для внутривенного – 10 мл/кг/день (14 мг/кг/день по $\text{FeO} \times \text{Fe}_2\text{O}_3$). Выбор первоначальной дозы обусловлен данными литературы об эффективности фракционной терапии перевитой рабдомиосаркомы в дозе 2 Гр в течение 4–8 нед (общая доза 40–80 Гр) [17]. Облучение проводили на базе НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ на γ -установке для радиационных исследований РХ- γ -30 (ВО «Изотоп») по схеме «5–2–5» (5 дней облучения – перерыв 2 дня – 5 дней облучения) в строго установленное время при режиме $1,3 \pm 0,15$ Гр/мин,

величину фракционной дозы регулировали временем воздействия. В процессе пилотного эксперимента были сформированы экспериментальные группы ($n = 6$), подвергавшиеся облучению 2 Гр за фракцию: 1 — мыши без лечения, 2 — мыши, получающие только радиотерапию, 3 — мыши, получающие радиотерапию и внутриопухолевое введение НЧ (2 мл/кг), 4 — мыши, получающие радиотерапию и внутривенное введение НЧ (10 мл/кг). Животные продемонстрировали повышенную в сравнении с ожидаемой радиочувствительность, для них был вычислен показатель увеличения продолжительности жизни (УПЖ), при этом показатель торможения роста опухоли (ТРО) не имел статистической достоверности из-за высокой смертности. В процессе основного эксперимента фракционная доза была понижена до 1 Гр для достоверной оценки динамики роста опухоли и ТРО.

Показатели противоопухолевой активности

В рамках данной работы оценивали динамику изменения размеров опухоли и продолжительности жизни в экспериментальных группах [18].

Так, показатель ТРО рассчитывали по формуле (1):

$$\text{ТРО} = (V_k - V_o)/V_k \times 100 \%, \quad (1)$$

где V_o — средний объем опухоли у животных в опытной группе, V_k — средний объем опухоли у животных в контрольной группе.

Объем опухоли определяли согласно формуле (2):

$$V = 0.5L \times W^2, \quad (2)$$

где V — объем опухоли в мм^3 , L — длина опухоли, W — ширина опухоли.

Показатель УПЖ вычисляли по формуле (3):

$$\text{УПЖ} = ((\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k)/\text{СПЖ}_k) \times 100 \%, \quad (3)$$

где СПЖ — средняя продолжительность жизни, выраженная в днях, в группах: опытной и контроля соответственно.

Патоморфологическое исследование

Патоморфологическое исследование проводили посмертно для всех погибших и планово выведенных из эксперимента животных. При осмотре трупов животных оценивали состояние прилегающих тканей, состояние самой опухоли (некрозы, капсула, наличие выпота), ее способность отделяться от прилегающих тканей, регистрировали наличие метастатических очагов роста, их локализацию и размеры. После первичного осмотра органов оценивали состояние опухолевого узла: проводили анатомирование области

роста опухоли и измеряли по трем взаимно перпендикулярным направлениям для вычисления конечного объема: длина (L), ширина (W) и толщина (T).

Гистологическое исследование

Печень, селезенку, легкие и опухолевую ткань фиксировали в 10 % нейтральном буферном формалине (HistoPoint, Россия) и подготавливали к гистологическому исследованию с последующим окрашиванием гематоксилином и эозином (HistoPoint, Россия) по Майеру [19]. Срезы толщиной 5 мкм получали с помощью микротомы МПЗ-01 («Техном», Россия). Фотодокументирование проводили при помощи световой микроскопии.

Статистическая обработка

Обработку результатов проводили при помощи программного обеспечения Open Office, Prism 8 (GraphPAD, США), Statistica (TIBCO, США). После оценки нормальности распределения данных по выживаемости проводили статистический анализ значимости полученных результатов с помощью логарифмического теста Мантеля—Хензеля и теста Гехана—Вилкоксона. Для анализа данных по изменению динамики роста опухоли между 2 группами использовали U-критерий Манна—Уитни, для оценки достоверности различий в нескольких группах применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) Краскелла—Уоллиса. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Физические свойства нанопрепарата

С помощью сканирующей электронной микроскопии детектировали сферические НЧ со средним диаметром 10–25 нм (рис. 1, а). При этом высококонцентрированные образцы в водной среде образовывали агрегаты до 100–130 нм вследствие гидратации поверхности (рис. 1, б), что является распространенным явлением [20], напоминая о необходимости предварительного подбора правильных концентраций препарата перед введением.

Результаты рентгеновской порошковой дифракции показали, что основным компонентом системы является магнетит ($\text{Fe}_2\text{O}_3 \times \text{FeO}$) с его характерными пиками поглощения — 220 (30,35°), 311 (35,63°), 400 (43,49°), 422 (53,56°), 511 (57,12°) (рис. 1, в). На ИК-спектрах гепаринизированных НЧ оксида железа также виден характерный пик магнетита в области 588,9 см — 1, и полосы поглощения, соответствующие гепарину: 1045,0 см — 1 — асимметричное колебание S = O, 1236,0 см — 1 — симметричное колебание S = O в NH-SO_3 и $\text{CH}_2\text{-SO}_3$, а также полосы поглощения в области 1400,9 и 1630,8, соответствующие группам N-H и C = O [21] (рис. 1, г).

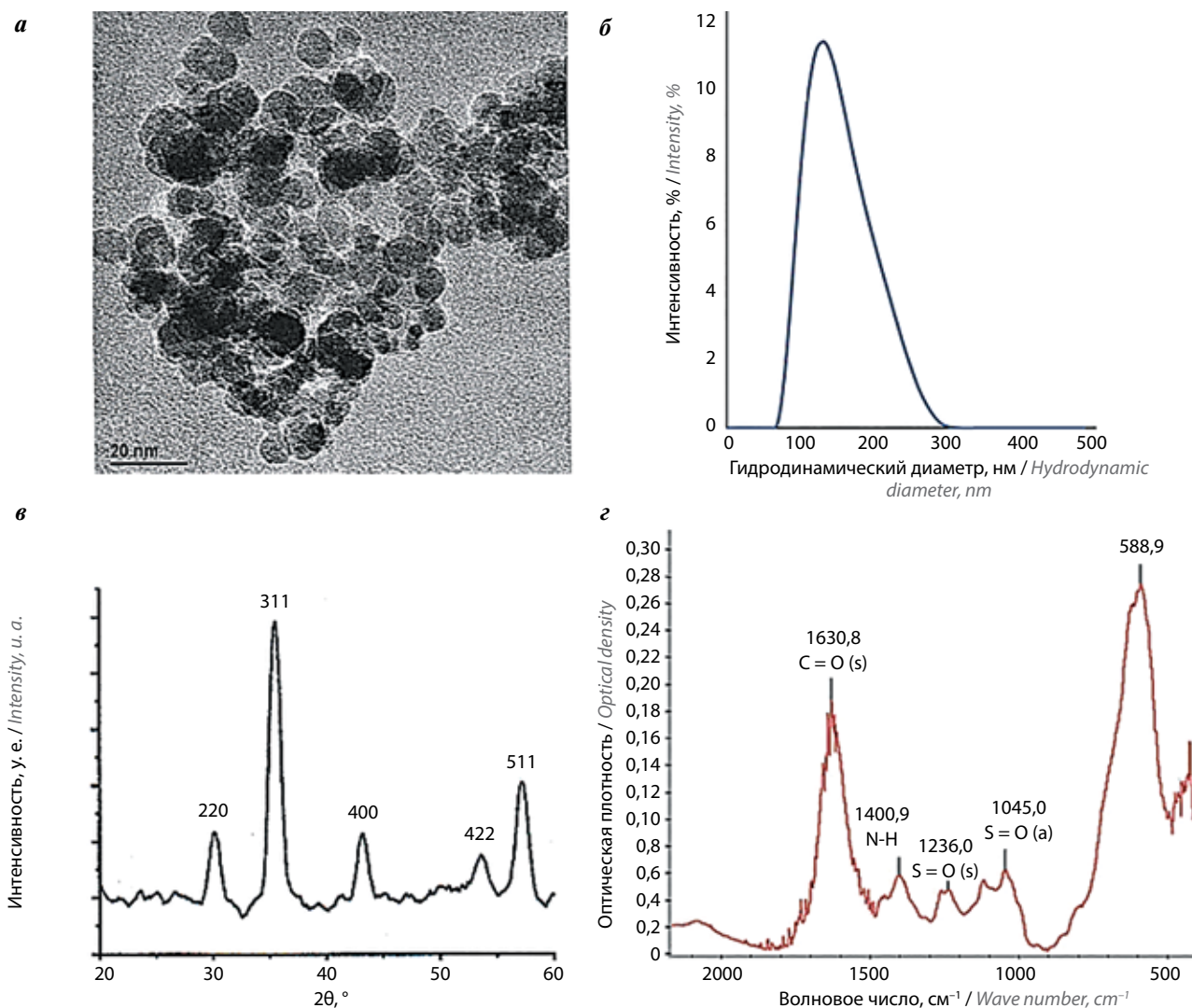


Рис. 1. Физические характеристики исследуемого нанопрепарата: а — сканирующая электронная микроскопия образца нанопрепарата; б — распределение наночастиц в образце по гидродинамическому диаметру (динамическое светорассеяние); в — качественный анализ (рентгеновская порошковая дифракция); г — структурно-элементный анализ (ИК-спектроскопия)

Fig. 1. Physical characteristics of studied nanopreparation: а — scanning electron microscopy of a nanopreparation sample; б — distribution of nanoparticles in a sample along the hydrodynamic diameter (dynamic light scattering); в — qualitative analysis (X-ray powder diffraction); г — structural element analysis (IR spectroscopy)

Противоопухолевая активность гепаринизированных наночастиц оксида железа в модели рабдомиосаркомы мышей

Для оценки противоопухолевой активности НЧ при комбинации с ЛТ рассчитаны показатели УПЖ мышей, подвергавшихся дозе облучения 2 Гр (рис. 2, а). Внутривенное введение НЧ мышам, получавшим облучение в дозе 2 Гр, способствовало увеличению средней продолжительности их жизни на 54 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой животных, получавших изолированную радиотерапию. При этом при понижении фракционной дозы до 1 Гр выживаемость всех экспериментальных групп была сто-процентной (рис. 2, б).

Результаты, полученные для мышей, подвергавшихся дозе облучения 1 Гр ($n = 24$), составили основу репрезентативных данных для оценки изменения объемов опухоли под воздействием ионизирующего облучения внутри экспериментальных подгрупп (рис. 3).

Внутриопухолевое введение гепаринизированных НЧ оксида железа в комбинации с ЛТ в дозе 1 Гр краткосрочно ингибировало опухоль на первой неделе облучения (ТРО=40 %; $p < 0,05$), но по результатам 2-й недели не оказало стабильного влияния на уменьшение объема опухоли по сравнению с радиотерапией. Вероятно, эффект был ограничен их частичным агрегированием и неравномерным распределением внутри опухолевого узла. Внутривенное введение НП

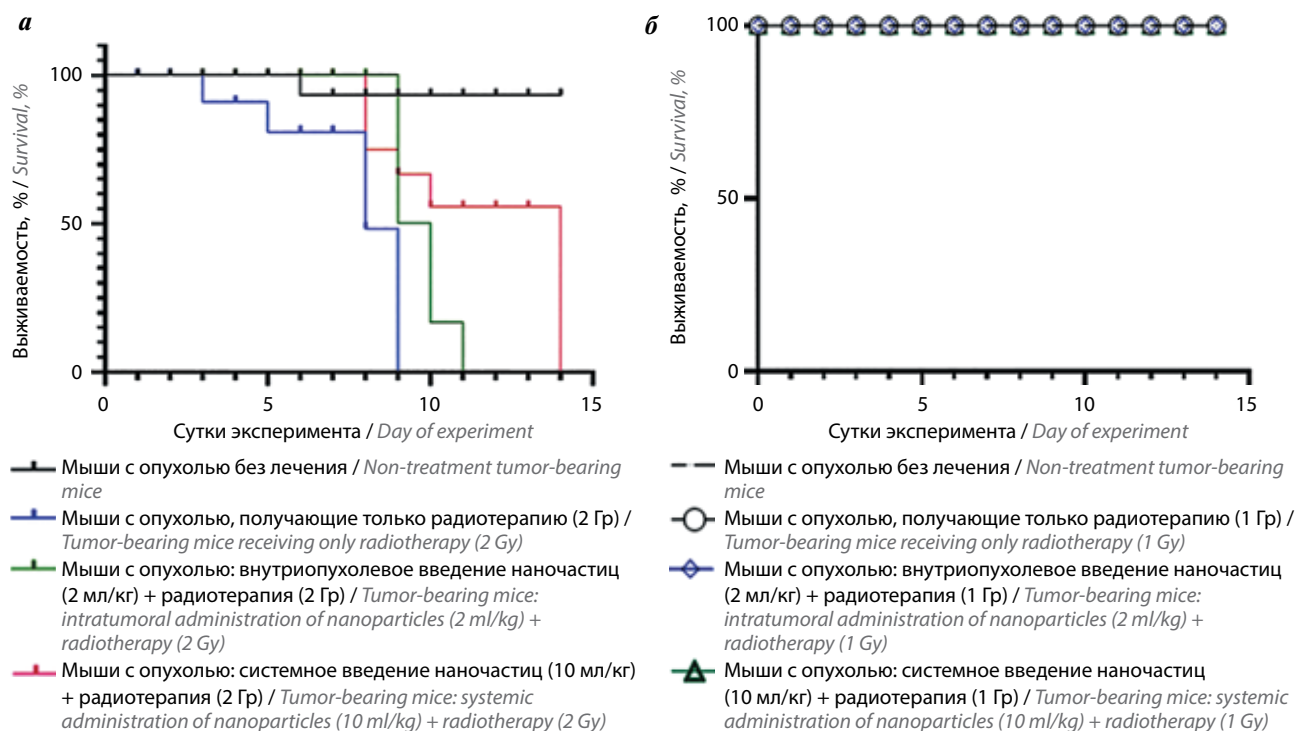


Рис. 2. График выживаемости экспериментальных мышей, получавших фракционную дозу 2 Гр (а) и 1 Гр (б) при внутривенном и внутриопухолевом введении нанопрепарата

Fig. 2. Survival graph of experimental mice exposed 2 Gy (a) and 1 Gy (б) fractional dose and subjected intravenous or intratumoral administration of nanopreparation

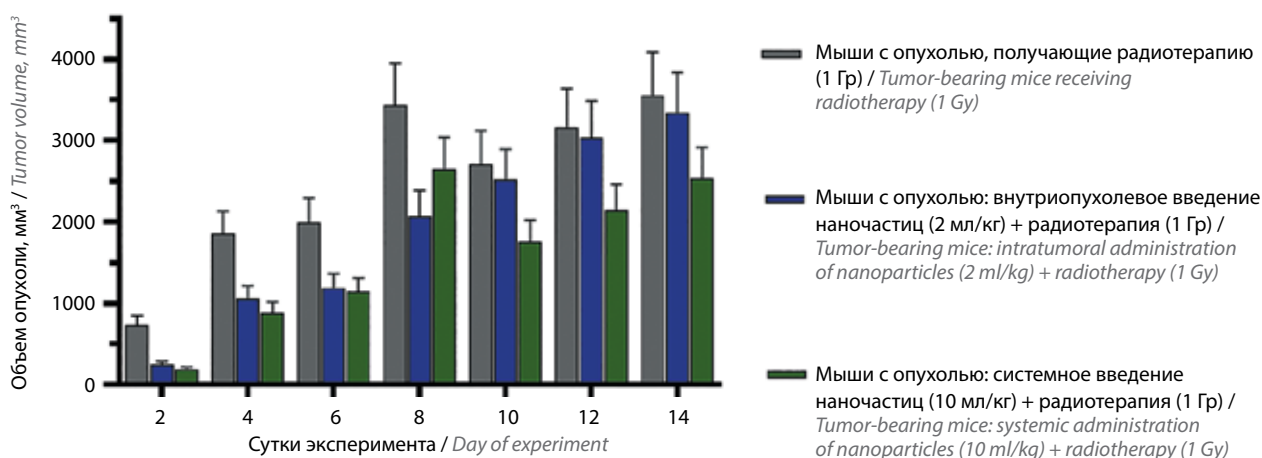


Рис. 3. Динамика изменения объема опухоли животных (нормализованные данные) при экспозиции с наночастицами (внутривенное или внутриопухолевое введение) в группах, подвергавшихся облучению 1 Гр

Fig. 3. Dynamics of changes in tumor volume of animals (normalized data) during exposure to nanoparticles (intravenous or intratumoral administration) in groups exposed to 1 Gy irradiation

в сочетании с облучением в дозе 1 Гр продемонстрировало повышенную, по сравнению с изолированной радиотерапией, эффективность лечения на протяжении всего эксперимента, снижая объем опухоли в исследуемой модели мышей с перевиваемой рабдомиосаркомой по сравнению с группой мышей, получавших только облучение: ТРО = 40 % (6-е сутки), ТРО = 29 % (14-е сутки); $p < 0,05$.

Результаты патоморфологического исследования селезенки, легких и печени мышей с рабдомиосаркомой

Умерщвление животных (при выведении из эксперимента) осуществляли путем помещения в CO_2 -камеру, гистологическая картина легких во всех группах была однотипной и характерной для удушья (рис. 4, а–г): чередование участков ателектазов

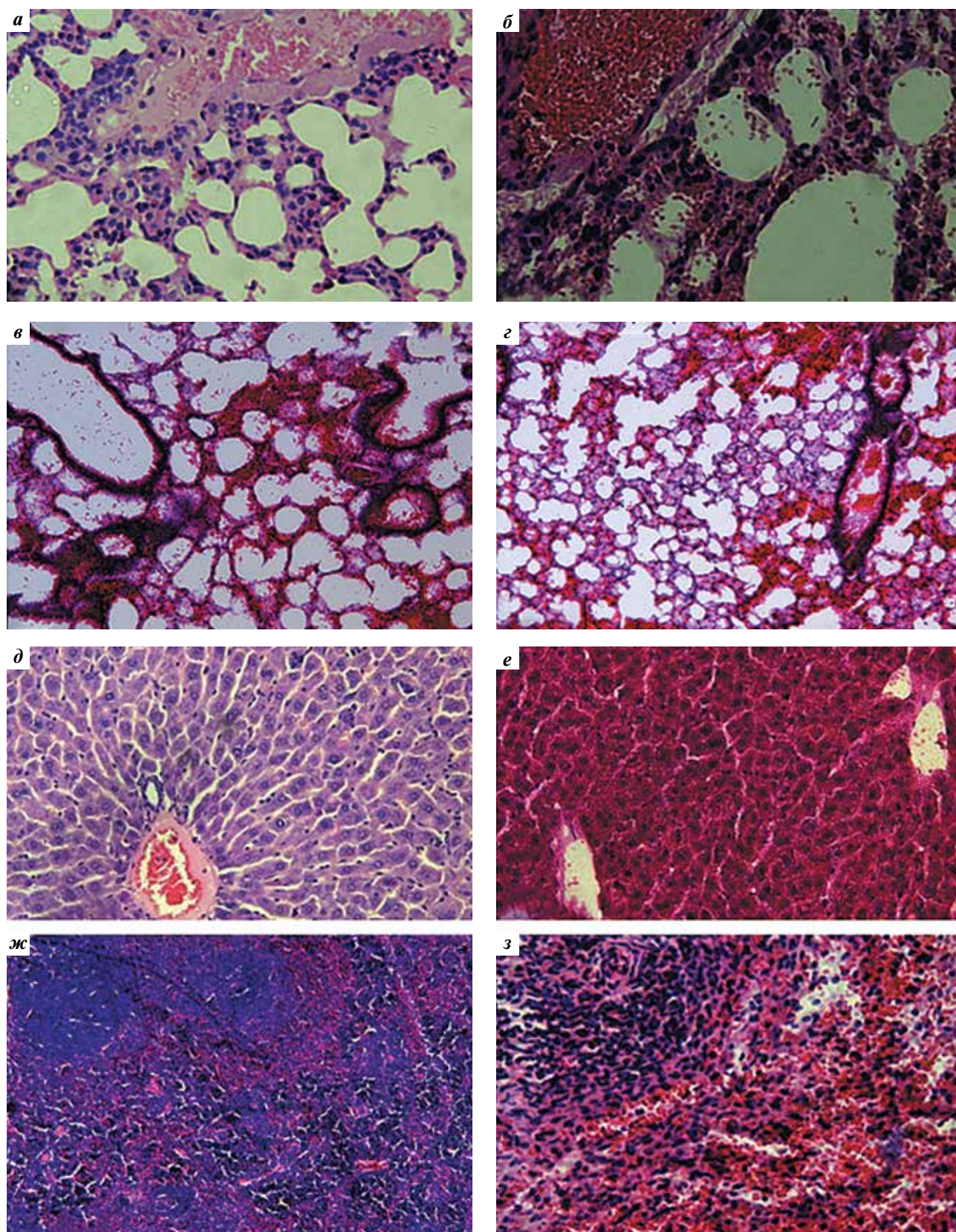


Рис. 4. Микрофотографии образцов легкого 1–4-й групп (а–г), печени 1-й, 2-й групп (д, е) и селезенки 1-й, 2-й групп (ж, з) экспериментальных животных

Fig. 4. Microphotographs of lung samples of groups 1–4 (a–г), liver of groups 1 and 2 (д, е) and spleen of groups 1 and 2 (ж, з) of experimental animals

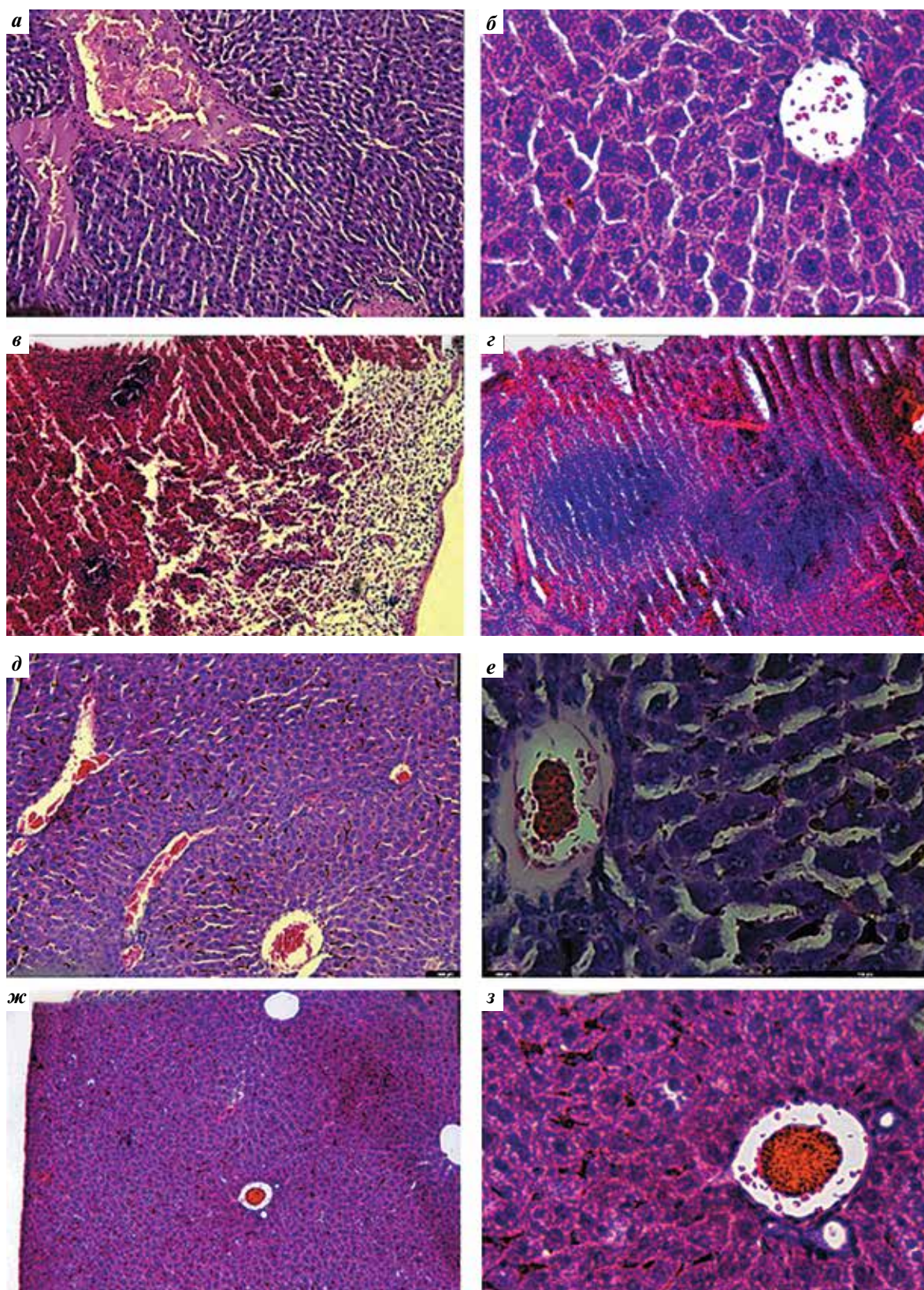


Рис. 5. Микрофотографии образцов печени (а, б) и селезенки (в, г) мышей 3-й группы. Микрофотографии образцов печени (д, е) и селезенки (ж, з) мышей 4-й группы. Увеличение: а, в, д, ж – $\times 10$; б, г, е, з – $\times 40$

Fig. 5. Microphotographs of the liver (а, б) and spleen (в, г) samples of mice from group 3. Microphotographs of the liver (д, е) and spleen (ж, з) samples of mice from group 4. Magnification: а, в, д, ж – $\times 10$; б, г, е, з – $\times 40$

и эмфизематозного расширения альвеол с разрывом межальвеолярных перегородок, интерстициальный отек легких с обширными участками микрокровоизлияний.

В микропрепаратах печени и селезенки 1-й группы (мыши без лечения, «б/л») существенных изменений не наблюдали (рис. 4, д, ж). В микропрепаратах печени животных 2-й группы, получавших только радиотерапию («РТ»), наблюдали гепатоциты с 2 ядрами или крупным ядром, при этом структура печеночных балок была сохранена, долики имели гексагональную форму, гепатоциты — без признаков дистрофии (рис. 4, е). В селезенке визуализировали белую и красную пульпы без атипичных изменений (рис. 4, з). В образцах печени (рис. 5, а, б) 3-й группы (радиотерапия + внутриопухолевое введение НЧ, «РТ + в/о») были обнаружены единичные клетки звездчатой формы (предположительно купферовские), расположенные между гепатоцитами, рядом с центральной веной; цитоплазма клеток содержит бурые включения (предположительно НЧ железа), при этом структура селезенки (рис. 5, в, г) сохранена. В образцах печени (рис. 5, д, е) группы 4 (радиотерапия + внутривенное введение НЧ, «РТ + в/в») по ходу печеночных балок, между гепатоцитами и гемокапилляром, визуализируются многочисленные скопления бурых агломератов, предположительно НЧ железа в составе купферовских клеток. Цитоплазма клеток печени (см. рис. 5, д, е) и селезенки (рис. 5, ж, з) была плотно заполнена бурыми включениями, предположительно НЧ железа.

Результаты морфологической оценки опухолевых образцов мышей с рабдомиосаркомой

Для морфологической оценки изучены образцы опухолей с прилежащими тканями латеральной

поверхности тела мышей. Морфологическая картина для опухолевых образцов была типичной: опухоль была представлена вытянутыми базофильными клетками овальной или полосовидной форм с размытыми краями (рис. 6, а). Ядра клеток обладали признаками полиморфизма: овальные, вытянутые, палочковидные, с 2—3 или 4—5 (до 8) ядрышками, встречались атипичные митозы. Опухолевая ткань отделялась от окружающих ее тканей организма капсулой, представленной фиброзной тканью (рис. 6, б), инфильтрированной опухолевыми клетками. В составе фиброзной капсулы наблюдались множественные расширенные сосуды гемомикроциркуляторного русла, с просветом, плотно заполненным эритроцитами в состоянии сладжа. Сосуды имели тонкую стенку, округлую или овальную формы и соответствовали венозному звену гемомикроциркуляторного русла.

Ниже приведены особенности, характеризующие каждую из исследуемых групп животных:

1-я — мыши без лечения, «б/л» (рис. 7, а): опухолевые клетки характеризовались крупным, округлым, часто просветленным ядром, с большим количеством ядрышек; опухоль отделялась от окружающих тканей толстой прослойкой фиброзной ткани (см. рис. 6, б); часто встречались сосуды гемомикроциркуляторного русла, все они были с признаками венозного застоя.

2-я — мыши, получавшие только радиотерапию («РТ») (рис. 7, б): клетки опухолевого очага имели меньший размер и более компактные ядра, вытянутой, преимущественно овальной формы, с повышенным содержанием гетерохроматина.

3-я — радиотерапия + внутриопухолевое введение НЧ, «РТ + в/о» (рис. 7, в): морфологическая картина соответствовала изменениям, выявленным во 2-й группе, однако внутри опухоли, преимущественно около капсулы, скапливались зерна бурого пигмента

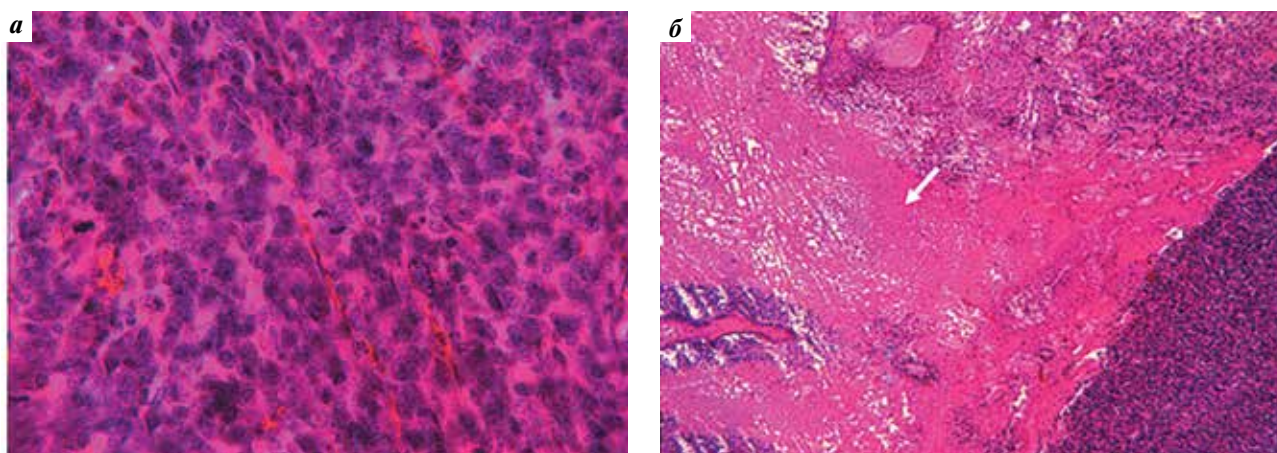


Рис. 6. Периферические срезы опухолей мышей 1-й группы: а (×40) — полнокровие гемокапилляров; полиморфизм опухолевых клеток; б (×10) — фиброзная капсула (↑)

Fig. 6. Peripheral sections of tumors from mice from group 1: а (×40) — plethora of hemocapillaries; polymorphism of tumor cells; б (×10) — fibrous capsule (↑)

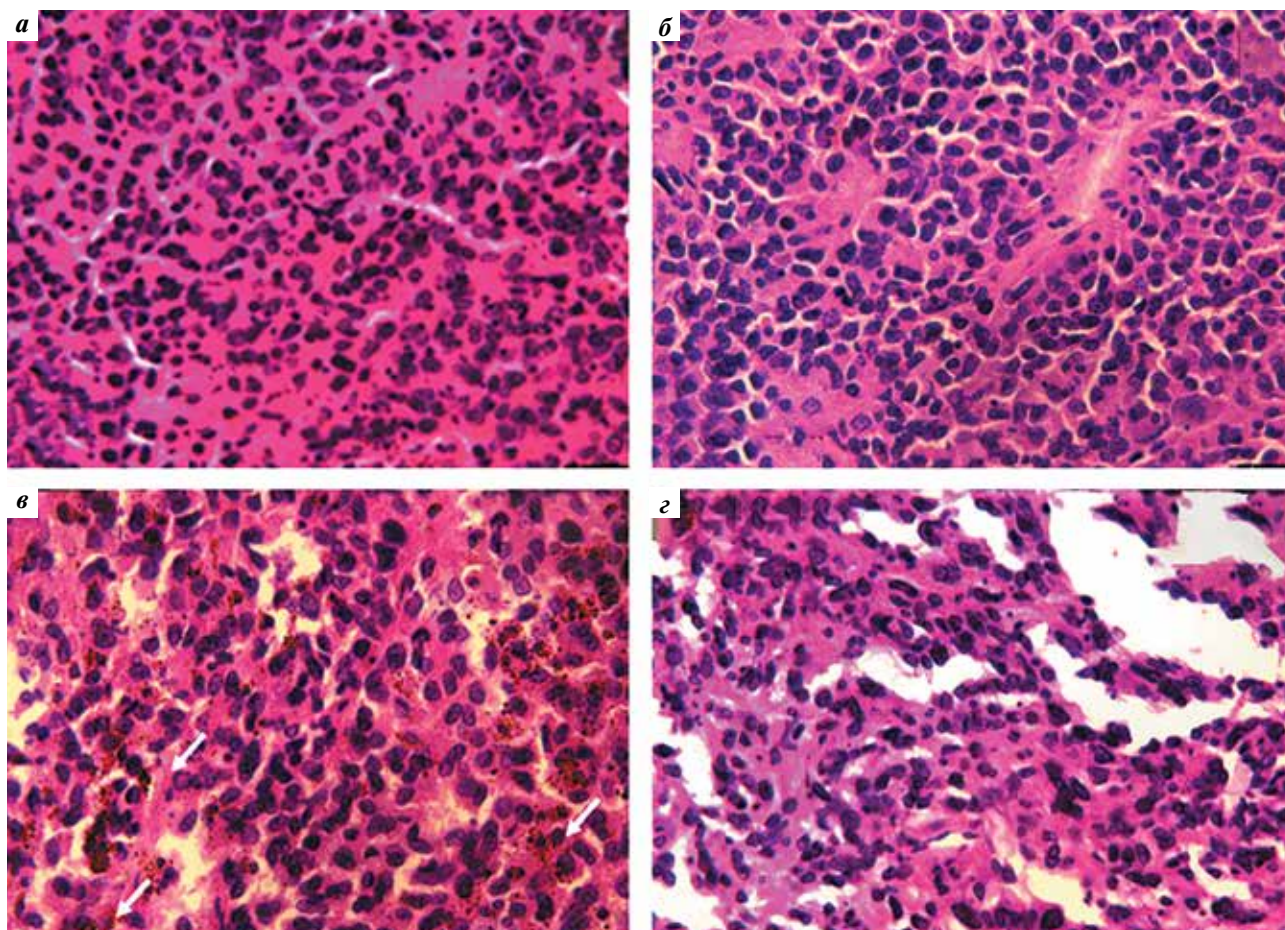


Рис. 7. Центральные срезы опухолей мышей 1–4 (а–г) групп ($\times 40$): а – характерная гистологическая картина опухоли; клетки с размытыми краями овальной полосовидной формы; б – слабый полиморфизм; в – слабый полиморфизм, участки опухоли с гранулами бурого пигмента ($\uparrow$); г – выраженный полиморфизм, ядра разного размера и формы, фактическое отсутствие гранул бурого пигмента в межклеточном пространстве

Fig. 7. Central sections of tumors from mice of groups 1–4 (a–г) ($\times 40$): а – characteristic histological picture of the tumor; cells with blurred edges, oval, stripe-shaped; б – weak polymorphism; в – weak polymorphism, tumor areas with brown pigment ($\uparrow$); г – pronounced polymorphism, nuclei of different sizes and shapes, virtual absence of brown pigment granules in the intercellular space

(НЧ), разные по величине (рис. 8, а). Вероятно, НЧ были интернализованы в цитоплазму клеток, а не адгезированы на их поверхности, поскольку при микроскопии они располагались преимущественно в пределах клетки, а не на ее периферии, и имели одинаково четкие с ядерными структурами края, что указывает на то, что они располагаются на одном фокусном расстоянии, вместе с тем отмечено скопление НЧ у опухолевой капсулы, которая приобретала бурый оттенок (рис. 8, б).

4-я – радиотерапия + внутривенное введение НЧ, «РТ + в/в» (рис. 7, г): внутри опухоли не наблюдалось локальных скоплений агрегатов НЧ в межклеточном пространстве (в отличие от 3-й группы) – предположительно, эффективность НЧ была обусловлена фактом их поглощения без агрегирования, что делает их труднодетектируемыми в гистологическом препарате. Присутствовали многочисленные нарушения

гемомикроциркуляции и расширенные гемокapилляры на периферии опухоли (рис. 8, в).

Как при внутриопухолевом, так и при внутривенном введении НЧ наблюдали динамическое уменьшение толщины капсулы опухоли, что, вероятно, вызвано затруднением ее кровоснабжения за счет захвата НЧ структурами опухоли. Задачу детекции НЧ впоследствии будет возможно решить проведением атомно-абсорбционного анализа образцов опухоли (в репрезентативных точках) и их сопоставлением по количественному содержанию железа. В каком объеме существует кумуляция НЧ в клетках опухоли – предстоит выяснить.

Обсуждение

Мы предполагаем, что наблюдаемые эффекты могут относиться к радиосенсибилизации НЧ оксида железа, т.е. повышению восприимчивости опухоли

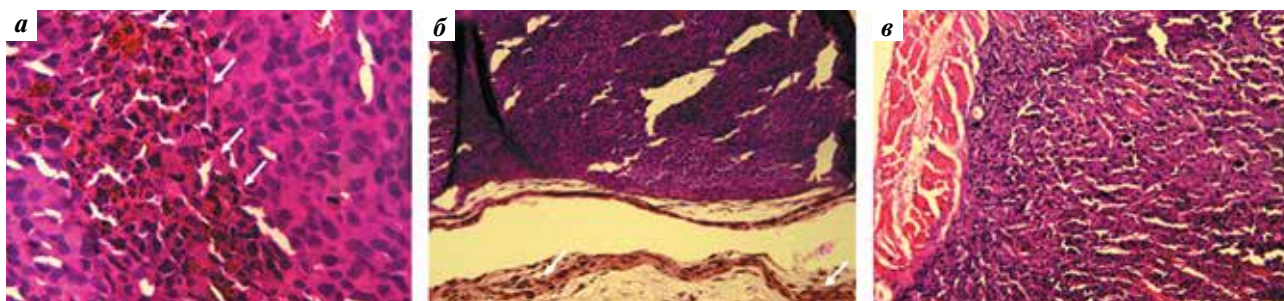


Рис. 8. Микрофотографии опухолей мышей 3-й и 4-й групп: а ($\times 40$) — участок опухоли с высокой концентрацией гранул бурого пигмента ($\uparrow$); б ($\times 10$) — периферический участок опухоли за пределами зоны с высокой концентрацией гранул бурого пигмента: в клетках пигмента нет, однако капсула и близлежащие к опухоли ткани окрашены в бурый цвет ($\uparrow$); в ($\times 10$) — истончение капсулы опухоли мыши, снижение ее васкуляризации

Fig. 8. Tumor microphotographs of mice from groups 3 and 4: а ($\times 40$) — tumor area with a high concentration of brown pigment granules ($\uparrow$); б ($\times 10$) — peripheral tumor area outside the zone with a high concentration of brown pigment granules: no pigment in cells, but the capsule and tissues adjacent to the tumor are colored brown ($\uparrow$); в ($\times 10$) — thinning of the mouse tumor capsule, decreased vascularization

к облучению [22, 23]. Сенсибилизация ЛТ НЧ оксида железа опосредована в первую очередь повышением количества свободных радикалов за счет увеличения локализованной эмиссии вторичных электронов из НЧ (реакции Фентона и Габера–Вейса) [11, 12]. Более того, более низкий рН среды опухоли коррелирует с усиленной стимуляцией высвобождения активных форм кислорода с помощью НЧ оксида железа, поэтому эффект Варбурга в данном случае будет повышать противоопухолевую специфичность. Реакции переноса электронов так или иначе влияют на клеточные процессы опухолевой клетки, способствуя обширному повреждению клеточных органелл, митохондриальному стрессу, инициированию окисления белков и липидов, что в итоге приводит к значительному проценту клеточной гибели по механизму ферроптоза [10, 12]. Стоит также отметить влияние общепризнанного эффекта ППУ НЧ оксида железа опухолевыми клетками. Благодаря эффекту ППУ любые сенсибилизирующие эффекты отмечаются в большей степени в опухолях, хотя бы из-за того, что опухолевые клетки поглощают во много раз больше НЧ, чем здоровые эпителиальные. Наконец, НЧ оксида железа могут способствовать радиочувствительности, влияя на клеточный цикл: либо останавливая его в наиболее радиочувствительной фазе G2/M, либо останавливая репликацию и программируя часть радиорезистентных клеток S-фазы на смерть [24]. При

этом радиотерапия и НЧ оксида железа усиливают друг друга по повреждающему эффекту внутри фазы, продолжая подвергать клетки окислительному стрессу и провоцировать ферроптоз. В данном случае все описанные эффекты имеют предположительный характер и требуют изучения на молекулярном уровне; проведенное исследование дало начало поиску эффективных модификаций, так как существует необходимость обеспечить лучшее биораспределение частиц внутри опухоли, которое будет возможно от начала до конца контролировать после введения. Наряду с описанными эффектами для НЧ оксида железа можно использовать принцип магнитной гипертермии, что обеспечит повышенную эффективность доставки и соответствующее усиление целенаправленного действия.

Заключение

Исследуемый НП оксида железа $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ повышал способность ЛТ ингибировать рост опухоли при внутривенном введении и последовательном облучении экспериментальных мышей с рабдомиосаркомой, эффект сохранялся в течение 2 нед комбинированной противоопухолевой терапии. После исследования молекулярной динамики НП может быть рассмотрен как платформа для конъюгирования с терапевтическими молекулами в рамках повышения эффективности первичного курса ЛТ.

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

1. Koksharov Y.A., Gubin S.P., Taranov I.V. et al. Magnetic nanoparticles in medicine: progress, problems, and advances. *J. Commun Technol Electron* 2022;67(2):101–16. DOI: 10.1134/S1064226922020073
2. Chavali M.S., Nikolova M.P. Metal oxide nanoparticles and their applications in nanotechnology. *SN Appl Sci* 2019;1(6):607. DOI: 10.1007/s42452-019-0592-3
3. De Leo V., Milano F., Agostiano A., Catucci L. Recent advancements in polymer/liposome assembly for drug delivery: from surface modifications to hybrid vesicles. *Polymers (Basel)* 2021;13(7):1027. DOI: 10.3390/polym13071027
4. Zhao S., Yu X., Qian Y. et. al. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics. *Theranostics* 2020;10(14):6278–309. DOI: 10.7150/thno.42564
5. Gerlowski L.E., Jain R.K. Microvascular permeability of normal and neoplastic tissues. *Microvasc Res* 1986;31(3):288–305. DOI: 10.1016/0026-2862(86)90018-x
6. Matsumura Y., Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res* 1986;46(12 Pt 1):6387–92. PMID: 2946403
7. Mai T., Hilt J.Z. Magnetic nanoparticles: reactive oxygen species generation and potential therapeutic applications. *J Nanopart Res* 2017;19(7):253. DOI:10.1007/s11051-017-3943-2
8. Fernández-Acosta R., Iriarte-Mesa C., Alvarez-Alminaque D. et al. Novel iron oxide nanoparticles induce ferroptosis in a panel of cancer cell lines. *Molecules* 2022;27(13):3970. DOI: 10.3390/molecules27133970
9. Rodriguez-Torres M.P., Acosta-Torres L.S., Diaz-Torres L.A. Heparin-based nanoparticles: an overview of their applications. *J Nanomater* 2018;8:1–8. DOI: 10.1155/2018/9780489
10. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer Statistics, 2022. *CA Cancer J Clin* 2022;72(1):7–33. DOI: 10.3322/caac.21708
11. Martin-Giacalone B.A., Weinstein P.A., Plon S.E., Lupo P.J. Pediatric rhabdomyosarcoma: epidemiology and genetic susceptibility. *J Clin Med* 2021;10(9):2028. DOI: 10.3390/jcm10092028
12. Lammers G., van de Westerlo E.M., Versteeg E.M. et. al. A comparison of seven methods to analyze heparin in biomaterials: quantification, location, and anticoagulant activity. *Tissue Eng Part C Methods* 2011;17(6):669–76. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0010
13. NANOTRAC Flex. Application Note. URL: <https://www.microtrac.com/ru/products/dynamic-light-scattering/nanotracs-flex/>
14. Shiramata Y. Micro-area X-ray diffraction measurement by SmartLab μ HR diffractometer system with ultra-high brilliance microfocus X-ray optics and two-dimensional detector HyPix-3000. URL: https://www.rigaku.com/newsletters/mabu/march2016/RigakuJournal_XRD.pdf
15. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Ч. I. М.: Гриф и К, 2012.
16. Mironov A.N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Edited by A.N. Mironov. Part One. Moscow: Grif i K, 2012. (In Russ.).
17. Fakhardo A., Anastasova E., Makarov V. et al. Heparin-coated iron oxide nanoparticles: application as a liver contrast agent, toxicity and pharmacokinetics. *J Mater Chem B* 2022;10(38):7797–807. DOI: 10.1039/d2tb00759b
18. Edmondson E.F., Hunter N.R., Weil M.M., Mason K.A. Tumor induction in mice after localized single- or fractionated-dose irradiation: differences in tumor histotype and genetic susceptibility based on dose scheduling. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015;92(4):829–36. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2015.03.002
19. Трешалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под общ. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 637–51.
20. Treshhalina, E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K., Andronova N.V. et al. Methodological guidelines for the study of the antitumor activity of pharmacological substances. In the book: Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Ed. prof. R.U. Khabriev. Moscow: Medicina, 2005. P. 637–51. (In Russ.).
21. Routine Mayer's hematoxylin and eosin stain (H&E). Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology (third edition). URL: http://tvmouse.ucdavis.edu/bcancercd/52/prcl_HandE.html
22. Sun H., Jiao R., An G. et al. Influence of particle size on the aggregation behavior of nanoparticles: Role of structural hydration layer. *J Environ Sci (China)* 2021;103:33–42. DOI: 10.1016/j.jes.2020.10.007
23. Bogdan N., Rodríguez E.M., Sanz-Rodríguez F. et. al. Bio-functionalization of ligand-free upconverting lanthanide doped nanoparticles for bio-imaging and cell targeting. *Nanoscale* 2012;4(12):3647–50. DOI: 10.1039/c2nr30982c
24. Hauser A.K., Mitov M.I., Daley E.F. et. al. Targeted iron oxide nanoparticles for the enhancement of radiation therapy. *Biomaterials* 2016;105:127–35. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.07.032
25. Shestovskaya M.V., Luss A.L., Bezborodova O.A. et. al. Iron oxide nanoparticles in cancer treatment: cell responses and the potency to improve radiosensitivity. *Pharmaceutics* 2023;15(10):2406. DOI: 10.3390/pharmaceutics15102406
26. Wu J., Sun J. Investigation on mechanism of growth arrest induced by iron oxide nanoparticles in PC12 cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2011;11(12):11079–83. DOI: 10.1166/jnn.2011.3948

Благодарность

Авторы выражают благодарность коллегам из химико-биологического кластера ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет ИТМО».

Acknowledgments

The authors express their gratitude to colleagues from the chemical and biological cluster of the ITMO University.

Вклад авторов

М.В. Шестовская, А.Л. Лусс: получение и анализ экспериментальных данных, написание текста рукописи;

В.В. Макаров, В.С. Юдин, А.А. Кескинов: разработка дизайна исследования, редактирование текста.

Author's contribution

M.V. Shestovskaya, A.L. Luss: obtaining data and analysis; writing the manuscript;

V.V. Makarov, V.S. Yudin, A.A. Keskinov: research design development, editing the manuscript.

ORCID авторов / ORCID of authors

М.В. Шестовская / M.V. Shestovskaya: <https://orcid.org/0000-0001-5438-1273>

А.Л. Лусс / A.L. Luss: <https://orcid.org/0000-0001-8539-0252>

В.В. Макаров / V.V. Makarov: <https://orcid.org/0000-0001-9495-0266>

В.С. Юдин / V.S. Yudin: <https://orcid.org/0000-0002-9199-6258>

А.А. Кескинов / A.A. Keskinov: <https://orcid.org/0000-0001-7378-983X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Федерального медико-биологического агентства в рамках государственного задания № 388-00154-21-00.

Funding. The work was carried out with the support of the Federal Medical and Biological Agency within the framework of State Assignment No. 388-00154-21-00.

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. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» Сибирского отделения Российской академии наук (заключение Р-02-11.2020-14).

Compliance with bioethics

The study was carried out in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for research and other scientific aims. The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (assessment P-02-11.2020-14).

Статья поступила: 27.09.2023. Принята в печать: 12.08.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.2024.

Article received: 27.09.2023. Accepted for publication: 12.08.2024. Published online: 00.00.2024.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-78-85>

Изучение и подбор оптимальных реологических характеристик гелевых композиций пирacetama для интраназального применения

Э.Ф. Степанова¹, Е.В. Ковтун¹, Н.Д. Бунятян², Мониб М.И. Даду¹, И.М. Привалов¹, А.П. Плетень³

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 357532 Пятигорск, пр-кт Калинина, 11;

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

³НОИ «Институт фармации им. К.М. Лакина» ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России; Россия, 127006 Москва, ул. Долгоруковская, 4

Контакты: Елена Владимировна Ковтун elena.f.73@mail.ru

Введение. Одно из важных направлений фармацевтических исследований — создание новых, а также совершенствование существующих востребованных лекарственных форм (ЛФ) с использованием в качестве активной субстанции уже известных лекарственных средств. Актуальны вопросы разработки лекарственных средств, активизирующих интегративные свойства и функции мозга, а также повышающих устойчивость организма к агрессивным воздействиям. Ноотропы, а именно пирacetam и его аналоги, успешно применяют в неврологической, психиатрической и наркологической практике. При этом интраназальный способ введения привлекателен для комбинированной и длительной терапии этих заболеваний. При разработке новых интраназальных композиций должны быть решены вопросы выбора оптимального сочетания вспомогательных компонентов, позволяющих ЛФ легко распределяться в полости носа. Выбор оптимальных составов по консистентным свойствам возможен на основании данных реологических исследований, которые позволяют не только спрогнозировать свойства разрабатываемой ЛФ, но и подобрать необходимый состав и соотношение компонентов. Кроме того, важным показателем качества мягких ЛФ, влияющим на потребительские свойства, является их стабильность при транспортировке и хранении, а также такой показатель, как намазываемость.

Цель исследования — выбор оптимального состава геля с пирacetamом на основе реологических характеристик и прогнозирования термо- и коллоидной стабильности гелевой структуры.

Материалы и методы. В качестве гелевой основы выбраны карбоксиметилцеллюлоза, хитозан и карбопол. Реологические характеристики образцов изучали методом ротационной вискозиметрии на вискозиметре Fungilab Premium (Испания). Данные получены и собраны посредством программы Fungilab Data Boss; дополнительную обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты. Выбран гелеобразователь и определены его реологические характеристики.

Заключение. Выбрана оптимальная композиция вспомогательных веществ геля с пирacetamом с учетом базовых реологических показателей.

Ключевые слова: интраназальные лекарственные формы, гелевые композиции, пирacetam, реологические характеристики

Для цитирования: Степанова Э.Ф., Ковтун Е.В., Бунятян Н.Д. и др. Изучение и подбор оптимальных реологических характеристик гелевых композиций пирacetama для интраназального применения. Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):78–85.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-78-85>

Study and selection of optimal rheological characteristics of piracetam gel compositions for intranasal use

Eleonora F. Stepanova¹, Elena V. Kovtun¹, Natalya D. Bunyatyan², Moneb M. Y. Dadou¹, Igor M. Privalov¹, Anatoly P. Pleten³

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute — a branch of the Volga State Medical University, Ministry of Health of Russia; 11 Kalinina Prospekt, Pyatigorsk 357532, Russia;

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

³K.M. Lakin Institute of Pharmacy of the Russian University of Medicine, Ministry of Health of Russia; 4 Dolgorukovskaya St., Moscow 127006, Russia

Contacts: Elena Vladimirovna Kovtun elena.f.73@mail.ru

Background. One of the important areas of pharmaceutical research is the creation of new, as well as improvement of existing, in-demand dosage forms, using already known drugs as active substances. Current issues are the development of drugs that activate the integrative properties and functions of the brain, as well as increase the body's resistance to aggressive influences. Nootropics, namely piracetam and its analogues, are successfully used in neurological, psychiatric and drug treatment practice. At the same time, the intranasal route of administration is attractive for combined and long-term therapy of these diseases. When developing new intranasal compositions, the issues of choosing the optimal combination of excipients that allow the dosage form to be easily distributed in the nasal cavity must be resolved. The selection of optimal compositions based on consistency properties is possible on the basis of rheological research data, which allows not only to predict the properties of the dosage form being developed, but also to select the required composition and ratio of components. In addition, an important indicator of the quality of soft dosage forms that affects consumer properties is their stability during transportation and storage, as well as such an indicator as spreadability.

Aim. Selection of the optimal composition of the gel with piracetam based on rheological characteristics and predicting the thermal and colloidal stability of the gel structure.

Materials and methods. Carboxymethyl cellulose, chitosan and carbopol were chosen as the gel base. The rheological characteristics of the samples were studied by rotational viscometry on a Fungilab Premium viscometer (Spain). Data were obtained and collected using Fungilab Data Boss software; additional data processing was carried out using Microsoft Excel.

Results. The gelling agent was selected and its rheological characteristics were determined.

Conclusion. The optimal composition of excipients piracetam gel was selected taking into account the basic rheological parameters.

Keywords: intranasal dosage forms, gel compositions, piracetam, rheological characteristics

For citation: Stepanova E.F., Kovtun E.V., Bunyatyan N.D. et al. Study and selection of optimal rheological characteristics of piracetam gel compositions for intranasal use. *Rossiiskij bioterapevticeskij zurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):78–85.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-78-85>

Введение

Значимый и обязательный вопрос при разработке любой лекарственной формы (ЛФ) — выбор оптимальной композиции вспомогательных веществ, одно из требований к которым — необходимость обеспечивать оптимальные технологические характеристики ЛФ. Реологические характеристики различных материалов показывают то, как материал деформируется и течет под воздействием внешних сил. Текучесть материалов во многом зависит от их вязкости, эластичности и пластичности при физических деформациях, что может кардинально повлиять на поведение материала, особенности технологического процесса, упаковки, хранения и использования [1].

Всестороннее изучение и понимание реологических свойств мягких и гелеобразных составов для местного применения особенно актуально, поскольку эти составы обычно демонстрируют разжижение при внешнем воздействии или уплотняются при наличии внутреннего напряжения (т. е. проявляют неньютоновское поведение).

Реологическая характеристика объекта служит важным инструментом для разработки лекарственных препаратов (ЛП), отвечающих как всем текущим

нормам качества, так и требованиям к дизайну и удобству применения. Например, реологические показатели помогают нам понять, почему разные продукты с одинаковой вязкостью ведут себя по-разному при применении, почему продукты оседают или разделяются в течение срока годности и почему некоторые составы растекаются, в то время как другие сохраняют структуру при внешнем воздействии. Реологические показатели влияют на сенсорные и *in vivo* характеристики продукта. Таким образом, реология является ценным инструментом в разработке важных целевых продуктов и может служить руководством для подбора надежных рецептур, а также сократить время на разработку оригинального ЛП [1, 2].

Цель настоящего исследования — выбор оптимального состава геля с пирацетамом на основе реологических характеристик и прогнозирования термодинамической стабильности гелевой структуры.

Материалы и методы

Работы по подбору и оценке нового гелевого состава с пирацетамом для назального применения разделены на 3 этапа:

- выбор гелевой основы;
- подбор оптимальной концентрации гелеобразователя;
- оценка влияния действующего вещества (ДВ) на реологические характеристики гелевой основы.

На 1-м этапе производили выбор оптимального гелеобразователя. В качестве гелеобразователей рассматривали хитозан, карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) и карбопол, соответствующие требованиям действующей нормативной документации по качеству. Указанные гелеобразователи — вещества, наиболее широко применяемые в фармацевтической промышленности в качестве безопасных и эффективных гелевых основ, способные легко высвобождать ДВ. В рамках настоящей работы использовали методики, включенные в Государственную фармакопею Российской Федерации XV издания. Применяли следующие приборы и оборудование: центрифугу лабораторную ОПН-12 «Плазма» (ООО «Дастан», Россия) с частотой вращения 6000 об/мин и набором пробирок, баню-термостат водяную (WB-4MS, SIA BIOSAN, Латвия), весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200,0 г (HRT-220CE, Vibra Shinko Denshi, Япония), термометр стеклянный ТЛ-2 № 2 (ОАО «Термоприбор», Россия) с интервалом измеряемых температур от 0 до 100 °С, магнитную мешалку (ММ 3М, Россия), стереомикроскоп «Альтами СМ0655-Т» (ООО «Альтами», Россия), вискозиметр Fungilab Premium H (Fungilab, Испания).

Все компоненты вводили в количестве 3 %, что достаточно для образования стабильной гелевой структуры. После выбора гелевой основы оценивали влияние концентрации гелеобразователя на реологические характеристики геля. Исследование проводили в диапазоне концентраций от 1 до 5 %, оценивая влияние введения различных количеств ДВ в гелевую основу.

Измерение вязкости жидкости требует определения параметров, с помощью которых можно описать процесс ее течения [2–4]. Реологические характеристики образцов изучали методом ротационной вискозиметрии с помощью измерительной системы «цилиндр в цилиндре».

Диапазон измерения вязкости зависит от геометрии (размера и формы) применяемого шпинделя, а также от частоты его вращения. В настоящем исследовании использовали шпиндель TR 8 с адаптером для образца малого объема. Данные получены и собраны посредством программы Fungilab Data Boss (version 1.0.16, Fungilab); дополнительную обработку данных осуществляли с помощью программы Microsoft Excel.

На начальном этапе проводили элиминацию пузырьков газа из всех образцов геля с помощью ваку-

умирования при давлении $-0,08$ мПа в течение 10–15 мин. Исследуемые образцы гелей поочередно помещали в цилиндр ротационного вискозиметра. Исследования реализовывали в диапазоне скорости вращения шпинделя от 0,1 до 250,0 об/мин. Показатели вязкости, скорости и напряжения сдвига измеряли каждый оборот шпинделя, общее время экспозиции образца в направлении увеличения скорости вращения, а затем ее уменьшения составило 20 мин.

В настоящее время существует большое количество математических моделей, применяемых для описания результатов реологических измерений. Большинство из них ориентировано на определенные объекты исследования и процессы [5, 6].

Для каждого из исследуемых составов гелей подбирали оптимальную модель исходя из показателя достоверности модели для каждого конкретного образца.

При исследовании вязкости концентрированных растворов полимеров (составы 1–3) наблюдали различные аномальные явления: вязкость изменялась во времени, зависела от предшествующей истории раствора и, наконец, коэффициент вязкости не был постоянной величиной, а связан с градиентом скорости или с приложенным давлением. Связь с градиентом скорости свидетельствовала о неподчинении концентрированных растворов закону Ньютона, так как сначала вязкость уменьшалась, что связано с ростом давления, а при дальнейшем увеличении давления она оставалась постоянной.

Затем провели оценку тиксотропных свойств гелевых композиций. Тиксотропия является наиболее важным критерием оценки мазевых и гелевых основ, особенно при установлении обратимости процесса — возрастания вязкости в период покоя. Это позволяет определить подходящий тип смесителя, а при низкой вязкости обеспечить отличное смешивание с другими компонентами [6, 7].

Процесс восстановления пространственной межмолекулярной структуры внутри геля должен быть преобладающим и практически мгновенным (применимо к конкретным условиям). Если этого не обеспечить, то процесс восстановления структуры не сможет гарантировать удовлетворительного качества любого состава, что приведет к его расслоению или оседанию частиц. При этом на графике, отражающем процесс разрушения и восстановления гелевой структуры, данные явления отображены в виде 2 кривых. Так, 1-я кривая, расположенная над 2-й, ограничивает площадь петли гистерезиса, которая пропорциональна энергии, необходимой для разрушения тиксотропной структуры.

Для выбранных образцов определили термодинамическую и коллоидную стабильность — параметры, позволяющие прогнозировать устойчивость в процессе

производства и хранения при изменении температурных режимов и механическом воздействии.

Термостабильность исследовали согласно известной методике. Для этого нагревали 10,0 геля в хорошо закрытой пробирке в водяной бане-термостате при температуре 37 ± 1 °C в течение 24 ч. При этом не отмечали расслоений, отсутствовали такие процессы, как коагуляция, уплотнение, помутнение, разжижение. После замораживания гелей в пробирке до температуры -20 °C и при последующем постепенном оттаивании при комнатной температуре расслоений также не наблюдали. Коллоидную стабильность или устойчивость модельных гелей к расслоению определяли при центрифугировании: гелевые системы при центрифугировании в течение 5 мин при скорости 6000 об/мин не расслаивались.

Кроме того, провели определение намазываемости гелей как показателя, характеризующего комфортность применения ЛФ. Для этого образцы массой примерно 1,0 г помещали на 1-ю стеклянную пластинку размером 10×10 см и накрывали сверху 2-й. После этого на стеклянные пластинки с гелем помещали одинаковый груз массой 100,0 г. Гель под дей-

ствием тяжести стекла и груза растекается (моделируя усилия, прилагаемые для распределения геля по коже), образуя пятно определенного диаметра. Последний измеряли, внося поправку на неравность диаметров образовавшихся пятен. Проводили сравнение полученных показателей (диаметра) испытуемых образцов геля с пираретамом и основы-гелеобразователя соответствующей концентрации. Для сравнения исследовали гели Отофаг и Виферон, успешно применяемые в оториноларингологической практике.

Результаты

Оценку влияния введения различных количеств ДВ в гелевую основу провели в составах, приведенных в табл. 1.

Все исследуемые составы содержат в структуре высокомолекулярные соединения, оказывающие выраженное влияние на реологические характеристики ЛФ. Для каждого из исследуемых составов гелей подобрали оптимальную математическую модель, применяемую для описания результатов реологических измерений исходя из показателя достоверности модели для каждого конкретного образца (табл. 2).

Таблица 1. Состав модельных гелей для исследования структурно-механических свойств

Table 1. Composition of model gels for the study of structural and mechanical properties

Модельные составы Model compositions	Компоненты модельного геля, % Components of the model gel, %			
	действующее вещество (пираретам) active ingredient (piracetam)	вспомогательные вещества excipients		
		хитозан chitosan	карбопол carbopol	карбоксиметилцеллюлоза carboxymethyl cellulose
Выбор гелеобразователя Selection of gelling agent				
1	—	3	—	—
2	—	—	3	—
3	—	—	—	3
Подбор оптимальной концентрации гелеобразователя Selection of optimal concentration of gelling agent				
4	—	1	—	—
5	—	3	—	—
6	—	5	—	—
Оценка влияния действующих веществ на реологические характеристики гелевой основы Evaluation of the effect of active ingredients on the rheological characteristics of the gel base				
7	—	3	—	—
8	5	3	—	—

Таблица 2. Результаты определения течения жидкостей геля

Table 2. Results of determining the flow of gel fluids

Исследуемые составы Investigated compositions	Достоверность использования моделей течения жидкости, % Reliability of using fluid flow models, %				
	Bingham	Casson (Standart)	NCA/CMA Casson	Power Law	IPC Paste
1	99,54	99,47	99,47	97,21	99,21
2	99,31	99,56	99,56	97,38	95,14
3	99,82	99,76	99,76	98,23	98,23
4	98,82	99,76	99,54	98,54	98,16
5	92,76	92,76	99,45	97,86	97,86
6	74,58	80,30	80,30	97,46	97,46
7	99,51	99,45	99,51	97,95	97,95
8	93,45	95,74	98,54	99,77	99,77

По результатам измерений и статистической обработки построили кривые вязкости исследуемых образцов, приведенные на рис. 1–3.

По результатам исследований по выбору гелевой основы можно сделать вывод о том, что наилучшими показателями обладает состав 1. Кривая вязкости основы этого состава, содержащего 3 % раствор хитозана, имеет более плавный характер, что может свидетельствовать о большей однородности геля и, как следствие, — о более равномерном распределении в нем ДВ в будущем. Дальнейшие исследования проводили с гелями на основе хитозана.

Результаты изучения тиксотропных свойств (способности менять вязкость при механическом воздействии) гелевых композиций составов 1–3 представлены в виде петли гистерезиса на рис. 4. На рисунке видно, что петля гистерезиса состава 1 минимальна,

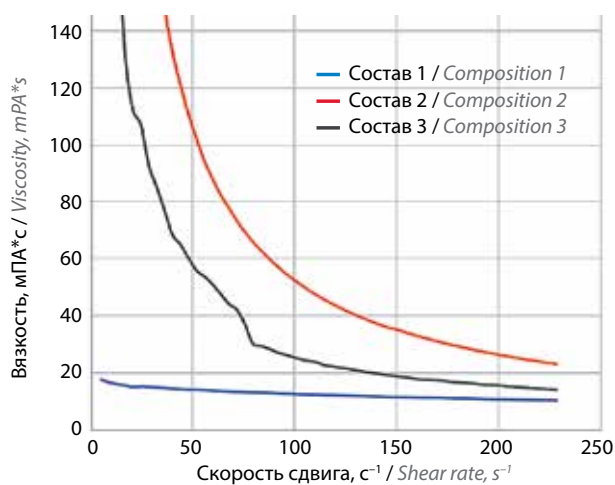


Рис. 1. Кривые вязкости модельных составов (составы 1–3)

Fig. 1. Viscosity curves of model formulations (compositions 1–3)

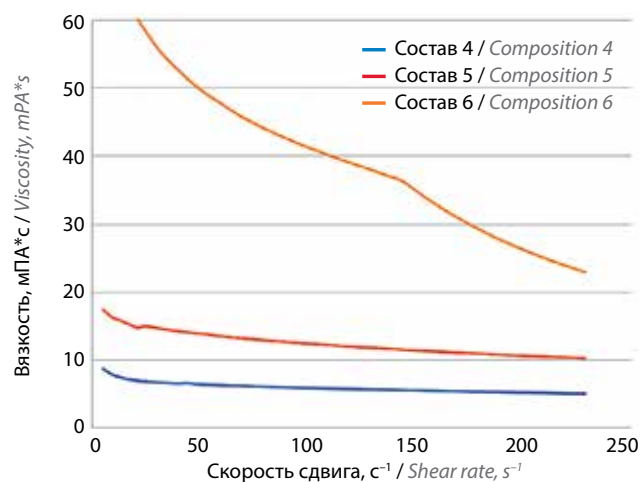


Рис. 2. Кривые вязкости модельных составов (составы 4–6)

Fig. 2. Viscosity curves of model formulations (compositions 4–6)

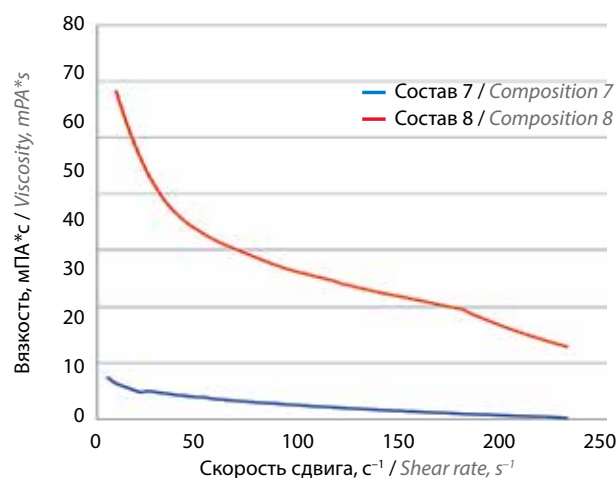


Рис. 3. Кривые вязкости модельных составов (составы 7, 8)

Fig. 3. Viscosity curves of model formulations (compositions 7, 8)

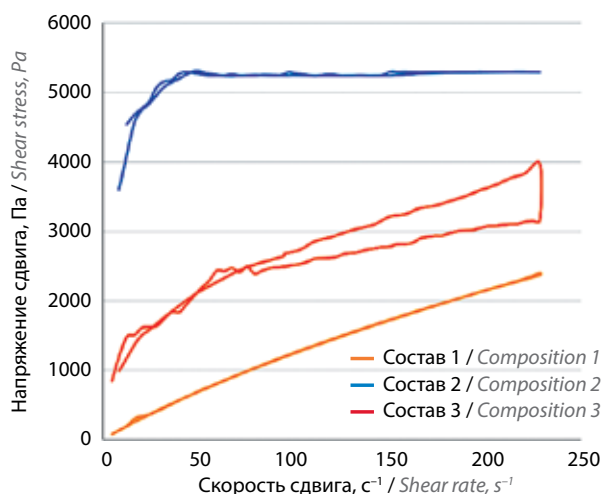


Рис. 4. Определение тиксотропных свойств при выборе гелевой основы (составы 1–3)

Fig. 4. Determination of thixotropic properties for gel base selection (compositions 1–3)

что говорит о быстром восстановлении свойств геля. Петля гистерезиса для состава 2 практически отсутствует. Петля гистерезиса 1-го и 2-го образцов по длине составляет меньше 10 % общего диапазона скорости сдвига, что позволяет сделать вывод о том, что составы гелеобразователя 1 и 2 обеспечивают ЛФ оптимальные тиксотропные свойства.

На рис. 4 продемонстрировано, что для геля состава 3 петля гистерезиса составляет более 10 % от общего диапазона скорости сдвига. Это свидетельствует о том, что при механическом воздействии на гель его структура разрушается, а обратное восстановление идет с сильным запозданием и не полностью, т.е. тиксотропные свойства и стабильность состава, включающего 3 % КМЦ, значительно хуже, чем у первых 2 образцов, и данный состав непригоден для дальнейшего изучения.

После выбора гелеобразователя провели подбор оптимальной его концентрации в разрабатываемом ЛП исходя из данных о концентрациях гелей хитозана, представленных на рынке. Для этого выполнили оценку тиксотропных свойств составов 4–6, содержащих хитозан в концентрациях 1, 3 и 5 % соответственно (рис. 5).

По результатам анализа кривой вязкости и петли гистерезиса составов 4, 5 и 6 можно сделать вывод о том, что данные гелевые составы показывают высокую стабильность. Однако состав 5 имеет более высокую вязкость, чем состав 6, что при назальном применении обеспечит максимальное время нахождения геля и ДВ на поверхности слизистой и увеличит степень высвобождения ДВ из основы. Именно поэтому в качестве оптимального выбран состав, содержащий хитозан в концентрации 3 %.

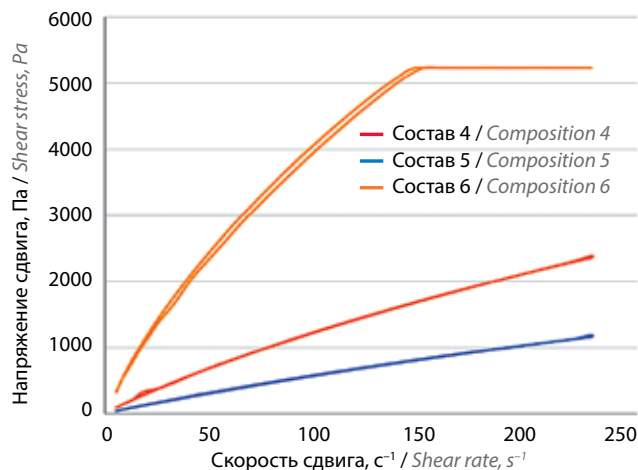


Рис. 5. Определение тиксотропных свойств при выборе гелевой основы (составы 4–6)

Fig. 5. Determination of thixotropic properties for gel base selection (compositions 4–6)

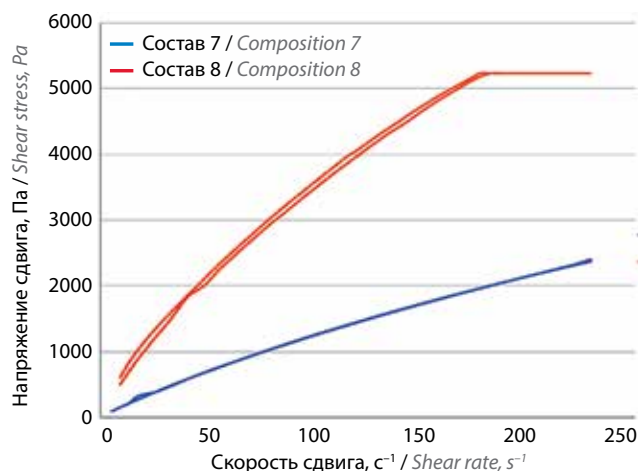


Рис. 6. Определение тиксотропных свойств при выборе гелевой основы (составы 7, 8)

Fig. 6. Determination of thixotropic properties when selecting a gel base (compositions 7, 8)

На последнем этапе подбора гелевой композиции проводили оценку влияния ДВ в различных концентрациях на реологические свойства гелевой основы. В гель, содержащий хитозан в концентрации 3 %, вводили пирарцетам в терапевтической концентрации 5 % (состав 8), сравнение проводили с раствором чистого гелеобразователя [8, 9]. Результаты представлены на рис. 6.

По результатам анализа кривой вязкости и петли гистерезиса составов 7 и 8 можно сделать вывод о том, что введение пирарцетама в концентрации 5 % повышает вязкость геля, однако мало влияет на характер течения геля. Следовательно, основа, содержащая хитозан в концентрации 3 %, является оптимальной для использования в составе разрабатываемого ЛП.

Для создания комфортной ЛФ также провели определение намазываемости, которая напрямую

Таблица 3. Характеристика намазываемости гелей

Table 3. Characteristics of spreadability of gels

Исследуемые составы гелей Investigated gel compositions		
основа base	без пирацетама piracetam-free	с пирацетамом piracetam
	диаметр пятна, мм spot diameter, mm	
Карбопол Carbopol	43	44
Хитозан Chitosan	53	54
Na-КМЦ Na-CMC	45	46
Препарат сравнения Reference drug		
Отофаг Otophag	52	
Виферон Viferon	48	

зависит от реологических характеристик основы. Намазываемость препаратов сравнения в экспериментальных условиях составила 42 и 38 мм соответственно. В качестве ЛП сравнения использовали гели Отофаг и Виферон, давно и успешно используемые в оториноларингологической практике. Данные определений намазываемости гелей с пирацетамом и основ приведены в табл. 3.

Из данных табл. 3 следует, что наиболее убедительные показатели зафиксированы для гелей на основе хитозана.

Заключение

Установлены реологические характеристики полученных ЛФ. Изучено влияние концентрации гелеобразователя и лекарственной субстанции на структурно-механические показатели ЛФ. Проведено определение вязкости растворов высокомолекулярных соединений. С помощью проведенных исследований реологических показателей выбран оптимальный гелеобразователь — хитозан — и определена его концентрация, составляющая 3 %. Количество лекарственной субстанции в разработанной ЛФ составило 5 %.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Вязкость (ОФС.1.2.1.0015). Государственная фармакопея Российской Федерации XV издания. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/Viscosity> (OFS.1.2.1.0015). State Pharmacopoeia of the Russian Federation of the XV edition. Moscow: Ministry of Health of the Russian Federation, 2023. URL: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/>. (In Russ.).
2. Компанцев Д.В., Никитина Н.В., Привалов И.М. Реология: основы, понятия, методы в производстве мазей. Пятигорск: Рекламно-информационное агентство на КМБ, 2021; 128 с. ISBN 978-5-6046843-7-5
Kompantsev D.V., Nikitina N.V., Privalov I.M. Rheology: fundamentals, concepts, methods in the production of ointments. Pyatigorsk: Advertising and information Agency on KMB, 2021; 128 p. (In Russ.). ISBN 978-5-6046843-7-5
3. Кищенко В.М., Степанова Э.Ф., Верниковский В.В., Привалов И.М. Структурно-механические свойства защитной пленки с алоэ экстрактом жидким и актовегином. Фармация 2018;67(6):30–4. DOI: 10.29296/25419218-2018-06-06
Kishchenko V.M., Stepanova E.F., Vernikovskiy V.V., Privalov I.M. The structural and mechanical properties of a protective film with an aloe liquid extract and Actovegin. Farmatsiya = Pharmacy 2018;67(6):30–4. (In Russ.). DOI: 10.29296/25419218-2018-06-06
4. Малкин А.Я., Исаев А.И. Реология: концепции, методы, приложения. СПб.: Профессия, 2007; 560 с.
Malkin A.Ya., Isaev A.I. Rheology: concepts, methods, applications. Saint Petersburg: Profession, 2007; 560 p. (In Russ.).
5. Сысуйев Б.Б. Структурно-механические свойства мазевых композиций с минералом бишофит. Вестник ВолГМУ 2006;4(20):46–9.
Sysuev B.B. Structural and mechanical properties of ointment compositions with the mineral bischofite. Vestnik VolGМУ = Journal of Volgograd State Medical University 2006;4(20):46–9. (In Russ.).
6. Хаджиева З.Д., Зилфикаров И.Н., Теунова Е.А. Определение реологических показателей и создание технологической схемы производства олеогеля. Научные ведомости Белгород. гос. ун-та. Медицина. Фармация 2010;22(93, вып.12/2):58–61.
Khadzhieva Z.D., Zilfikarov I.N., Teunova E.A. Determination of rheological indices and creation of the technological scheme of oleogel production. Nauchnye vedomosti Belgorod. gos. un-ta. Medicina. Farmacija = Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine. Pharmacy 2010;22(93, Is. 12/2):58–61. (In Russ.).
7. Шрам Г. Основы практической реологии и реометрии. Пер с англ. И.А. Лавыгина; под ред. В.Г. Куличихина. М.: Колос, 2003; 312 с.
Shram G. Fundamentals of practical rheology and rheometry. Transl. from English I.A. Lavygina; ed. by V.G. Kulichikhina. Moscow: Kolos, 2003; 312 p. (In Russ.).
8. Ковтун Е.В. Исследование влияния структурно-механических показателей гелеобразователя хитозана на технологию мягких лекарственных форм, содержащих экстракт гинкго билоба. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2022;25(5):46–51. DOI: 10.29296/25877313-2022-05-07
Kovtun E.V. Study of the influence of structural and mechanical parameters of gelling agents for the creation of soft dosage forms with ginkgo biloba extract. Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii = Problems of Biological, Medical and Pharmaceutical Chemistry 2022;25(5):46–51. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2022-05-07

9. Ковтун Е.В., Степанова Э.Ф., Погребняк Л.В. и др. Теоретическая и практическая разработка стоматологических пленок на основе хитозана. *Фармация* 2023;72(5):45–51. DOI: 10.29296/25419218-2023-05-06

Kovtun E.V., Stepanova E.F., Pogrebnyak L.V. et al. Theoretical and practical development of dental films based on chitosan. *Farmatsiya = Pharmacy* 2023;72(5):45–51. (In Russ.). DOI: 10.29296/25419218-2023-05-06

Вклад авторов

Э.Ф. Степанова, Н.Д. Бунятян, А.П. Плетень: научное редактирование текста статьи;
Е.В. Ковтун: технологические исследования полученных образцов, подготовка текста статьи;
Мониб М.И. Даду: определение вязкости полученных композиций, редактирование статьи;
И.М. Привалов: статистическая обработка полученных данных, редактирование статьи.

Author's contributions

E.F. Stepanova, N.D. Bunyatyan, A.P. Pleten: scientific editing of the text of the article;
E.V. Kovtun: technological studies of the obtained samples, preparation of the text of the article;
Moneb M.Y. Dadou: determination of viscosity of the obtained compositions, editing of the article;
I.M. Privalov: statistical processing of the obtained data, editing of the article.

ORCID авторов / ORCID of authors

Э.Ф. Степанова / E.F. Stepanova: <https://orcid.org/0000-0002-4082-3330>
Е.В. Ковтун / E.V. Kovtun: <https://orcid.org/0000-0003-3437-760X>
Н.Д. Бунятян / N.D. Bunyatyan: <https://orcid.org/0000-0003-0936-5551>
Мониб М.И. Даду / Moneb M.Y. Dadou: <https://orcid.org/0000-0002-4229-3716>
И.М. Привалов / I.M. Privalov: <https://orcid.org/0000-0001-9797-4060>
А.П. Плетень / A.P. Pleten: <https://orcid.org/0000-0003-4991-2150>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Funding. The work was performed without external funding.

Статья поступила: 31.01.2024. Принята в печать: 21.05.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.0000.

Article received: 31.01.2024. Accepted for publication: 21.05.2024. Published online: 00.00.0000.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-86-90>

Первый опыт применения мультимодальной *in vivo* ПЭТ/ОФЭКТ/КТ и МРТ-визуализации лабораторных мышей с меланомой B16F10 (краткое сообщение)

В.А. Скрибицкий^{1,2}, Ю.А. Финогонова¹, К.Е. Шпакова^{1,2}, А.А. Липенгольц^{1,2}, А.В. Смирнова^{1,3}, И.А. Скрипачев¹, Д.И. Невзоров¹, А.И. Пронин¹, Е.Ю. Григорьева¹

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

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское шоссе, 31;

³ГБУЗ г. Москвы «Медицинский клинический научный центр им. А.С. Логинова Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, шоссе Энтузиастов, 86

Контакты: Юлия Андреевна Финогонова b-f.finogenova@yandex.ru

Введение. Для прижизненного определения линейных размеров и метаболических характеристик модельных опухолей лабораторных животных оптимально применение методов лучевой визуализации: позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ), однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ). В связи с ограниченной доступностью гибридных сканеров актуально исследование возможности получения томограмм на отдельно стоящих приборах с последующим геометрическим сопоставлением изображений.

Цель исследования – исследовать возможность мультимодальной лучевой визуализации на примере мышей с подкожной меланомой B16F10.

Материалы и методы. С помощью томографа трехмодального доклинического VECTor 6 (MILabs, Нидерланды) выполняли ПЭТ, ОФЭКТ и КТ; томографа доклинического nanoScan® 3T (Mediso, Венгрия) – МРТ. Исследованы следующие варианты совмещения модальностей: МРТ и ПЭТ/КТ с ¹⁸F-фтордезоксиглюкозой; МРТ и ПЭТ/КТ с ¹⁸F-борфенилаланином; МРТ и ПЭТ/ОФЭКТ/КТ с ¹⁸F-фторэтилтирозином (¹⁸F-ФЭТ) и ¹⁷⁷лютецием – простатспецифическим мембранным антигеном (¹⁷⁷Lu-ПСМА). Во время сканирования и при перемещении между томографами мыши были иммобилизованы в специально изготовленном удерживающем устройстве. Сопоставление ПЭТ и МРТ, ОФЭКТ и МРТ-изображений проводили в программе InterView FUSION 3.09.008.0000 через промежуточную стадию сопоставления с КТ.

Результаты. Впервые в России получены мультимодальные ПЭТ/КТ/МРТ- и ПЭТ/ОФЭКТ/КТ/МРТ-изображения мышей с опухолью. Установлено, что по данным ПЭТ/МРТ можно подтвердить развитие опухоли с размерами 6 × 4 × 4 мм и более. С помощью ПЭТ/ОФЭКТ/КТ/МРТ удалось визуализировать внутренние органы с высоким уровнем накопления радионуклидных трейсеров: поджелудочную железу с ¹⁸F-ФЭТ (стандартизированный уровень накопления до 2,6) и почки с ¹⁷⁷Lu-ПСМА (стандартизированный уровень накопления до 4,4), при этом полученные изображения органов не сливались и не перекрывали друг друга.

Заключение. Мультимодальная визуализация позволит проводить отбор экспериментальных животных с опухолями определенного размера и метаболической активности для изучения новых радиофармацевтических препаратов, в том числе с векторной доставкой.

Ключевые слова: магнитно-резонансная томография, однофотонная эмиссионная компьютерная томография, позитронная эмиссионная томография, лабораторные животные, опухоль

Для цитирования: Скрибицкий В.А., Финогонова Ю.А., Шпакова К.Е. и др. Первый опыт применения мультимодальной *in vivo* ПЭТ/ОФЭКТ/КТ и МРТ-визуализации лабораторных мышей с меланомой B16F10 (краткое сообщение). Российский биотерапевтический журнал 2024;23(3):86–90.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-86-90>

The first experience of multi-modal *in vivo* PET/SPECT/CT and MRI imaging of laboratory mice with melanoma B16F10 (short message)

Vsevolod A. Skribitsky^{1,2}, Yulia A. Finogenova¹, Kristina E. Shpakova^{1,2}, Alexey A. Lipengolts^{1,2}, Anna V. Smirnova^{1,3}, Ivan A. Skripachev¹, Denis I. Nevzorov¹, Artem I. Pronin¹, Elena Yu. Grigorieva¹

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

²National Research Nuclear University MEPhI (Moscow Engineering Physics Institute); 31 Kashirskoe Shosse, Moscow 115409, Russia;

³A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow Healthcare Department; 86 Entuziastov Shosse, Moscow 111123, Russia

Contacts: Yulia Andreevna Finogenova b-f.finogenova@yandex.ru

Background. For *in vivo* determination of size and metabolic characteristics of model tumors in laboratory animals, it is recommended to use imaging methods: positron emission tomography (PET), single-photon emission computed tomography (SPECT), computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI). Due to the limited availability of hybrid scanners, it is necessary to investigate the feasibility of obtaining tomograms on separate devices with subsequent geometric comparison of images.

Aim. To investigate the feasibility of multimodal imaging of mice with subcutaneous melanoma B16F10.

Materials and methods. PET, SPECT and CT were performed using a preclinical VECTor 6 tomograph (MILabs, the Netherlands), MRI was performed using a preclinical nanoScan® 3T tomograph (Mediso, Hungary). The following modality combinations were studied: MRI and PET/CT with ¹⁸F-fluorodeoxyglucose; MRI and PET/CT with ¹⁸F-boronphenylalanine; MRI and PET/SPECT/CT with ¹⁸F-fluoroethyltyrosine (¹⁸F-FET) and ¹⁷⁷lutetium – prostate-specific membrane antigen (¹⁷⁷Lu-PSMA). Mice were immobilized in a custom-made device during scanning and during movement between tomographs. PET and MRI, SPECT and MRI images were fused in the program InterView FUSION 3.09.008.0000 through an intermediate stage of fusion with CT.

Results. Multimodal PET/CT/MRI and PET/SPECT/CT/MRI images of tumor-bearing mice were obtained for the first time in Russia. PET/MRI data confirmed development of the tumor from 6 × 4 × 4 mm in size. PET/SPECT/CT/MRI enabled to image visceral organs with high accumulation of radionuclide tracers: pancreas with ¹⁸F-FET (standardized uptake value 2.6) and kidneys with ¹⁷⁷Lu-PSMA (standardized uptake value 4.4), while the obtained images of organs did not merge and did not overlap.

Conclusion. Multimodal imaging enables the selection of experimental animals with tumors of specific size and metabolic activity for the study of new radiopharmaceuticals, including those with vector delivery.

Keywords: magnetic resonance imaging, single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, laboratory animals, cancer

For citation: Skribitsky V.A., Finogenova Yu.A., Shpakova K.E. et al. The first experience of multi-modal *in vivo* PET/SPECT/CT and MRI imaging of laboratory mice with melanoma B16F10 (short message). Rossijskij bioterapevticeskij zurnal = Russian Journal of Biotherapy 2024;23(3):86–90.

DOI: <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2024-23-3-86-90>

Введение

При исследованиях новых радиофармацевтических лекарственных средств возникает проблема отбора в экспериментальные группы лабораторных животных с однородными характеристиками опухолевого узла. Для прижизненной оценки этих характеристик необходимо параллельное использование методов анатомической и молекулярной визуализации. В частности, для определения локализации опухоли и ее линейных размеров используются компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ), а для изучения метаболической активности опухоли и распределения специфических рецепторов – позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) и однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ). Наибольшую информативность обеспечивает сочетание модальностей, однако

на данный момент не все варианты доступны исследователям в виде комбинированных сканеров. В частности, аппараты ОФЭКТ/МРТ в России отсутствуют. При получении изображений с помощью отдельно стоящих приборов (например, ПЭТ/КТ и МРТ) возникает проблема фиксации положения тела животного при переносе с одного аппарата на другой, поскольку при изменении положения тела совмещение изображений становится невозможным. Принципиальная возможность объединения изображений, полученных на отдельно стоящих томографах, была показана в ряде зарубежных работ на примере совмещения ОФЭКТ, КТ и МР-срезов при визуализации тела здоровых лабораторных мышей [1–3]. Таким образом, существует потребность в мультимодальной лучевой визуализации опухолевых моделей у лабораторных животных.

Цель исследования — изучение возможности мультимодальной лучевой визуализации на примере мышей с подкожной меланомой B16F10.

Материалы и методы

В исследовании использованы мыши-самки линии C57/Bl6 с модельной сингенной меланомой B16F10 ($n = 3$). Для создания опухолевой модели мышам подкожно в область голени правой тазовой конечности вводили приготовленную *ex tempore* суспензию опухолевых клеток 1:6 m/V в растворе Хэнкса в объеме 60 мкл.

С помощью томографа трехмодального доклинического VECTor 6 (MILabs, Нидерланды) выполняли ПЭТ, ОФЭКТ и КТ; томографа доклинического nanoScan® 3T (Mediso, Венгрия) — МРТ. Во время сканирования и при перемещении между томографами мышей помещали в специально изготовленное удерживающее устройство («шаттл»). Для изготовления «шаттла» пробирку типа Falcon 50 мл разрезали вдоль, в результате чего получали желобообразный объект с полукруглым профилем. Мышь помещали в «шаттл» в положении «на животе» и закрепляли лейкопластырем со стороны спины. Во время сканирования иммобилизацию мыши дополнительно обеспечивали подачей 2 % смеси изофлурана с воздухом. Перемещение между томографами осуществляли очень быстро (в течение 1 мин), чтобы животное не успело выйти из наркоза.

В исследовании использованы 4 радиофармацевтических средства: ^{18}F -фтордезоксиглюкоза (^{18}F -ФДГ), ^{18}F -борфенилаланин (^{18}F -БФА), ^{18}F -фторэтилтирозин (^{18}F -ФЭТ), ^{177}Lu -пситет — простатспецифический мембранный антиген (^{177}Lu -ПСМА). Все соединения с радионуклидной меткой синтезированы в циклотронной радиохимической лаборатории отделения ПЭТ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Первой мыши вводили внутривенно 102 МБк ^{18}F -ФДГ и выполняли динамическое ПЭТ-сканирование всего тела, 12 фреймов по 5 мин, с последующей КТ. Затем выполняли МРТ в режиме IR FSE (inversion recovery fast spin echo). Второй мыши вводили внутривенно 16 МБк ^{18}F -БФА и выполняли динамическое ПЭТ-сканирование всего тела, 12 фреймов по 5 мин, с последующей КТ. Затем выполняли МРТ в режиме IR FSE. Третьей мыши внутривенно вводили в 1 шприце 41 МБк ^{177}Lu -PSMA и 42 МБк ^{18}F -ФЭТ, выполняли одновременно динамическое ПЭТ- и ОФЭКТ-сканирование всего тела, 7 фреймов по 10 мин, с последующей КТ. Затем выполняли МРТ в режиме FSE 3D (fast spin echo 3-dimensional).

Совмещение полученных томограмм, просмотр и постобработку выполняли в программе InterView FUSION 3.09.008.0000. При этом ОФЭКТ- и ПЭТ-изображения сразу автоматически совмещались с КТ,

так как они получены на одном томографе. Для совмещения с МРТ использовали возможности программного обеспечения в определенной последовательности. КТ-изображение выбирали в качестве референсного, то есть неподвижного. МР-изображение — в качестве перемещаемого. Добивались оптимального сопоставления КТ- и МР-изображений по костным ориентирам. Таким образом, совмещение МРТ с ПЭТ и/или ОФЭКТ производили через промежуточную стадию сопоставления с КТ.

По данным ПЭТ и ОФЭКТ для модельной опухоли и целевых органов вычисляли SUV (standardized uptake value — стандартизированный уровень накопления) по формуле

$$SUV = \frac{C_{ROI}}{C_{inj}},$$

где C_{ROI} — средняя концентрация радиоактивности в выделенном объеме (МБк/см³); C_{inj} — концентрация радиоактивности во всем теле мыши на начало исследования (МБк/см³).

Результаты

В результате мультимодального сканирования получены томограммы лабораторных мышей с перевитой подкожно меланомой B16F10: ПЭТ/КТ/МРТ-изображения 2 мышей, ПЭТ/ОФЭКТ/КТ/МРТ-изображения 1 мыши. У всех исследованных животных по данным КТ опухоль не отличалась по рентгеноплотности от здоровой мускулатуры лапы, и измерить ее линейные размеры было невозможно, однако это удалось сделать по данным ПЭТ/МРТ. Наименьшая из исследованных опухолей имела размер $6 \times 4 \times 4$ мм: на данном этапе развития опухоль невозможно измерить без применения методов лучевой визуализации (рис. 1). Кроме того, по данным МРТ выявлены участки лимфоэкстравазата толщиной до 2 мм, искажающие размеры опухоли при измерении штангенциркулем.

У 2-й мыши по данным ПЭТ в объеме опухоли определялся очаг накопления ^{18}F -ФДГ, метаболически активная часть опухоли располагалась преимущественно медиально и занимала приблизительно 85 % объема, метаболически неактивная часть локализовалась латерально (рис. 2). Во всех органах и тканях, кроме опухолевых очагов, распределение ^{18}F -ФДГ соответствовало физиологическому. При сканировании всего тела мыши был также выполнен поиск метастазов. По данным ПЭТ/КТ метастазы в легких и костной ткани не выявлены, по данным ПЭТ/МРТ метастазы в печени и головном мозге также отсутствовали.

Накопление ^{18}F -БФА в меланоме B16F10 характеризовалось SUV до 1,3; ^{18}F -ФДГ — SUV до 1,5; ^{18}F -ФЭТ и ^{177}Lu -ПСМА — SUV до 0,3. Кроме того,

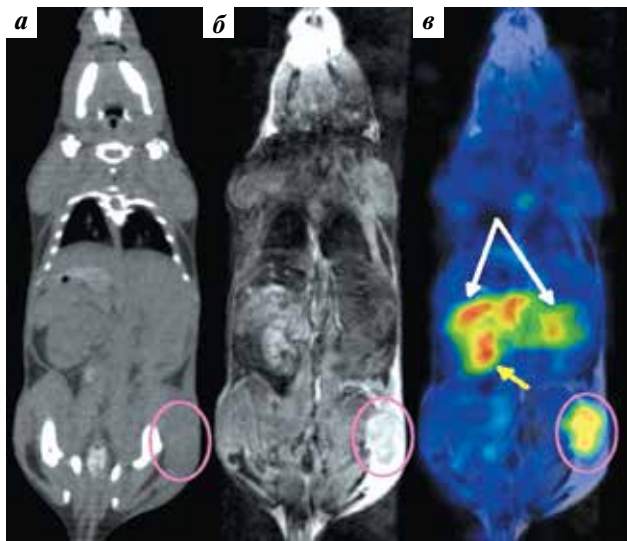


Рис. 1. Томограммы мыши с модельной меланомой B16F10: а — компьютерная томограмма; б — магнитно-резонансная томография (в режиме inversion recovery fast spin echo); в — совмещенное изображение позитронной эмиссионной томографии/магнитно-резонансной томографии с ^{18}F -борфенилаланином. Розовым овалом выделена опухоль. Длинные белые стрелки указывают на доли поджелудочной железы, короткая желтая стрелка — на левую почку

Fig. 1. Images of a mouse with subcutaneous melanoma B16F10: а — computed tomography scan; б — magnetic resonance imaging (inversion recovery fast spin echo); в — fused ^{18}F -boronphenylalanine positron emission tomography/magnetic resonance imaging. Pink ellipse marks the tumor. Long white arrows indicate the parts of the pancreas, short yellow arrow indicates the left kidney

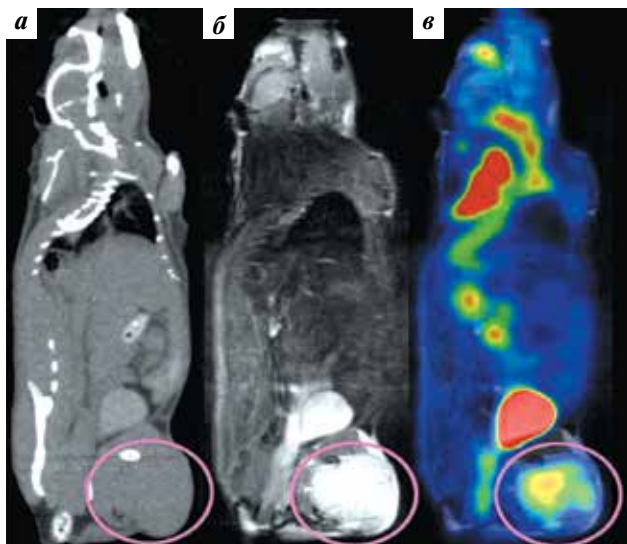


Рис. 2. Томограммы мыши с модельной меланомой B16F10: а — компьютерная томограмма; б — магнитно-резонансная томография (в режиме inversion recovery fast spin echo); в — совмещенное изображение позитронной эмиссионной томографии/магнитно-резонансной томографии с ^{18}F -фтордезоксиглюкозой. Розовым овалом выделена опухоль

Fig. 2. Images of a mouse with subcutaneous melanoma B16F10: а — computed tomography scan; б — magnetic resonance imaging (inversion recovery fast spin echo); в — fused ^{18}F -fluorodeoxyglucose positron emission tomography/magnetic resonance imaging. Pink ellipse marks the tumor

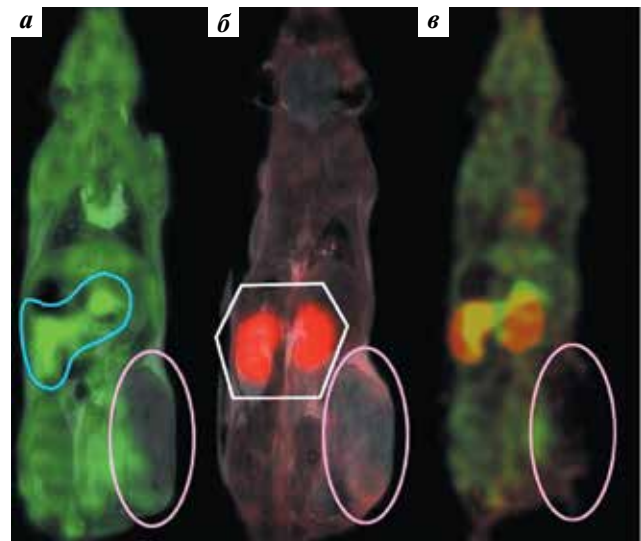


Рис. 3. Томограммы мыши с модельной меланомой B16F10: а — позитронная эмиссионная томограмма/магнитно-резонансная томограмма с ^{18}F -фторэтилтирозином; б — однофотонная эмиссионная компьютерная томограмма/магнитно-резонансная томограмма с ^{177}Lu -лютецием — простатспецифическим мембранным антигеном; в — *multum in parvo* позитронная эмиссионная томография/однофотонная эмиссионная компьютерная томограмма. Голубым криволинейным контуром выделена поджелудочная железа, белым многоугольником — почки, розовым овалом — опухоль

Fig. 3. Images of a mouse with subcutaneous melanoma B16F10: а — ^{18}F -fluoroethyltyrosine positron emission tomography scan/magnetic resonance imaging; б — ^{177}Lu -lutetium — prostate-specific membrane antigen single-photon emission computed tomography scan/magnetic resonance imaging; в — positron emission tomography scan/single-photon emission computed tomography scan/magnetic resonance imaging, *multum in parvo*. Light blue line marks the pancreas, white polygon — the kidneys, pink ellipse — the tumor

^{18}F -БФА и ^{18}F -ФЭТ активно накапливались в поджелудочной железе мыши (SUV до 3,2 и 2,6 соответственно), а ^{177}Lu -ПСМА — в почках (SUV до 4,4).

При 4-модальном ПЭТ/ОФЭКТ/КТ/МРТ сканировании органы с высоким накоплением ^{18}F -ФЭТ и ^{177}Lu -ПСМА отчетливо визуализировались, не сливаясь и не перекрывая друг друга (рис. 3). Низкий уровень накопления трейсеров в модельной подкожной меланоме B16F10 обусловлен низким уровнем метаболизма на данной стадии развития опухоли и отсутствием специфического рецептора ПСМА.

Заключение

Впервые в России показана принципиальная возможность мультимодальной визуализации лабораторных животных с помощью приборов, не образующих комплексную систему визуализации. Мультимодальная визуализация позволит проводить отбор экспериментальных животных с опухолями определенных размера и метаболической активности для изучения новых радиофармацевтических препаратов, в том числе с векторной доставкой.

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

1. Dillenseger J.P., Guillaud B., Goetz C. et al. Coregistration of datasets from a micro-SPECT/CT and a preclinical 1.5 T MRI. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect A* 2013;702:144–7. DOI: 10.1016/j.nima.2012.08.023
2. Constantinesco A., Choquet P., Goetz C., Monassier L. PET, SPECT, CT, and MRI in mouse cardiac phenotyping: an overview. *Curr Protoc Mouse Biol* 2012;2(2):129–44. DOI: 10.1002/9780470942390.mol110225
3. Aguiar P., Silva-Rodriguez J., Herranz M., Ruibal A. Preliminary experience with small animal SPECT imaging on clinical gamma cameras. *Biomed Res Int* 2014;2014:369509. DOI: 10.1155/2014/369509

Вклад авторов

В.А. Скрибичский: разработка дизайна исследования, получение и анализ данных;
 Ю.А. Финогонова: анализ данных, написание текста рукописи;
 К.Е. Шпакова, И.А. Скрипачев: получение и анализ данных;
 А.А. Липенголыц: анализ данных, оформление рукописи;
 А.В. Смирнова: обзор источников литературы, редактирование текста;
 Д.И. Невзоров: получение и анализ данных;
 А.И. Пронин: разработка дизайна исследования, анализ данных;
 Е.Ю. Григорьева: разработка дизайна исследования, оформление рукописи

Authors' contribution

V.A. Skribitsky: research design development, data acquisition and analysis;
 Yu.A. Finogenova: data analysis, manuscript writing;
 K.E. Shpakova, I.A. Skripachev: data acquisition and analysis;
 A.A. Lipengolts: data analysis, manuscript design;
 A.V. Smirnova: literature review, text editing;
 D.I. Nevzorov: data acquisition and analysis;
 A.I. Pronin: research design development, data analysis;
 E.Yu. Grigorieva: research design development, manuscript design

ORCID авторов / ORCID of authors

В.А. Скрибичский / V.A. Skribitsky: <https://orcid.org/0000-0003-2942-7895>
 Ю.А. Финогонова / Yu.A. Finogenova: <https://orcid.org/0000-0002-5144-1039>
 К.Е. Шпакова / K.E. Shpakova: <https://orcid.org/0000-0003-0246-1794>
 А.А. Липенголыц / A.A. Lipengolts: <https://orcid.org/0000-0002-5631-9016>
 А.В. Смирнова / A.V. Smirnova: <https://orcid.org/0000-0003-0386-9732>
 И.А. Скрипачев / I.A. Skripachev: <https://orcid.org/0000-0003-1030-1686>
 Д.И. Невзоров / D.I. Nevzorov: <https://orcid.org/0000-0003-2969-0191>
 А.И. Пронин / A.I. Pronin: <https://orcid.org/0000-0003-1632-351X>
 Е.Ю. Григорьева / E.Yu. Grigorieva: <https://orcid.org/0000-0001-7726-7991>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 24-25-00446, <https://rscf.ru/project/24-25-00446/>.

Funding. The study was funded by Russian Science Foundation project No. 24-25-00446, <https://rscf.ru/project/24-25-00446/>.

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. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (протокол 01b/p-2024 от 20.02.2024).

Compliance with principles of bioethics. The study was performed in accordance with ethical principles adopted by the European Convention or the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. The study was approved by the Committee on Biomedical Ethics of the Research Institute for Experimental Diagnosis and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (protocol 01b/p-2024, 20.02.2024).

Статья поступила: 25.03.2024 Принята в печать: 23.08.2024. Опубликовано онлайн: 00.00.0000.

Article received: 25.03.2024. Accepted for publication: 23.08.2024. Published online: 00.00.0000.



БАРЫШНИКОВ Анатолий Юрьевич (1944–2015)

BARYSHNIKOV Anatoly Yurievich (1944–2015)

21 сентября исполнилось бы 80 лет Анатолию Юрьевичу БАРЫШНИКОВУ, создателю и первому главному редактору «Российского биотерапевтического журнала».

А.Ю. Барышников, доктор медицинских наук, профессор, ведущий отечественный ученый в области биотехнологии и иммунологии опухолей, внес значительный вклад в развитие онкоиммунологии и клеточной инженерии. Благодаря усилиям А.Ю. Барышникова в России созданы и производятся моноклональные антитела, которые являются инструментом иммунологических исследований в различных областях медицины.

Анатолий Юрьевич родился в селе Шаранга Кировской области, его детство и юность прошли в поселке Ушачи Полоцкого района Витебской области. Свой научный путь он начал будучи студентом Витебского государственного медицинского института, под руководством проф. Д.К. Новикова. За годы учебы в институте А.Ю. Барышников опубликовал 16 научных студенческих работ и не случайно был приглашен проф. Г.Ю. Свет-Молдавским, лауреатом Государственной премии СССР, в аспирантуру, однако был призван в ряды Советской армии и служил сначала начальником лазарета, затем начальником медпункта и старшим врачом части. После завершения службы поступил в аспирантуру Института экспериментальной и клинической онкологии АМН СССР (позднее РОНЦ им. Н.Н. Блохина, ныне НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина). Под руководством проф. Г.Я. Свет-Молдавского в 1975 г. А.Ю. Барышников защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук на тему «Экспериментальные материалы по изучению вирусной терапии опухолей в условиях нагрузки РЭС и дозированной гипертермии».

После досрочного окончания аспирантуры по специальности «иммунология и вирусология опухолей» А.Ю. Барышников был направлен на работу младшим научным сотрудником лаборатории вирусологии и иммунологии РОНЦ им. Н.Н. Блохина, и вся

дальнейшая научная деятельность и становление А.Ю. Барышникова как ученого связана с этим учреждением. Он прошел все ступени роста — от младшего научного сотрудника до директора: работал старшим научным сотрудником, ведущим научным сотрудником, главным научным сотрудником, руководителем лаборатории, директором НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (НИИ ЭДито) РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

С 1982 по 1992 г. А.Ю. Барышников работал в лаборатории клинической иммунологии под руководством проф. З.Г. Кадагидзе, в 1984 г. защитил диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук на тему «Моноклональные антитела и ксеногенные антисыворотки в диагностике лейкоза и лимфом человека». В этой работе, а затем в монографии «Иммунологический фенотип лейкозной клетки» были разработаны и четко сформулированы основные принципы иммунодиагностики гемобластозов. Профессору А.Ю. Барышникову принадлежит приоритет крупных разработок в области иммунодиагностики лейкозов и лимфом человека. Им и его учениками созданы оригинальные иммунологические диагностикумы для определения дифференцировочных и лейкозоассоциированных антигенов. На основе теоретических положений по дифференцировке гемопоэтических клеток разработаны критерии диагностики иммунологических подвариантов лейкозов и лимфом. Теоретические положения и разработка диагностикумов, а также организация их производства позволили внедрить в практику здравоохранения новый метод диагностики — иммунодиагностику гемобластозов.

А.Ю. Барышниковым создана уникальная коллекция гибридом-продуцентов моноклональных антител против антигенов иммунокомпетентных клеток. Организация промышленного

выпуска этих антител способствовала широкому внедрению в практику здравоохранения нового метода определения иммунологического статуса организма в норме и при патологии.

Разработка моноклональных антител против различных видов опухолеассоциированных антигенов привела к созданию иммуноферментных диагностикумов, а также явилась основой для работы над микрочипами.

А.Ю. Барышников занимался разработкой нового направления в лечении злокачественных новообразований – биотерапии. В руководимом им институте были созданы терапевтические моноклональные антитела и противоопухолевые вакцины, которые еще проходят клинические испытания.

В последние годы А.Ю. Барышников занимался разработкой новых средств направленной доставки противоопухолевых препаратов к опухоли и изучением возможности преодоления лекар-

ственной резистентности опухоли с помощью новых лекарственных форм.

А.Ю. Барышников является автором около 500 статей, 14 монографий, 54 патентов. Он проводил большую научно-педагогическую работу, являлся профессором кафедры клинической иммунологии и аллергологии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова. Под его руководством выполнено и защищено 18 докторских и 70 кандидатских диссертаций, он был создателем и главным редактором «Российского биотерапевтического журнала», членом редколлегий 4 научных журналов, заместителем председателя объединенного ученого совета РОНЦ им. Н.Н. Блохина, председателем ученого совета НИИ ЭДнТО, членом специализированного ученого совета.

Анатолий Юрьевич был талантливым руководителем, пользовался заслуженным авторитетом и уважением.

