

ISSN 1726-9784



Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

2

ТОМ 15
2016

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А.В. Караулов, чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, проф.;
М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

И.А. Балдуева, д-р мед. наук (Санкт-Петербург); **О.А. Бочарова**, д-р биол. наук, проф. (Москва);
А.К. Голенков, д-р мед. наук, проф. (Москва); **М.И. Давыдов**, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва);
Л.В. Демидов, д-р мед. наук, проф. (Москва); **М.В. Дмитриева**, ответственный секретарь (Москва);
И.В. Евсегнеева, д-р мед. наук, проф. (Москва); **П.К. Иванов**, д-р мед. наук (Москва);
З.Г. Кадагидзе, д-р мед. наук, проф. (Москва); **В.П. Краснов**, д-р хим. наук, проф. (Екатеринбург);
И.Ю. Кубасова, канд. мед. наук (Москва); **И.Г. Меерович**, канд. биол. наук (США);
А.В. Мисюрин, канд. биол. наук (Москва); **В.В. Новиков**, д-р биол. наук, проф. (Нижний Новгород);
Н.А. Оборотова, д-р фарм. наук, проф. (Москва); **Н.Я. Рапопорт**, д-р хим. наук, проф. (США);
В.В. Решетникова, канд. техн. наук (Москва); **Н.С. Сергеева**, д-р мед. наук, проф. (Москва);
Е.В. Степанова, д-р мед. наук (Москва); **Н.Н. Тупицын**, д-р мед. наук, проф. (Москва);
Е.Г. Турнянская, канд. мед. наук (Москва); **Ю.В. Шишкин**, д-р мед. наук, проф. (Москва);
И.Ж. Шубина, д-р биол. наук (Москва); **Р.И. Якубовская**, д-р биол. наук, проф. (Москва)

2 ТОМ 15
'16

ОСНОВАН В 2002 Г.

Издательская группа РОНЦ:
115478, Москва, Каширское ш., 24
Турнянская Е.Г., Крюков Б.Б.

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7(499) 324 10 65;
факс +7(499) 324 22 74
E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru

Адрес редакции:
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 **Л.К. Мусатова**
Корректор **Л.К. Пряхина**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор). Регистрационный
номер: № 77-11695 от 21.01.2002 г.,
ПИ № ФС77-53039 от 04.03.2013 г.
При полной или частичной
перепечатке материалов
ссылка на журнал «Российский
биотерапевтический журнал»
обязательна.

ISSN 1726-9784
Российский биотерапевтический
журнал. 2016. Том 15.
№ 2. 1–96

Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» – 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Тверской печатный двор»
Тираж 1000 экз.

www.ronc.ru/node/795

Мероприятия в 2017 г.



Глубокоуважаемые коллеги!

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей,

Институт органического синтеза имени И.Я. Постовского Уральского отделения РАН

в марте 2017 г. проводят XIV Всероссийскую научно-практическую конференцию с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» имени А.Ю. Барышникова.

Тезисы и тексты докладов конференции будут опубликованы в «Российском биотерапевтическом журнале».

Оргкомитет оставляет за собой право отбора докладов.

Принять участие в конференции можно, выслав регистрационную форму и тезисы доклада на электронную почту: edito@ronc.ru

Срок подачи заявки для участия с докладом – **до 1 февраля 2017 г.**

Срок подачи тезисов (для публикации) – **до 1 февраля 2017 г.**

Регистрация участников – **до 1 марта 2017 г.**

По всем вопросам, связанным с участием в конференции, обращаться к секретарю Оргкомитета Решетниковой Вере Владимировне: тел. +7 (499) 324-55-85, +7 (926) 505-72-55; e-mail: edito@ronc.ru

Март
2017 г.
Москва

XIV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ» ИМЕНИ А.Ю. БАРЫШНИКОВА

Место проведения: г. Москва, ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское шоссе, 24 (Большой актовыв зал).

Основные научные направления:

- доклинические и клинические исследования лекарственных средств;
- разработка лекарственных препаратов;
- отечественные противоопухолевые препараты;
- направленная доставка лекарственных препаратов;
- диагностика и лечение онкологических заболеваний;
- фотодинамическая терапия;
- иммунотерапия и биотерапия опухолей.

Планируемые мероприятия конференции:

секции: пленарная, экспериментальная онкология, клиническая онкология, фотодинамическая терапия, стендовая секция, секция молодых ученых;

выставка «Противоопухолевые и диагностические препараты».

Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

FOUNDERS

Federal State Budgetary Scientific Institution "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center"
of the Ministry of Health of Russia

Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

EDITOR-IN-CHIEF

ZS. Shprakh, PhD

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

A.V. Karaulov, PhD, DSc, Professor, Associate Member of RAS (Moscow, Russia);

M.A. Baryshnikova, PhD (Moscow, Russia)

EDITORIAL BOARD

I.A. Baldueva, PhD, DSc (Saint Petersburg, Russia); **O.A. Bocharova**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia);
A.K. Golenkov, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.I. Davydov**, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS
(Moscow, Russia); **L.V. Demidov**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **M.V. Dmitrieva**, Executive Editor
(Moscow, Russia); **I.V. Evsegneeva**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **P.K. Ivanov**, PhD, DSc (Moscow, Russia);
Z.G. Kadagidze, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **V.P. Krasnov**, PhD, DSc, Professor (Ekaterinburg, Russia);
I.Y. Kubasova, PhD (Moscow, Russia); **I.G. Meerovich**, PhD (Omaha, Nebraska, USA); **A.V. Misyurin**, PhD
(Moscow, Russia); **V.V. Novikov**, PhD, DSc, Professor (Nizhniy Novgorod, Russia); **N.A. Oborotova**, PhD, DSc,
Professor (Moscow); **N.Ya. Rapoport** (Salt Lake City, Utah, USA); **V.V. Reshetnikova**, PhD (Moscow, Russia);
N.S. Sergeeva, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.V. Stepanova**, PhD, DSc (Moscow, Russia);
N.N. Tupitsin, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia); **E.G. Turnyanskaya**, PhD (Moscow, Russia); **Y.V. Shishkin**, PhD,
DSc, Professor (Moscow, Russia); **I.Zh. Shubina**, PhD, DSc (Moscow, Russia); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc,
Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002

2 VOL. 15
'16

Издательская группа РОНЦ:
115478, Москва, Каширское ш., 24
Турнянская Е.Г., Крюков Б.Б.

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7(499) 324 10 65;
факс +7(499) 324 22 74
E-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

Editorial Office:
Research Institute of Carcinogenesis,
Floor 3, 24 Kashirskoye Shosse, Build. 15,
Moscow, 115478.
Tel./Fax: +7 (499) 929-96-19
e-mail: abv@abvpress.ru
www.abvpress.ru

Editor L.K. Musatova
Proofreader L.K. Pryakhina
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 № ФС77-53039
dated 04.03.2013*
**If materials are reprinted
in whole or in part, reference
must necessarily be made
to the "Rossiysky
Bioterapevtichesky Zhurnal".**

ISSN 1726-9784
Rossiysky Bioterapevtichesky
Zhurnal. 2016. Volume 15.
No 2. 1–96

Rospechat' catalogue
index: 81679
Printed at the
Tverskoy Pechatny Dvor

1,000 copies

www.ronc.ru/node/795

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Р.Б. Самсонов, И.М. Коваленко, Д.А. Васильев, Е.В. Цырлина, Г.А. Дамян, Х. Шохат-Карвальо, Д. Карасик, Л.М. Берштейн, В.В. Лютынский, А.В. Малек*
Стимуляция метастатической активности клеток рака молочной железы экзосомами плазмы 6
- И.А. Мамичев, Т.А. Бозуш, Е.А. Дудко, О.М. Рябинина, А.Н. Гришанина, В.Ю. Кирсанов, Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов*
Имунофлуоресцентный анализ экспрессии бета-III тубулина в опухолевой и окружающей нормальной ткани пациентов с немелкоклеточным раком легкого 16
- Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, О.С. Бурова, Е.С. Воронина, М.А. Барышникова*
Изменение морфологических, иммунологических и генетических характеристик клеток меланомной линии (*Mel Ibr*) при культивировании в ростовой среде с низкой концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки 19
- Н.С. Сапрыкина, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, З.С. Смирнова, В.П. Краснов, Г.Л. Левит, В.В. Мусияк, М.А. Барышникова, В.М. Бухман, З.С. Шпрах, М.М. Давыдов*
Противоопухолевая активность Ормустина на перевиваемых лейкозах мышей 24
- И.И. Басиева, Л.З. Болиева, А.В. Сергеев*
Изучение химиопрофилактической активности ликопина на модели рака пищевода, индуцированного у крыс N-метил-N-бензилнитрозамином 32
- Р.В. Карпова, В.Е. Шевченко, Е.В. Бочаров, О.П. Шейченко, О.А. Бочарова, В.Г. Кучеряну, В.А. Быков*
Возможности метода использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах 36
- Е.А. Плотникова, Н.Б. Морозова, А.Д. Плотинская, Р.И. Якубовская, В.И. Чиссов, М.А. Грин, А.Ф. Миронов*
Специфическая активность триметилового эфира хлорина e_6 и его гликозилированного производного в системах *in vitro* и *in vivo* 47
- И.Д. Гулякин, А. Хашем, Л.Л. Николаева, М.В. Дмитриева, Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Н.А. Оборотова, А.В. Ланцова*
Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208 55
- Е.А. Собко, С.В. Чубарова, И.А. Соловьева, О.П. Иценко, Н.В. Гордеева, А.Ю. Крапошина, И.В. Демко, Л.В. Аристархова, Е.В. Николаенко, Л.Н. Волкова*
Наиболее значимые этиологические факторы острой и хронической крапивницы 61
- А.Е. Шульженко, И.Н. Зуйкова, А.В. Караулов, Р.В. Шубелко*
Эффективность низкомолекулярного индуктора интерферона Амиксина® в лечении и профилактике хронических рецидивирующих воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей 66
- С.И. Никулицкий, Е.Г. Тырсица, А.Н. Иншаков, Н.Б. Боровкова*
Новый метод выделения чистой фракции интактных клеточных ядер для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре 76

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- Г.М. Волгарева, А.В. Лебедева*
Меланоцитарные новообразования кожи у детей 82
- А.О. Райков, А. Хашем, М.А. Барышникова*
Липосомы для направленной доставки противоопухолевых препаратов 90

ORIGINAL REPORTS

- R. B. Samsonov, I. M. Kovalenko, D. A. Vasilyev, E. V. Tsyrlina, G. A. Dashan, Ch. Shochat-Carvalho, D. Karasik, L. M. Berstein, V. V. Lutyanskiy, A. V. Malek*
Stimulation of metastatic activity of breast cancer cells by plasma exosomes. 6
- I. A. Mamichev, T. A. Bogush, E. A. Dudko, O. M. Ryabinina, A. N. Grishanina, V. E. Kirsanov, B. E. Polotsky, M. M. Davydov*
Immunofluorescent analyses of tumor marker beta-III tubulin expression in tumor and adjacent normal lung tissue derived from patients with non-small cell lung cancer 16
- L. F. Morozova, N. M. Suraeva, O. S. Burova, E. S. Voronina, M. A. Baryshnikova*
Changes in the morphological, immunological and genetic characteristics of *Mel 1br* melanoma cells in response to low concentration of embryo calf serum 19
- N. S. Saprykina, L. M. Borisova, M. P. Kiseleva, Z. S. Smirnova, V. P. Krasnov, G. L. Levit, V. V. Musiyak, M. A. Baryshnikova, V. M. Bukhman, Z. S. Shprakh, M. M. Davydov*
Antitumor activity of Ormustine against transplanted leukemia in mice 24
- I. I. Basieva, L. Z. Bolieva, A. V. Sergeev*
Comparative study of chemopreventive activity of lycopene on experimental model of esophagus cancer induced by N-methyl-N-benzylnitrosourea in rats 32
- R. V. Karpova, V. E. Shevchenko, E. V. Bocharov, O. P. Sheychenko, O. A. Bocharova, V. G. Kucheryanu, V. A. Bykov*
Ginsenosides definition in plant extracts by means of high through liquid chromatography with tandem mass-spectrometry 36
- E. A. Plotnikova, N. B. Morozova, A. D. Plyutinskaya, R. I. Yakubovskaya, V. I. Chissov, M. A. Grin, A. F. Mironov*
Specific properties of chlorin e_6 trimethyl ester and its glycolized derivative as photosensitizers *in vitro* and *in vivo* 47
- I. D. Gulyakin, A. Hashem, L. L. Nikolaeva, M. V. Dmitrieva, D. A. Afanasieva, M. A. Baryshnikova, N. A. Oborotova, A. V. Lantsova*
The development of new technology of the dosage form for intravenous administration indolocarbazole derivative LHS-1208 55
- E. A. Sobko, S. V. Chubarova, I. A. Soloveva, O. P. Ischenko, N. V. Gordeeva, A. Yu. Kraposhina, I. V. Demko, L. V. Aristarhova, E. V. Nikolaenko, L. N. Volkova*
The most significant etiological factors of the acute and chronic urticaria 61
- A. E. Shulzhenko, I. N. Zuikova, A. V. Karaulov, R. V. Shchubelko*
Effectiveness of the low-molecular inductor of interferon of Amiksin® in treatment and preventive maintenance of the chronic recurrent inflammatory diseases of the upper respiratory tract 66
- S. I. Nikulitskiy, E. G. Tyrsina, A. N. Inshakov, N. B. Borovkova*
New method of extraction of intact nuclei from cells for flow cytometry fluorescence immunoassay 76

REVIEWS

- G. M. Volgareva, A. V. Lebedeva*
Melanocytic skin neoplasms in children 82
- A. O. Raikov, A. Hashem, M. A. Baryshnikova*
Liposomes as target delivery of antitumor drugs 90

СТИМУЛЯЦИЯ МЕТАСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЭКЗОСОМАМИ ПЛАЗМЫ

Р.Б. Самсонов^{1,2}, И.М. Коваленко², Д.А. Васильев², Е.В. Цырлина², Г.А. Дашян²,
Х. Шохат-Карвальо³, Д. Карасик³, Л.М. Берштейн², В.В. Лютынский⁴, А.В. Малек^{1,2}

¹ООО «Онкосистема»; Россия, 194356, Санкт-Петербург, ул. Хошимина, 11/1, 207;

²ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России; Россия, 197758, Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 68;

³Университет им. Бар-Илана; Израиль, 13100, Цфат, ул. Генриеты Сольд, 8;

⁴ООО «Компания Альгимед»; Беларусь, 220020, Минск, ул. Нарочанская, 11

Контакты: Анастасия Валерьевна Малек anastasia@malek.com

Введение. Злокачественный фенотип опухолевых клеток и метастатический потенциал опухоли определяются генетическими факторами. В дополнение к ним значимую роль в регуляции структурных и функциональных характеристик злокачественных клеток играют компоненты нормальной биологической среды, в том числе и наноразмерные везикулы, или экзосомы.

Цель исследования – изучение механизмов и оценка эффекта влияния экзосом плазмы на клетки рака молочной железы в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. В исследовании использованы культура клеток рака молочной железы MDA-MB-231 и экзосомы, выделенные из плазмы или культуральной среды. Для анализа экзосом применялись методы корреляционной спектроскопии, вестерн-блоттинг. Функциональные эффекты экзосом оценивались в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Результаты. В представленной работе показано, что экзосомы плазмы стимулируют адгезивную и двигательную активность клеток рака молочной железы, потенцируя процесс метастатической диссеминации. Для реализации стимулирующего эффекта достаточно контактного взаимодействия, которое опосредовано фибронектином на поверхности экзосом и цитоплазматическим сигнальным каскадом, зависимым от киназы фокальной адгезии.

Выводы. Углубленное изучение роли экзосом плазмы или межклеточной жидкости в формировании и регуляции злокачественного фенотипа клеток опухоли может открыть перспективы разработки новых методов терапии онкологических заболеваний.

Ключевые слова: рак молочной железы, экзосомы, адгезия, метастазы, фибронектин

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-6-15

STIMULATION OF METASTATIC ACTIVITY OF BREAST CANCER CELLS BY PLASMA EXOSOMES

R. B. Samsonov^{1,2}, I. M. Kovalenko², D. A. Vasilyev², E. V. Tsyrlina², G. A. Dashan²,
Ch. Shochat-Carvalho³, D. Karasik³, L. M. Berstein², V. V. Lutyanskiy⁴, A. V. Malek^{1,2}

¹Oncosystem, Ltd.; 11/1–207 Hoshimina St., Saint-Petersburg, 194256, Russia;

²Petrov Institute of Oncology; 68 Leningradskaya St., Saint-Petersburg, 197758, Russia;

³Bar-Ilan University; Henrietta Szold 8, Safed, 13100 Israel;

⁴Company Algimed, Ltd; 11 Narochanskaya St., Minsk, 220020, Belarus

Background. Malignant phenotype of cancer cells and metastatic potency of the tumor are determined by genetic factors. In addition, normal biological environment, including the nano-vesicles or exosomes, plays an important role in regulation of the structural and functional characteristics of malignant cells.

Objective: presented study was aimed to evaluate mechanisms and to estimate effect of interaction of plasma exosomes and breast cancer cells in experimental conditions.

Materials and methods. We used breast cancer cell culture MDA-MB-231 and exosomes isolated from plasma and cultural medium. Exosomes were analyzed by dynamic light scattering method and western blotting. Functional effects of exosomes were evaluated in *in vitro* and *in vivo* models.

Results. In the present study we demonstrated that plasma exosomes stimulate the adhesion and the motility of breast cancer cells and induce the process of metastatic dissemination. Contact interaction of exosomes with cell surface is sufficient for stimulatory effect that is mediated by exosomal fibronectin and FAK-dependent signaling cascade.

Conclusions. Further investigation of plasma exosomes structure and functions is required to better understand their input in regulation of malignant cell phenotype. This research has a potential to provide novel approaches for cancer therapy.

Key words: breast cancer, exosome, cell adhesion, metastases, fibronectin

Введение

Экзосомы — один из нескольких типов наноразмерных везикул, секретируемых клетками в межклеточное пространство. В биогенезе экзосом имеет место этап формирования в цитоплазме мультивезикулярных телец, содержащих множество одинаковых по составу и размеру микровезикул. На этом этапе формируются специфические отличия экзосом от других типов везикул (эктосом, апоптотических телец). Предполагается, что секреция экзосом происходит как постоянно (или конститутивно), так и в результате стимуляции различными внутри- (или) внеклеточными факторами [1]. Биологическая значимость процессов формирования и секреции нановезикул точно не определена и является предметом активных исследований. С различной степенью уверенности принято считать, что секреция экзосом — это способ «очистки» клетки от ненужных метаболитов, изменения состава клетки в ходе процесса дифференцировки, модификации внеклеточной среды и стромы [2]. Кроме того, в последние годы сформировалась концепция экзосомальной системы межклеточных «коммуникаций». Получены разнообразные экспериментальные доказательства того, что экзосомы, попав во внеклеточное пространство, могут взаимодействовать с самой клеткой-продуцентом, соседними или анатомически отдаленными клетками [3]. Таким образом, экзосомы, опосредуя межклеточный транспорт ряда протеинов и нуклеиновых кислот, могут выполнять роль комплексного фактора ауто-, пара- и эндокринной регуляции гомеостаза тканей различных органов и систем [4]. Существует несколько механизмов взаимодействия экзосом с клеточной поверхностью, включая различные варианты эндоцитоза, взаимодействие с поверхностными рецепторами, слияния мембран везикулы и клетки и др. (рис. 1).

Изменения работы системы экзосомального транспорта или состава секретируемых клетками экзосом наблюдаются при ряде физиологических состояний, например при беременности [5] или ста-



Рис. 1. Схематическое изображение механизмов взаимодействия экзосом с клеткам

рени [6]. Специфические искажения биохимического профиля циркулирующих экзосом характерны для хронических системных заболеваний, включая болезни нейродегенеративные и центральной нервной системы [7, 8], метаболические нарушения и атеросклероз [9], патологии иммунной системы [10] и вирусные инфекции [11]. Практический интерес представляет изучение роли экзосом в развитии и прогрессии онкологических заболеваний [12]. Причем объектом большинства исследований являются экзосомы, секретируемые злокачественными клетками [13].

Патологические эффекты опухолевых экзосом (ОЭ) были показаны во множестве экспериментальных работ. Например, экзосомы, секретируемые клетками первичной опухоли поджелудочной железы, переносятся током плазмы в лимфатические узлы и паренхиму легких, где они индуцируют экспрессионные и морфологические изменения, которые оптимизируют условия для колонизации этих тканей циркулирующими опухолевыми клетками и формирования метастазов [14]. В другой работе было показано, что экспрессионные изменения, индуцируемые опухолевыми экзосомами в исходно нормальных донорских Т-лимфоцитах (CD4+) при культивации *in vitro*, приводят к потере поверхностных лимфоцитарных маркеров (CD69) и снижению функциональной активности клеток [15]. Интересно, что наблюдаемый эффект не требовал интернализации экзосом Т-клетками, а был опосредован активацией поверхностных рецепторов. В целом, описан ряд механизмов, с помощью которых экзосомы, секретируемые опухолевыми клетками, прямо или опосредовано влияют на развитие, дифференцировку и функциональную активность иммунных клеток, что в результате приводит к угнетению противоопухолевой иммунной реакции [16].

Особого внимания заслуживает роль ОЭ в процессе модификации соединительной ткани вокруг растущей опухоли путем изменения структуры стромы и активности клеточных компонентов (эндотелиоцитов, фибробластов) [17]. Результаты активных исследований особенностей состава и патологических эффектов ОЭ создали почву для разработки новых методов диагностики и мониторинга [18].

Как известно, все (или почти все) клетки организма секретируют экзосомы и в норме экзосомы могут быть выделены из большинства биологических жидкостей, включая плазму, мочу, ликвор, молоко, синовиальную жидкость и др. Следовательно, на клетки растущей опухоли оказывают воздействие экзосомы, секретируемые нормальными клетками окружающей стромы. Циркулирующие опухолевые клетки находятся под воздействием «коктейля» экзосом плазмы, имеющих различное (преимущественно тромбо-

цитарное) происхождение. Образование метастазов неизбежно сопровождается влиянием экзосом, секретлируемых клетками нормальной ткани, на опухолевые клетки в очаге диссеминации. Логично предположить, что в дополнение к феномену воздействия ОЭ на клетки здоровых тканей, определенное значение в патогенезе онкологических заболеваний имеет воздействие, которое оказывают на клетки опухоли экзосомы, секретлируемые клетками нормальных тканей. Число исследований в этой области существенно меньше по сравнению с количеством работ, сфокусированных на изучении ОЭ. Очевидно, исследования циркулирующих ОЭ ведут к созданию новых диагностических методов, в то время как разработка новых терапевтических подходов скорее основывается на коррекции (модуляции) эффекта, который оказывают циркулирующие или тканевые экзосомы на опухолевые клетки. Это предположение косвенно подтверждается позитивным терапевтическим эффектом метода экстракорпоральной изоляции экзосом из плазмы крови онкологических пациентов с помощью связывания специфических поверхностных протеинов или гликопротеинов антителами или лектинами соответственно [19]. Авторы упомянутой работы и ряда аналогичных ей публикаций объясняют наблюдаемый эффект преимущественно фактом уменьшения депрессивного эффекта ОЭ на иммунную систему. Но изоляция экзосом из плазмы не была селективной, т. е. изолировались все, а не только опухолевые экзосомы, поэтому эффект мог быть обусловлен и уменьшением активирующего эффекта экзосом плазмы на опухолевые клетки. Некоторые экспериментальные данные свидетельствуют в пользу этой гипотезы. Например, в эксперименте *in vitro* было показано, что экзосомы сыворотки стимулируют пролиферацию клеток рака молочной железы (РМЖ) в условиях отсутствия адгезивного контакта [20]. Секретлируемые тромбоцитами экзосомы стимулируют пролиферацию, адгезию к эндотелиальным клеткам, инвазивную активность клеток карциномы легких [21]. А экзосомы, секретлируемые фибробластами, стимулируют рост стволовых клеток коло ректальной карциномы и повышают резистентность этой опухоли к цитостатической терапии [22].

В целом, опубликованные данные позволяют предположить, что «поведение» опухолевых клеток в ряде аспектов регулируется «коктейлем» экзосом, секретлируемых клетками нормальных тканей. Следовательно, экзосомы плазмы могут оказывать влияние на жизнеспособность и метастатический потенциал циркулирующих опухолевых клеток. Исследование возможных механизмов и эффектов такого влияния может создать основу для разработки новых методов профилактики или терапии метастатической диссеминации.

Целью данного исследования была оценка реакции клеток РМЖ на контакт с экзосомами. В ряде экспериментов *in vitro* и *in vivo* было показано, что экзосомы стимулируют адгезивную и двигательную активность, повышая инвазивный потенциал клеток РМЖ. Причем наблюдаемый эффект: а) не зависел от происхождения экзосом, б) предполагал контактное взаимодействие молекул фибронектина (ФН) на поверхности экзосом и поверхностных рецепторов клетки и в) был опосредован сигнальным каскадом, который регулируется ферментом – киназой фокальной адгезии (focal adhesion kinase, FAK).

Материалы и методы

Клеточные линии и эксперименты *in vitro*

В исследовании была использована стабильная культура клеток РМЖ MDA-MB-231, полученная из опухолевых клеток плеврального экссудата. Клетки этой линии сохраняют злокачественный (ER-) фенотип на протяжении многократных пассажей и культивируются в стандартных условиях: при температуре 37 °C и 5 % содержании CO₂ в питательной среде RPMI-1640 с L-глутамином и 10 % эмбриональной сывороткой телят («БиоЛот», СПб). Клетки линии MDA-MB-231, стабильно экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок и РНК-дуплекс, ингибирующий экспрессию молекулы FAK, были предоставлены коллегами из Университета им. Бар-Илана (доктором Nava Gil-Henn). При необходимости применения среды без экзосом использовалась сыворотка Eho-FBS («SBI», США). Стандартный культуральный пластик («ПанЭко», Москва) применялся для культивации клеток в адгерентном монослое; для анализа неадгерентного (суспензионного) роста клеток пластик предварительно покрывали раствором полимера – Poly-HEMA, Sigma-Aldrich (Москва) по методу, описанному нами ранее [23]. Пролиферативная активность клеток определялась с помощью колориметрического теста SK04-13 Cell Counting Kit-8 («Dojindo Molecular Technologies, Inc.», США). Для анализа движения клеток по плоскости была использована система IN Cell Analyzer HCA Systems («GE Healthcare Life Sciences», США), с помощью которой проводилось автоматическое фотографирование клеток каждые 5 мин в течение 8 ч. Полученные данные анализировались с помощью программ «ImageJ» (НИН, США) и «Chemotaxis and Migration Tool» («Ibidi GmbH», Германия). Для оценки способности клеток направленно мигрировать в трехмерном матриксе были использованы специальные культуральные камеры (Corning® Transwell® polycarbonate membrane cell culture inserts), проницаемое дно которых покрывалось тонким слоем геля Matrigel Basement Membrane Matrix («BD Biosciences», США), каждая из которых помещалась в лунку 12-луночно-

го планшета. Среда «внутренней» камеры содержала 0,5 % сыворотки, и в нее помещались клетки. Концентрация сыворотки в среде «внешней» камеры составляла 10 %. Градиент питательных веществ и хемоаттрактантов стимулировал перемещение клеток из внутренней камеры во внешнюю. После 12 ч инкубации клетки, переместившиеся из внутренней камеры, оказывались на нижней поверхности мембраны, где они фиксировались 10 % раствором метанола и окрашивались Bromophenol Blue («Sigma Aldrich», Москва). Клетки фотографировали и подсчитывали в 4 полях зрения для каждого эксперимента.

Данио-рерио (zebrafish) и эксперименты *in vivo*

В работе была использована линия рыбок данио-рерио (*Danio rerio*, zebrafish «casper» [24]), у которых в результате гомозиготных мутаций в 2 генах снижено число пигментных клеток, что делает такую модель удобной для экспериментальных трансплантаций. Кроме того, иммунная система эмбрионов в течение первой недели еще недостаточно сформирована для отторжения ксенографтных клеток. Поэтому имплантация опухолевых клеток человека в ходе коротких экспериментов не требует специальных усилий для угнетения иммунитета. Эмбрионы (48 ч после оплодотворения) помещали в раствор трикаина (80–100 мкг/мл) для анестезии и седации за 5–10 мин до инъекции. Адгерентно растущие клетки РМЖ (MDA-MB-231) отделяли от пластика традиционным методом с помощью трипсина, дважды «отмывали» фосфатно-солевым буфером; после центрифугирования осадок клеток ресуспензировался в буфере, содержащем или не содержащем (контроль) экзосомы. Концентрацию экзосом в суспензии определяли с помощью анализа концентрации белков методом Бредфорда («Bio-Rad Laboratories, Ltd.», США). Клетки РМЖ инкубировались в суспензии экзосом, приблизительно соответствующей концентрации экзосом в плазме. (Методы более точного анализа, например корреляционная спектроскопия, не применимы для таких концентрированных растворов везикул.) После 30 мин инкубации суспензию клеток и экзосом имплантировали в желточный мешок эмбрионов с помощью тонкой стеклянной иглы (диаметром 15 мкм) и автоматической помпы, позволяющей дозировать инъекцию объема суспензии, содержащий 250–300 клеток.

Эффективность имплантации и жизнеспособность эмбрионов оценивались через 30 мин, эмбрионы помещались в лунки 96-луночного планшета и инкубировались еще 2 дня при температуре 35 °С. Каждая экспериментальная группа включала 30 эмбрионов. Результаты (наличие и распределение флуоресцентных клеток) оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа после эвтаназии концентрированным раствором трикаина.

Экзосомы: изоляция, анализ

Экзосомы изолировались из 3 источников: эмбриональной телячьей сыворотки, сыворотки крови пациенток с РМЖ и культуральной среды. В последнем случае клетки культивировались в среде с сывороткой без экзосом Ехо-FBS («SBI», США) для исключения контаминации. Для экспериментов *in vitro* и *in vivo* экзосомы выделялись классическим методом дифференциального ультрацентрифугирования [25], преимущества и недостатки которого обсуждались в предыдущих наших публикациях [26]. Кратко о методе: плазма (разведение 1:1 с фосфатно-солевым буфером) или среда центрифугировались последовательно в 3 этапа:

- 1) 2000 × G – 30 мин;
- 2) 17 000 × G – 60 мин;
- 3) 100 000 × G – 90 мин.

Первые 2 этапа позволяли осадить клетки и клеточный детрит, при этом экзосомы оставались в супернатанте. Экзосомы осаждались в ходе заключительного этапа ультрацентрифугирования в виде светлого осадка, который легко ресуспензировался в изотоническом буфере. Концентрация экзосом оценивалась либо с помощью набора реагентов для соответствующих измерений ЕхоTEST («Hansa Bio Med», Эстония), либо путем экстраполяции результатов измерения концентрации протеинов методом Бредфорда («Bio-Rad Laboratories, Ltd.», США). Эксперименты *in vitro* проводились при концентрации экзосом 2×10^{11} везикул/мл, что примерно в 5 раз ниже количества нановезикул в плазме. В ходе эксперимента *in vivo* инкубация и трансплантация клеток РМЖ проводились в суспензии экзосом, концентрация которых приблизительно соответствовала концентрации нановезикул в плазме: 1×10^{12} везикул/мл.

Метод сравнительного анализа специфических белков (вестерн-блоттинг) описан нами ранее [27]. Кратко о методе: осадки экзосом, полученные после центрифугирования, были лизированы (0,05 моль Tris-HCl, pH 7,4; 0,15 моль NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % SDS) в присутствии смеси ингибиторов протеолиза P8340 («Sigma Aldrich», США) в течение 30 мин при температуре 4 °С. Лизаты вновь центрифугировали для удаления фрагментов мембран, экстракты протеинов нормализовали методом Бредфорда («Bio-Rad Laboratories, Ltd.», США). Электрофорез проводили в 10 % SDS-PAAG, для нанесения использовался стандартный нередуцирующий буфер. Разделенные электрофорезом белки переносили на поливиниловую мембрану, которую блокировали в течение часа в 0,1 % растворе казеина в трис-солевом буфере с твином-20 и инкубировали с соответствующими антителами: анти-CD63 (ab68418), антифибронектином (ab2413), анти-бета-актином (ab8227), анти-FAK (ab40794) производства компании «Abcam» (США).

Визуализацию блотов проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой anti-rabbit IgG H&L (HRP): ab6721 («Abcam», США), набора Pierce™ ECL Western Blotting Substrate («Thermo Fischer Scientific», США) на аппарате LAS-4000 («General Electric», США).

Для оценки размера и анализа свойств поверхности экзосом их изолировали с помощью соответствующих наборов – Immunobeads for Overall Exosome capture («Hansa Bio Med», Эстония). Эти наборы предполагают связывание экзосом антителами (анти-CD9), фиксированными на поверхности латексных частиц размером до 1 мк. Последующее «отмывание» и отделение от частиц позволяет получить препарат экзосом более чистый, чем это возможно путем ультрацентрифугирования. Анализ экзосом проводился на аппарате NanoSight NS300 (Malvern, Великобритания) при нескольких разведениях в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты и обсуждение

Стимуляция адгезивной и миграционной активности клеток РМЖ при контактом взаимодействии их с экзосомами

Целью 1-го эксперимента было подтверждение результатов, опубликованных ранее J. Ochieng и соавт. [20], в условиях *in vitro* и *in vivo*. Мы начали с простого сравнения эффективности адгезии клеток РМЖ (MDA-MB-231) к культуральному пластику в присутствии эмбриональной телячьей сыворотки с содержанием и без экзосом. Эффект оценивался через час после культивации в суспензии равного количества клеток. Аналогичные эксперименты были проведены с использованием плазмы крови пациенток с РМЖ (содержащей и не содержащей экзосомы), а также в среде с сывороткой без экзосом (содержащей и не содержащей экзосомы, полученные в ходе культивации клеток той же линии). В ходе всех 3 экспериментов присутствие экзосом определяло большую эффективность адгезивного взаимодействия клеток с субстратом (рис. 2, а и б).

Для оценки эффекта, который могут оказывать экзосомы на способность клеток к суспензионному росту, культуральный пластик был покрыт полимером, предотвращающим адгезию клеток (Poly-HEMA). Были протестированы экзосомы из 3 источников: телячьей эмбриональной сыворотки, сыворотки крови пациенток с РМЖ и культуральной среды. Во всех 3 экспериментах наблюдался схожий эффект: в присутствии экзосом клетки образовывали многоклеточные конгломераты сферической или неправильной формы в течение 3–4 ч культивации. Фотографии клеток, культивируемых в среде, содержащей экзосомы эмбриональной телячьей сыворотки, и в среде без экзосом (контроль) представлены на рис. 2, в и г.

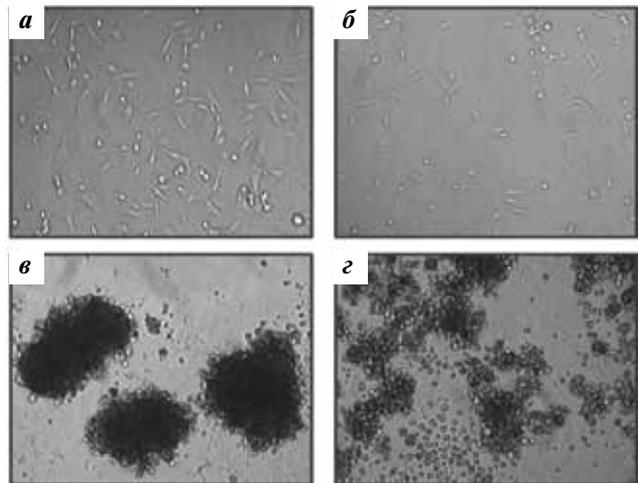


Рис. 2. Эффект воздействия экзосом на адгезивные характеристики клеток РМЖ (MDA-MB-231) *in vitro*: а, б – рост клеток на адгезивном пластике; в, г – рост клеток на неадгезивном пластике в условиях суспензии; а, в – концентрация экзосом в культуральной среде, эквивалентная 20 % концентрации экзосом в плазме; б, г – отсутствие экзосом в культуральной среде

Сама по себе способность эпителиальных клеток к формированию адгезивных контактов с базальной мембраной и соседними клетками является нормальным свойством, которое имеет тенденцию утрачиваться в результате трансформации. Злокачественный фенотип определяется сочетанием специфических адгезивных характеристик и двигательной активности. Для оценки функционального эффекта воздействия экзосом на клетки РМЖ, мы использовали модель *in vivo* (эмбрионы данио-рерио, zebrafish), которая позволяла приблизить условия эксперимента к реальной ситуации. Клетки линии MDA-MB-231, экспрессирующие флуоресцентный белок, в состоянии суспензии инкубировали с экзосомами, концентрированными из культуральной среды, и инъектировали в желточный мешок эмбрионов. Наличие клеток РМЖ в теле эмбриона, их пролиферация и локализация оценивались через 48 ч с помощью флуоресцентной микроскопии. Репрезентативные результаты представлены на рис. 3. В присутствии экзосом опухолевые клетки были способны мигрировать из желточного мешка в различные части эмбрионов (рис. 3, а). В контрольной группе (рис. 3, б) флуоресцирующие клетки заметны только в пределах желточного мешка. Эти данные показывают, что экзосомы стимулируют эффективную комбинацию адгезивной и двигательной активности клеток РМЖ, что может определять повышение метастатического потенциала.

Опосредование фибронектином стимулирующего действия экзосом

Цель следующего этапа работы – количественная оценка наблюдаемых результатов и определение

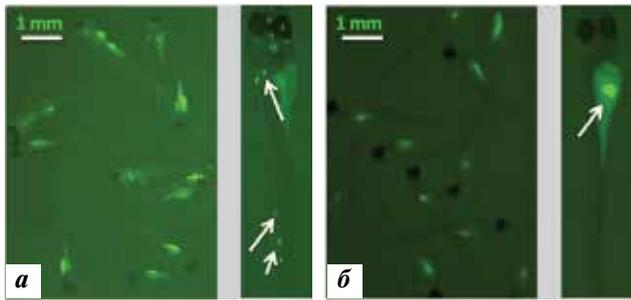


Рис. 3. Эффект воздействия экзосом на миграторную активность клеток РМЖ (MDA-MB-231) *in vivo*. Стрелками показаны флуоресцирующие опухолевые клетки. Суспензия клеток линии MDA-MB-231, экспрессирующая зеленый флуоресцентный белок, инъецированная в желточный мешок 2-дневных эмбрионов данио-рерио (фотографии сделаны после 2 дней инкубации): а – инкубация (30 мин) и инъецирование клеток в суспензии экзосом в концентрации, соответствующей физиологической концентрации экзосом в плазме; б – инъецирование клеток в растворе фосфатно-солевого буфера (контроль)

механизма, который может лежать в основе стимулирующего действия экзосом на клетки РМЖ.

С учетом динамики наблюдаемого эффекта и данных литературы мы предположили, что контактного взаимодействия экзосом с поверхностью клетки может быть достаточно для реализации стимулирующего действия экзосом. Один из возможных механизмов такого контактного взаимодействия был описан для экзосом, секретируемых клетками миеломы [28]. Авторы этой работы показали, что контакт экзосом с клеточной мембраной опосредуется молекулами ФН, фиксированными на поверхности экзосом. ФН является мажорным белком плазмы и может неспецифично связываться с поверхностью циркулирующих везикул вне зависимости от их происхождения.

Можно предположить, что циркулирующие опухолевые клетки неизбежно контактируют с экзосомами плазмы и экзосомальный ФН может служить медиатором такого контактного взаимодействия. Для проверки этой гипотезы мы обработали экзосомы раствором трипсина (фермент класса гидролаз), отмыли фосфатно-солевым буфером и изолировали методом иммунно-аффинной сорбции. По результатам измерений, проведенных методом корреляционной спектроскопии (рис. 4, а), процедура привела к ожидаемому снижению концентрации и некоторому уменьшению размера частиц. Использование дополнительно к этому новой технологии, сочетающей в себе метод корреляционной спектро- и микроскопии, позволило оценить интенсивность излучения, отраженного от поверхности анализируемых частиц. Этот параметр характеризует структуру поверхности. Его изменения показаны по оси z на рис. 4, б. Как видно при сравнении верхней и нижней панелей (рис. 4, б), обработка трипсином привела к существенному изменению структуры поверхности экзосом.

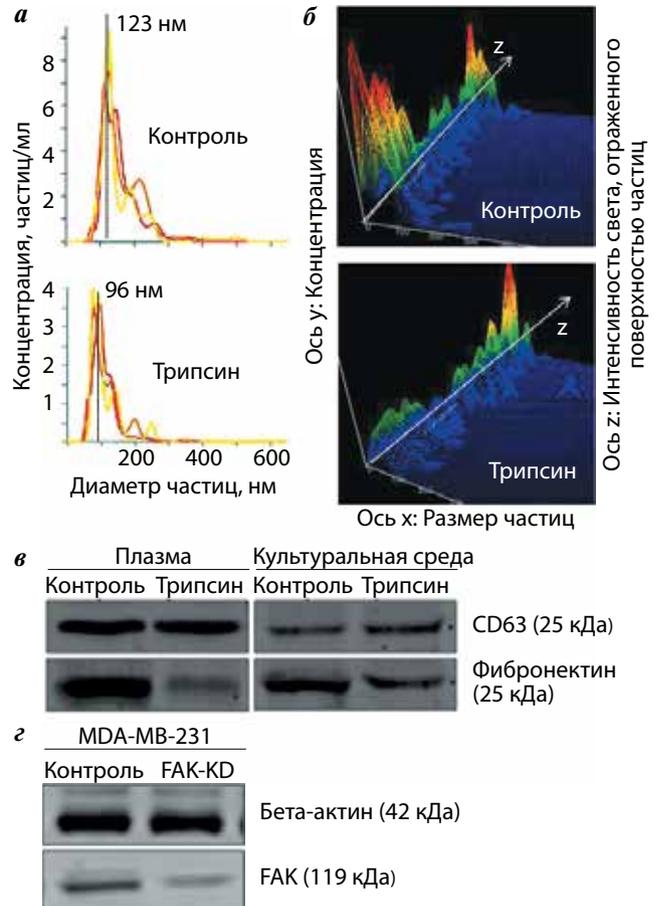


Рис. 4. Физические и биохимические характеристики экзосом: а, б – результаты анализа экзосом (выделенных из культуральной среды и обработанных трипсином для удаления поверхностного ФН) методом корреляционной спектроскопии на аппарате Nano Sight NS300 («Malvern», Великобритания); а – соотношение размера и концентрации экзосом; б – трехмерный график: по оси z показаны изменения характеристик света, отраженного от поверхности экзосом; в, z – анализ содержания специфических протеинов методом вестерн-блоттинга; в – анализ содержания ФН и экзосомального маркера CD63 (контроль) в экзосомах, выделенных из плазмы крови пациенток с РМЖ и культуральной среды; z – анализ содержания FAK и бета-актина (контроль) в клетках РМЖ линии MDA-MB-231

На заключительном этапе эквивалентное количество нативных и обработанных трипсином частиц было сконцентрировано и использовано для анализа содержания экзосомального маркера CD63 и ФН методом вестерн-блоттинга (рис. 4, в). Как предполагалось, инкубация с раствором трипсина привела к разрушению экзосомального ФН, но не повлияла на содержание в препарате трансмембранного тетраспонина CD63. В совокупности описанные результаты показали, что обработка трипсином приводит к незначительному уменьшению размера, существенному изменению структуры поверхности экзосом и частичному удалению трипсина из их состава. Интересно, что экзосомы из культуральной среды «очистились» от ФН значительно эффективней, чем экзосомы плазмы (правая и левая панели на рис. 4, в).

Это может быть связано с тем, что культуральная среда содержала лишь 10 % сыворотки, которая является источником ФН, поэтому экзосомы из среды содержали меньше ФН, чем экзосомы из плазмы.

Описанная процедура ферментативного разрушения экзосомального ФН была проведена с экзосомами, выделенными из плазмы крови пациенток и культуральной среды; после чего эффект таких экзосом на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток РМЖ (MDA-MB-231) в условиях суспензии был оценен с помощью колориметрического теста. Исследование проводилось 5 дней (рис. 5, а и б): в присутствии экзосом плазменного или культурального происхождения наблюдалась активная пролиферация клеток с достижением «плато» к 4-му дню. В присутствии экзосом, «очищенных» от ФН трипсином, наблюдалась менее активная пролиферация клеток.

Необходимость функциональной активности рецепторной киназы фокальной адгезии для стимулирующего эффекта экзосом

ФН — один из ключевых белков межклеточного матрикса, неколлагеновый структурный гликопротеин, синтезируемый и выделяемый в межклеточное пространство многими клетками. Его вариант, синтезируемый преимущественно гепатоцитами, существует в растворимой форме и является одним из основных белков плазмы. Вероятно, именно этот тип ФН связывается с поверхностью циркулирующих везикул. Каждая субъединица ФН содержит последовательность Арг-Гли-Асп (RGD), с помощью которой он может присоединяться к клеточным рецепторам.

Наиболее полно изучен механизм взаимодействия плазменного ФН с интегринами [29]. Такое взаимодействие активирует сигнальный каскад, регулирующий многие аспекты клеточного гомеостаза, включая пролиферативную и миграционную активность. Ключевой молекулой, контролирующей работу этих сигнальных путей, является ФАК [30]. Патологическая активация этой сигнальной молекулы часто сопровождается процессом малигнизации клеток разных типов [31], включая протоковый эпителии молочных желез [32].

На основе сказанного мы предположили, что ФАК может участвовать в передаче (регуляции) активирующего сигнального каскада, который инициируется в результате контакта экзосомального ФН и рецепторных интегринов в составе поверхностной мембраны клеток РМЖ. Для проверки этого предположения, мы использовали клетки той же линии (MDA-MB-231), в которых экспрессия ФАК была стабильно ингибирована на пост-транскрипционном уровне. Активность пролиферации модифицированных и контрольных клеток была оценена в парал-

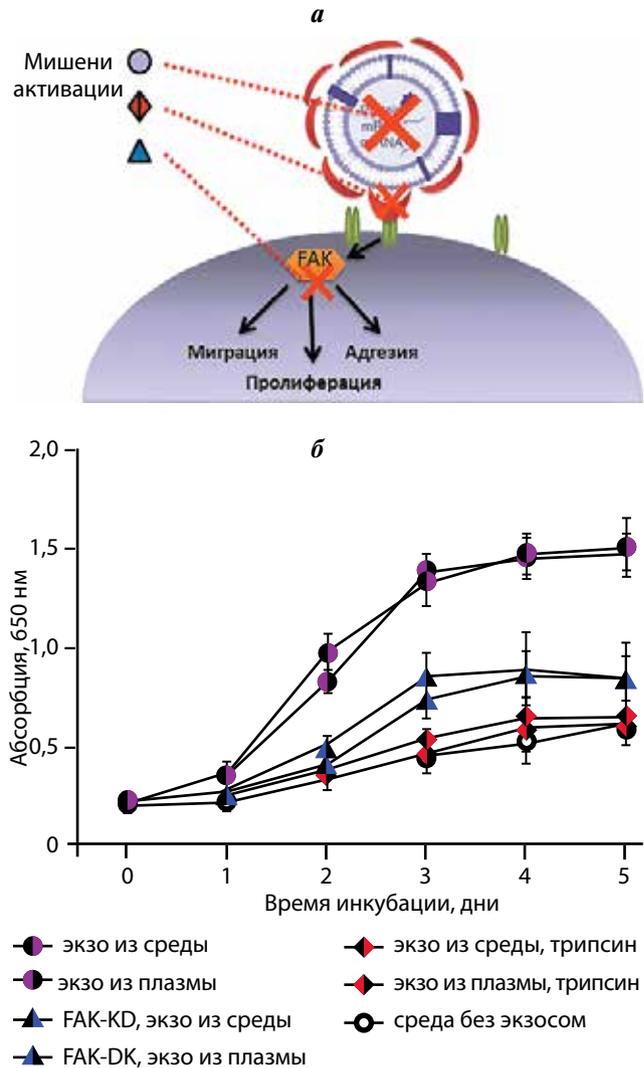


Рис. 5. Результаты анализа пролиферативной активности клеток колориметрическим методом в условиях неадгезивного роста. В эксперименте тестировалось действие на клетки линии MDA-MB-231 экзосом — нативных (○), обработанные трипсином (△) и в состоянии инактивации молекулы ФАК (◇). Каждый эксперимент был проведен дважды с использованием экзосом, выделенных либо из культуральной среды, либо из плазмы (что отражено характером заполнения фигур легенды). Контролем служили клетки линии MDA-MB-231, культивирующейся в условиях среды без экзосом.

ельных экспериментах с использованием интактных или «очищенных» от ФН экзосом, полученных либо из бычьей сыворотки, либо из культуральной среды (схему и результаты эксперимента см. на рис. 5, а и б). Инактивация ФАК снижала способность клеток «отвечать» на стимулирующее влияние экзосом вне зависимости от их происхождения. Интересно, что пролиферация модифицированных клеток в присутствии экзосом была несколько выше, чем пролиферация контрольных клеток в среде, содержащей «очищенные» от ФН экзосомы, или в среде без экзосом. Это может быть свидетельством существования сигнальных путей, альтернативных ФАК-каскаду,

и дополнительных возможностей «трансляции» стимулирующего влияния экзосом.

Стимуляция экзосомами миграционной активности клеток рака молочной железы (MDA-MB-231) *in vitro*

С целью количественной оценки влияния экзосом на адгезивные и миграционные характеристики клеток РМЖ были использованы модели *in vitro*. Они лишь приближенно отражают реальную ситуацию миграции опухолевых клеток по плоскости (2D) или в толще ткани (3D), но позволяют провести достаточно точные измерения. Например, при культивации на адгезивном пластике клетки «передвигаются» по его плоскости. Это движение характеризуется определенной цикличностью и сопровождается изменением формы, образованием псевдоподий на «лидирующем» крае клетки, формированием «фокальных» контактов клетки с матриксом, «подтягиванием» клетки к переднему краю и т. д. Такое движение приблизительно отражает перемещение клеток вдоль плотных образований типа поверхности эпителия или базальной мембраны. В условиях 2D эксперимента миграцию клетки можно наблюдать в течение длительного периода времени, что позволяет оценить различные характеристики движения (траекторию, перемещение, скорость) (рис. 6, а).

В нашем эксперименте наблюдение проводилось за клетками, которые культивировались в среде содержащей (не содержащей) экзосомы в течение 8 ч.

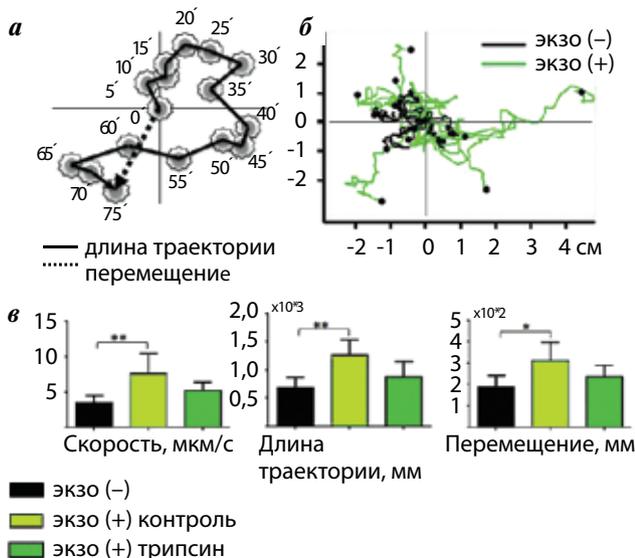


Рис. 6. Анализ миграции клеток РМЖ по плоскости культурального пластика: а – схема эксперимента и обозначение измеряемых параметров; б – изображение траекторий движения клеток (зеленые – в присутствии экзосом, черные – в среде без экзосом) после совмещения точек старта; в – сравнительные результаты усредненной для группы клеток оценки скорости, длины пути и перемещения в течение 8 ч. Статистическая значимость разницы определена по U-критерию Манна–Уитни; $p < 0,5$ (*), $p < 0,05$ (**)

На рис. 6, б показаны траектории движения 16 клеток после сопоставления точек старта (8 клеток в среде, содержащей экзосомы, 8 – в среде без экзосом) На рис. 6, в представлены сравнительные результаты 3 экспериментов в средах: 1) без экзосом, 2) с нативными экзосомами, 3) с «очищенными» от ФН экзосомами.

Эти результаты позволяют сделать вывод, что экзосомы стимулируют 2D миграционную активность клеток, но стимулирующий эффект зависит от наличия ФН на поверхности экзосом.

Использование камеры, разделенной проницаемой для клеток мембраной и слоем геля, позволяет несколько приблизить условия *in vitro* эксперимента к реальности (рис. 7, а). Для стимуляции направленного движения клеток из одной камеры в другую был создан градиент питательных веществ и хемокинов (10 % vs. 0,5 % эмбриональной телячьей сыворотки). Как и в предыдущем случае, сравнение проводилось между клетками, которые культивировались в средах: без экзосом, с нативными экзосомами и с «очищенными» от ФН экзосомами. В этом эксперименте были получены аналогичные результаты, которые подтверждают способность экзосом стимулировать 3D миграцию клеток РМЖ и зависимость этого феномена от экзосомального ФН.

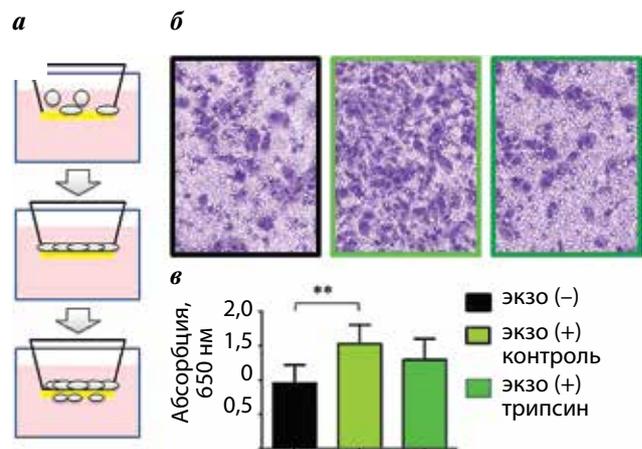


Рис. 7. Анализ миграции клеток РМЖ в трехмерном пространстве: а – схема эксперимента; б – репрезентативные изображения клеток, «прошедших» сквозь мембрану, фиксированных метанолом и окрашенных бром-фенолом на нижней поверхности мембраны; в – сравнительная оценка количества клеток, «прошедших» сквозь мембрану, в 3 параллельных экспериментах. Статистическая значимость разницы определена по U-критерию Манна–Уитни, $p < 0,05$ (**)

Заключение

В практической медицине традиционно принято оценивать клеточный состав циркулирующей крови и биохимический состав плазмы. Это комплексные показатели, которые объективно отражают состояние организма и течение системных заболеваний. Анализ строения, состава и физиологической роли

циркулирующих субклеточных структур был затруднен в силу технических ограничений. В настоящее время, благодаря развитию и широкому внедрению новых технологий спектроскопии и их сочетанию с традиционными методами световой микроскопии, сделаны первые шаги в исследовании наноразмерных компонентов крови и других биологических жидкостей. Стало очевидно, что циркулирующие нановезикулы являются важным физиологическим фактором, значимо вовлеченным в патогенез многих заболеваний, включая онкологические [33]. Активность исследований в этой области является косвенным доказательством открывающихся возможностей разработки принципиально новых диагностических и терапевтических методов [34].

В основе данного исследования лежало предположение, что в процессе развития и диссеминации РМЖ имеет значение взаимодействие опухолевых клеток и экзосом межклеточной среды и плазмы. В работе было показано, что контакт с экзосомами изменяет адгезивные характеристики и двигательную активность опухолевых клеток — качества, прямо определяющие

метастатический потенциал опухоли. Кроме того, представленные результаты указывают на то, что стимулирующее влияние экзосом может быть опосредовано лишь контактным взаимодействием и не требует «интернализации» экзосомы. Так как компонентам плазмы свойственно с равной вероятностью адсорбироваться на поверхности всех циркулирующих экзосом, стимулирующий эффект последних может не зависеть от их происхождения и быть относительно универсальным. Кроме того, контактный характер взаимодействия может определять динамику эффекта, а именно: относительно быстрое изменение характеристик клетки в зависимости от окружающих условий.

В целом, представленные результаты указывают на значимость наноразмерных компонентов внутренней среды организма на процесс развития онкологического заболевания. Разработка методов оценки, осмысленного анализа и коррекции состава этих компонентов может быть основой для нового подхода к терапии рака, включая РМЖ с различным рецепторным фенотипом и, соответственно, различной чувствительностью к гормональным сигналам.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kowal J., Tkach M., Thery C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2014;29:116–25.
2. Abels E.R., Breakefield XO. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36(3):301–12
3. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 2014;4;3. doi: 10.3402/jev.v3.24641. eCollection 2014. PMID: 25143819.
4. Iraci N., Leonardi T., Gessler F. et al. Focus on Extracellular Vesicles: Physiological Role and Signalling Properties of Extracellular Membrane Vesicles. *Int J Mol Sci* 2016;6;17(2). pii: E171. doi: 10.3390/ijms17020171. PMID: 26861302.
5. Mincheva-Nilsson L., Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am J Reprod Immunol* 2014;72(5):440–57.
6. Weïner S., Schraml E., Redl H. et al. Secretion of microvesicular miRNAs in cellular and organismal aging. *Exp Gerontol* 2013;48(7):626–33.
7. Russo I, Bubacco L, Greggio E. Exosomes-associated neurodegeneration and progression of Parkinson's disease. *Am J Neurodegener Dis* 2012;1(3):217–25.
8. Tsilioni I., Panagiotidou S., Theoharides T.C. Exosomes in neurologic and psychiatric disorders. *Clin Ther* 2014;36(6):882–8.
9. Huber HJ, Holvoet P. Exosomes: emerging roles in communication between blood cells and vascular tissues during atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2015;26(5):412–9.
10. Buzas EI, Gyorgy B, Nagy G et al. Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol* 2014;10(6):356–64.
11. Alenquer M., Amorim M.J. Exosome Biogenesis, Regulation, and Function in Viral Infection. *Viruses* 2015;7(9):5066–83.
12. Малек А.М., Берштейн Л.М., Филатов М.В., Беляев А.М. Система экзосомальных межклеточных коммуникаций и ее роль в процессе метастатической диссеминации. *Вопросы онкологии* 2014;60(4):429–36.
13. Tchekina E.M., Shcherbakov A.M., Zhuravskaya A.Y. et al. Exosomes and transfer of (epi)genetic information by tumor cells. *Advances in Molecular Oncology* 2015;3(2):8–20.
14. Rana S., Malinowska K., Zoller M. Exosomal tumor microRNA modulates premetastatic organ cells. *Neoplasia* 2013;15(3):281–95.
15. Muller L., Mitsuhashi M., Simms P. et al. Tumor-derived exosomes regulate expression of immune function-related genes in human T cell subsets. *Sci Rep* 2016;6:20254.
16. Whiteside T.L. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J Clin Invest* 2016;126(4):1216–23.
17. Fu H., Yang H., Zhang X., Xu W. The emerging roles of exosomes in tumor-stroma interaction. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016;17. PMID: 26987524.
18. Whiteside T.L. The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Rev Mol Diagn* 2015;15(10):1293–310.
19. Marleau A.M., Chen C.S., Joyce J.A., Tullis R.H. Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *J Transl Med* 2012;10:134.
20. Ochieng J., Pratap S., Khatua A.K., Sakwe A.M. Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes. *Exp Cell Res* 2009;315(11):1875–88.
21. Janowska-Wieczorek A., Wysoczynski M., Kijowski J. et al. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer* 2005;113(5):752–60.
22. Hu Y., Yan C., Mu L. et al. Fibroblast-Derived Exosomes Contribute to Chemoresistance through Priming Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer. *PLoS One* 2015;10(5):e0125625.
23. Malek A., Catapano C.V., Czubayko F., Aigner A. A sensitive polymerase chain reaction-based method for detection and quanti-

- fication of metastasis in human xenograft mouse models. *Clin Exp Metastasis* 2010;27(4):261–71.
24. White R.M., Sessa A., Burke C. et al. Transparent adult zebrafish as a tool for *in vivo* transplantation analysis. *Cell stem cell* 2008;2(2):183–89.
25. Thery C., Amigorena S., Raposo G., Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol* 2006;3;Unit 3.22.
26. Malek A.V., Samsonov R.B., Chiesi A. Development of cancer diagnostics and monitoring methods based on analysis of tumor-derived exosomes. *Russian Journal of Biotherapy* 2015;14(4): 9–18.
27. Samsonov R.B., Shtam T.A., Burdakov V.S. et al. Extraction and analysis of the exosomal micro-RNA from the urine: new method of the prostate cancer diagnostics. *Experimental and Clinical Urology* 2015;4:28–32.
28. Purushothaman A., Bandari S.K., Liu J. et al. Fibronectin on the Surface of Myeloma Cell-derived Exosomes Mediates Exosome-Cell Interactions. *J Biol Chem* 2016;291(4):1652–63.
29. Akiyama S.K. Integrins in cell adhesion and signaling. *Hum Cell* 1996;9(3):181–6.
30. Schaller M.D. Cellular functions of FAK kinases: insight into molecular mechanisms and novel functions. *J Cell Sci* 2010;123(7):1007–13.
31. Sulzmaier F.J., Jean C., Schlaepfer D.D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* 2014;14(9):598–610.
32. Luo M., Guan J.L. Focal adhesion kinase: a prominent determinant in breast cancer initiation, progression and metastasis. *Cancer Lett* 2010; 289(2): 127–39.
33. Pupyshv A. B. Extracellular vesicles: intercellular information flow and medical applications. *Tsitologiya* 2015;57(8):551–62.
34. Fais S., O'Driscoll L., Borrás F.E. et al. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano* 2016;15.

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ БЕТА-III ТУБУЛИНА В ОПУХОЛЕВОЙ И ОКРУЖАЮЩЕЙ НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПАЦИЕНТОВ С НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНЫМ РАКОМ ЛЕГКОГО

И.А. Мамичев, Т.А. Богущ, Е.А. Дудко, О.М. Рябинина, А.Н. Гришанина,
В.Ю. Кирсанов, Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мамичев Иван Андреевич labmedchem@mail.ru

Введение. Бета-III тубулин (TUBB3) — одна из 8 изоформ белка микротрубочек бета-тубулина, экспрессирующаяся в организме взрослого человека исключительно в нейронах и клетках Сертоли. В то же время экспрессия TUBB3 выявляется в клетках солидных опухолей, в частности немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), где его экспрессию обычно связывают с неблагоприятным прогнозом и устойчивостью к терапии препаратами платины и таксанами.

Цель исследования — проверка выдвинутой нами гипотезы, что TUBB3 может экспрессироваться не только в первичном опухолевом узле, но и за его пределами. Исследовано 60 хирургических биопсийных образцов немелкоклеточного рака легкого и морфологически нормальной окружающей ткани 30 пациентов, оперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Материалы и методы. Образцы переводили в одноклеточную суспензию, фильтровали, фиксировали в 4 % растворе формальдегида, окрашивали моноклональными антителами к TUBB3 и анализировали методом проточной цитофлуориметрии, разработанным в лаборатории медицинской химии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина и запатентованным.

Результаты. Экспрессия TUBB3 в группе образцов НМРЛ была выше, чем в группе образцов морфологически нормальной ткани. Тем не менее в подавляющем большинстве образцов морфологически нормальной ткани (25 из 30) TUBB3 экспрессировался, достигая значения в 39 % окрашенных клеток.

Выводы. В целом, полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности присутствия TUBB3-позитивных клеток за пределами первичной опухоли — в ткани, визуально не вовлеченной в опухолевый процесс.

Ключевые слова: немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), нормальная ткань легкого, бета-III тубулин (TUBB3), проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-16-18

IMMUNOFLUORESCENT ANALYSES OF TUMOR MARKER BETA-III TUBULIN EXPRESSION IN TUMOR AND ADJACENT NORMAL LUNG TISSUE DERIVED FROM PATIENTS WITH NON-SMALL CELL LUNG CANCER

I.A. Mamichev, T.A. Bogush, E.A. Dudko, O.M. Ryabinina, A.N. Grishanina, V.E. Kirsanov, B.E. Polotsky, M.M. Davydov
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Class III beta-tubulin (TUBB3) is one of the eight beta tubulin isotypes identified in human. It is constitutively expressed in brain and testis but not in lung tissue. TUBB3 is also known to appear in solid tumors, in particular in non-small cell lung cancer (NSCLC), and it is often associated with poor prognosis and resistance to taxanes and Vinka alkaloids.

Objective: We have suggested that TUBB3 expression may cover not only the primary tumor but also a wide adjacent area of morphologically normal lung tissue. To check the hypothesis we have measured TUBB3 expression both in the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and remote lung tissue derived from the same lung. 60 surgical biopsy specimens of NSCLC and morphologically normal lung tissue of 30 patients were investigated.

Materials and methods. Biopsy specimens were converted to suspension, fixed in 4 % formaldehyde and analyzed by flow cytometry using monoclonal antibodies to TUBB3. The method was developed in the laboratory of medicinal chemistry research Institute of experimental diagnostics and therapy of tumors (N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center) and patented.

Results. Fraction of TUBB3-positive cells in the group of adjacent lung tissue specimens was lower compared to NSCLC group but still positive in the majority of adjacent lung tissue specimens (25 of 30) and achieved up to 39 % of cells.

Conclusion. We suggest that TUBB3 expression in adjacent morphologically normal lung tissue indicates presence of transformed and potentially malignant cells far from the primary site.

Key words: non-small cell lung carcinoma (NSCLC), normal lung tissue, class III beta-tubulin (TUBB3), flow cytometry

Введение

Микротрубочки – важнейший компонент эукариотической клетки, обеспечивающий ее архитектуру, локомоцию, пролиферацию, расхождение хромосом в митозе и мейозе, транспорт органоидов. На ультраструктурном уровне каждая микротрубочка представляет собой свернутый лист, состоящий из повторяющихся гетеродимеров белков альфа- и бета-тубулинов [1]. У человека насчитывается 8 изоформ белка бета-тубулина, которые кодируются разными генами с тканеспецифичной экспрессией [2].

В клиническом контексте активно изучается бета-III тубулин (TUBB3) – потенциальный прогностический маркер агрессивности заболевания и предиктивный маркер устойчивости к таксанам [3]. Экспрессия TUBB3, как показывают многочисленные исследования на культурах опухолевых клеток, связана с развитием агрессивного клеточного фенотипа, устойчивого к таксанам [4], оксидативному стрессу [5, 6] и анойкису [7]. В норме белок экспрессируется только в нейронах и клетках Сертоли, но выявляется и в ткани солидных опухолей разной локализации, в том числе в ткани немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), что дает надежду на использование данного маркера в качестве дифференцировочного, позволяющего отличить опухолевую ткань от здоровой.

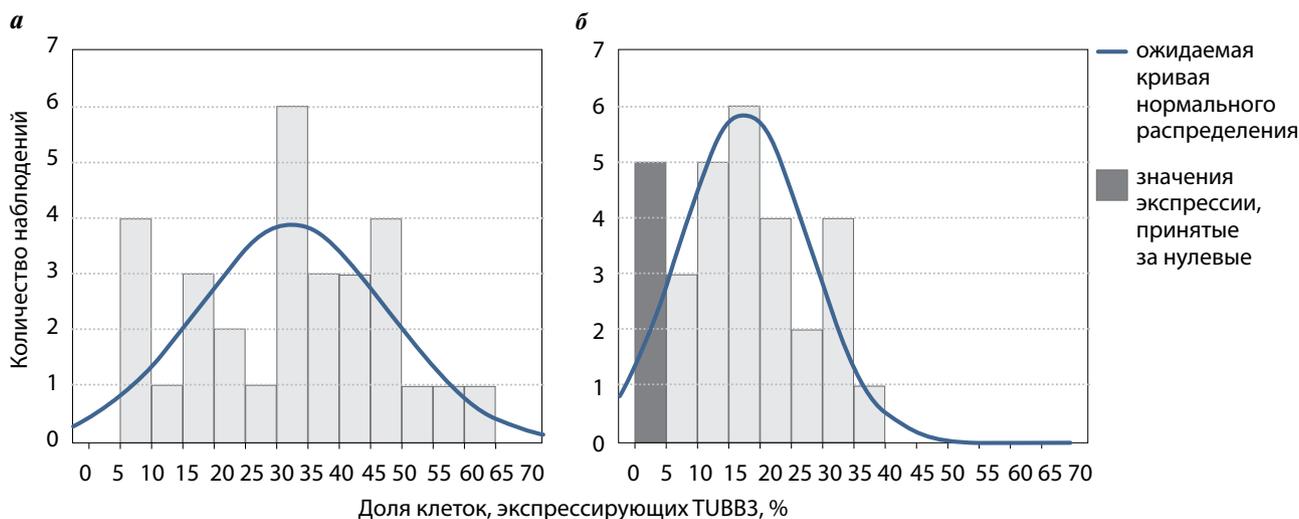
Мы предположили, что в случае выявления TUBB3 в нормальной ткани, окружающей первичный опухолевый очаг, белок может быть также маркером локальной распространенности опухолевого процесса и, таким образом, маркером агрессивности течения болезни. Справедливость этого предположения проверена на примере НМРЛ при сравнительной количественной оценке экспрессии TUBB3 в опухолевой и морфологически нормальной ткани органа.

Материалы и методы

Исследовано 60 хирургических биопсийных образцов НМРЛ и морфологически нормальной окружающей ткани органа, взятых у 30 пациентов, оперированных в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Образцы тщательно измельчали, инкубировали в растворе Версена при 37 °С в течение 30 мин, гомогенизировали и пропускали через фильтры диаметром 40 мкм. Полученную клеточную суспензию центрифугировали, осадок ресуспензировали в фосфатном буферном растворе (рН = 7,4) и фиксировали в 4 % растворе формальдегида. Суспензионные образцы инкубировали с первичными (ab7751) антителами в течение ночи и затем 1,5 ч с вторичными (ab98729) антителами, конъюгированными с DyLight650. Полученную суспензию анализировали на проточном цитофлуориметре Navios (производитель «Beckman Coulter», США). Методика, разработанная и запатентованная в лаборатории медицинской химии НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н.Н. Блохина, неоднократно использовалась для выявления экспрессии различных белковых маркеров [8].

Уровень экспрессии TUBB3 определяли как количество специфически флуоресцирующих клеток относительно общего количества клеток, включенных в анализ, вычисленное в программе FlowJo 10.0 с использованием статистического критерия Колмогорова–Смирнова. Пороговое значение уровня экспрессии маркера – 5 % и менее специфически флуоресцирующих клеток.

Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ STATISTICA фирмы StatSoft (США) версии 6.0. Анализ соответствия распределения уровня экспрессии TUBB3 параметрам нормального распределения проведен



Гистограммы распределения экспрессии TUBB3 в ткани немелкоклеточного рака легкого (а) и морфологически нормальной ткани легкого (б).

с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки различий между попарно сравниваемыми группами по доле специфически флуоресцирующих клеток использован непараметрический W-критерий Вилкоксона для связанных групп. За пороговый уровень значимости принимали величину $p < 0,05$.

Результаты

Экспрессия TUBB3 зарегистрирована в 100 % исследованных образцов НМРЛ. При этом отмечена значительная гетерогенность количественных показателей уровня экспрессии маркера в опухоли у разных пациентов – от 6 до 62 % клеток, экспрессирующих TUBB3. Данные, представленные на рисунке (а), показывают, что распределение значений признака соответствует нормальному ($p = 0,662$ по критерию Шапиро–Уилка). Средний уровень экспрессии составляет $32,3 \pm 15,4$ %, медиана – 33,5 % клеток, экспрессирующих TUBB3.

Среди образцов морфологически нормальной ткани легкого, окружающей первичный опухолевый узел, экспрессия TUBB3 зарегистрирована в 83 % случаев (25 из 30 исследованных образцов). Показатель уровня экспрессии маркера варьирует от 4 до 39 % специфически флуоресцирующих клеток. Гистограмма распределения значений признака среди исследованных образцов ткани, представленная на рисунке (б), демонстрирует, что распределение соответствует нормальному ($p = 0,564$ по критерию Шапиро–Уилка). Средний уровень экспрессии TUBB3 составляет $17,7 \pm 10,2$ %, медиана – 17,5 % клеток, экспрессирующих TUBB3.

Таким образом, в нормальной ткани легкого, окружающей очаг немелкоклеточного рака, выявляется опухолевый маркер TUBB3, но его экспрессия слабее, чем в опухоли, что подтверждается попарным сравне-

нием уровня экспрессии маркера в этих группах с использованием статистического критерия Вилкоксона ($p < 0,05$). Средний уровень экспрессии TUBB3 в опухоли практически в 2 раза превышает этот показатель в окружающей нормальной ткани легкого (32,3 % vs 17,7 % клеток, экспрессирующих маркер).

Заключение

Так как экспрессия TUBB3 в норме нехарактерна для клеток, образующих паренхиму легкого, то полученные данные свидетельствуют о принципиальной возможности присутствия малигнизированных клеток за пределами первичной опухоли – в ткани, визуально не вовлеченной в опухолевый процесс. Это может быть как следствием «расселения» опухолевых клеток из первичного очага в окружающую нормальную ткань органа, так и свидетельством наличия в нормальной ткани легкого фокусов трансформированных клеток – возможных предшественников опухолевого узла.

Независимо от причин описанного феномена гетерогенность экспрессии TUBB3 за пределами первичной опухоли указывает на информативность количественной оценки маркера для молекулярной диагностики локальной распространенности заболевания, что подтверждает правомочность сформулированной авторами гипотезы. Более того, исследование TUBB3 может стать важным молекулярным дополнением к морфологическому исследованию лимфатических узлов при стадировании опухолевого процесса.

И, наконец, полученные данные являются молекулярным подтверждением обоснованности радикализма хирургического вмешательства по поводу НМРЛ даже на начальных стадиях заболевания.

Исследование выполнено при поддержке РФФИ (№15-04-06991-а, 16-34-01049-мол-а) и гранта Президента РФ МК-7709.2016.7.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Nogales E. Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 2000;69:277–302. PMID:10966460.
- Leandro-García L.J., Leskelä S., Landa I. et al. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isotypes. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010;67(4):214–23. doi:10.1002/cm.20436. PMID: 20191564.
- Jakobsen J.N., Santoni-Rugiu E., Sørensen J.B. Use of TUBBIII for patient stratification and prognosis in lung cancer. *Lung Cancer Management* 2015;4(2): 97–110. doi:10.2217/lmt.15.6.
- Derry W.B., Wilson L., Khan I.A. et al. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* 1997;36(12):3554–62. PMID: 9132006.
- Carré M., André N., Carles G. et al. Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel. *J Biol Chem* 2002; 13;277(37):33664–9. Epub 2002 Jun 26. PMID: 12087096.
- Ludueña R.F. A Hypothesis on the Origin and Evolution of Tubulin. *Int Rev Cell Mol Biol* 2013;302:41–185. doi: 10.1016/B978-0-12-407699-0.00002-9. PMID: 23351710.
- McCarroll J.A., Gan P.P., Erlich R.B. et al. TUBB3/ β III-tubulin acts through the PTEN/AKT signaling axis to promote tumorigenesis and anoikis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2015;75(2):415–25. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2740. Epub 2014 Nov 20. PMID: 25414139.
- Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник московского университета, сер. 2. Химия* 2011;52(4): 305–12.

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ, ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК КЛЕТОК МЕЛАНОМНОЙ ЛИНИИ (*MEL 1BR*) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В РОСТОВОЙ СРЕДЕ С НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ

Л. Ф. Морозова¹, Н. М. Сураева¹, О. С. Бурова¹, Е. С. Воронина², М. А. Барышникова¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

Контакты: Сураева Наталья Михайловна nsuraeva@yandex.ru

Цель исследования — изучение изменения фенотипических и генетических характеристик клеток меланомы *Mel 1br* при культивировании в ростовой среде со сниженной концентрацией эмбриональной телячьей сыворотки до 5 %.

Материалы и методы. Клетки линии *Mel 1br* для селекции колоний веретеновидных клеток предварительно культивировали в среде RPMI-1640 с 5 % эмбриональной телячьей сыворотки в течение 3 пассажей, а затем рассеивали на чашки в дубликатах диаметром 60 мм в количестве 200–400 клеток на чашку Петри и оставляли в инкубаторе на 14 дней до образования колоний. Каждую из сформировавшихся колоний, состоящих из клеток веретеновидной формы, продолжали культивировать в тех же условиях на протяжении более 30 пассажей. Для исследования морфологии растущих клеток их окрашивали по методу Лейшмана. Экспрессию антигенов на клетках определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции.

Результаты. При культивировании клеток меланомной линии человека *Mel 1br* в ростовой среде со сниженным содержанием эмбриональной телячьей сыворотки до 5 % получен субклон, клетки которого сравнивали по морфологическим, иммунологическим и цитогенетическим характеристикам с клетками родительской линии. Клетки субклона отличались веретеновидной формой, значительно меньшим размером, большим ядром, занимающим практически весь объем цитоплазмы, и образованием в процессе роста колоний сфероидного типа, а также резким уменьшением HLA-DR⁺ клеток, уменьшением процентного содержания CD-54⁺ клеток, увеличением CD-63⁺ клеток и появлением CD-133⁺ клеток. Кариотип клеток субклона значительно отличался от кариотипа родительской популяции.

Выводы. В результате проведенных исследований выявлено, что клетки полученного субклона обладают признаками стволовых клеток и могут быть использованы в качестве модели для изучения опухолевой прогрессии.

Ключевые слова: сыворотка, клеточная линия меланомы, опухолевая стволовая клетка, субклон

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-19-23

CHANGES IN THE MORPHOLOGICAL, IMMUNOLOGICAL AND GENETIC CHARACTERISTICS OF *MEL 1BR* MELANOMA CELLS IN RESPONSE TO LOW CONCENTRATION OF EMBRYO CALF SERUM

L. F. Morozova¹, N. M. Suraeva¹, O. S. Burova¹, E. S. Voronina², M. A. Baryshnikova¹

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Research Center for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115478, Russia

Objective: the purpose of the study is research of the changes in phenotypic and genetic characteristics of melanoma cells *Mel 1br* cultured in growth medium with low concentration (5 %) of embryo calf serum.

Materials and methods. Cell line *Mel 1br* was pre-cultured in RPMI-1640 medium with 5 % FBS for 3 passages, and then 200–400 cells were replaced on the Petri dish with a diameter of 60 mm and left in the incubator for 14 days to form colonies. Colonies of spindle form cells were cultivated in the same conditions for more than 30 passages. Cells were stained according to the method of Leishman to investigate the morphology. The expression of antigens was determined in the reaction of indirect immunofluorescence.

Results. Exposure of *Mel 1br* human melanoma cells to low concentration of embryo calf serum resulted in the appearance of a subclone with morphological, immunological and cytogenetical characteristics differed to those of parental cells. The subclone cells distinguished

with spindle form, more small size, large nucleus which broadcasted on whole cytoplasm, formation spheroid and sharply reduced percentage of HLA-DR (+) and CD54 (+) cells, a significantly elevated percentage of CD63 (+) cells, and appearance of CD133 (+). The subclone karyotype differed to those of parental cells.

Conclusoin. The subclone cells were characterized by the same features as stem tumor cells and could be use as tumor progression model.

Key words: serum, melanoma cell line, tumor stem cell, subclone

Введение

Злокачественная опухоль представляет собой гетерогенную популяцию клеток на различных стадиях дифференцировки. Принято считать, что такая гетерогенность обусловлена генетическими и эпигенетическими отклонениями от нормы в популяциях опухолевых клеток [1]. Исследования по идентификации и изучению характеристик этих клеток позволили выдвинуть гипотезу существования стволовых опухолевых клеток, дающих начало опухолевому росту. Комплекс многообразных нарушений, происходящих в клетке в процессе опухолевой прогрессии, требует создания адекватной модели для исследования стадий онкогенеза. В настоящее время проводится анализ фенотипических и генетических свойств стволовых опухолевых клеток с использованием различных методов. Широко применяется скрининг поверхностных маркеров на разных этапах прогрессии с последующей оценкой эффективности пролиферации опухолевых клеток после имплантации животным. Изучается воздействие цитокинов и других биологически активных препаратов в культурах *in vitro* и экспериментах *in vivo* на опухолевый рост и прогрессию. Используются трансгенные нокаутные животные. Разрабатываются различные клеточные модели и другие технологии. И несмотря на весь этот спектр приемов, по-прежнему остается открытым вопрос об адекватности той или иной модели.

Нами также была предпринята попытка создать модель опухолевой стволовой клетки на основе культуры меланомных клеток человека после снижения концентрации телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС) в культуре до 5 % и с дальнейшей обработкой куриным эмбриональным экстрактом (КЭЭ) [2, 3]. В этих экспериментах показано, что после обработки экстрактом единичные выжившие клетки отличались от эпителиоподобных родительских своей веретеновидной формой, более интенсивным ростом и обладали сходством со стволовыми эмбриональными и опухолевыми клетками по морфологическим, ростовым и иммунологическим параметрам.

В процессе проведения указанных экспериментов мы обратили внимание на то, что снижение концентрации ТЭС при культивировании родительской линии также способствует образованию колоний веретеновидных клеток. С целью изучения данного феномена мы провели исследование фенотипических и генети-

ческих характеристик родительских меланомных клеток при культивировании в норме и в ростовой среде со сниженной концентрацией ТЭС в ростовой среде до 5 %.

Материалы и методы

В работе использовалась стабильно перевиваемая клеточная линия меланомы человека *Mel Ibr* (патент на изобретение Российской Федерации № 2287576 от 20.11.06 г.), полученная из опухолевого образца метастатического узла пациентки с диагнозом «диссеминированная меланома кожи» [2]. Клетки из посевого банка культивировали с 10 % ТЭС с добавлением 2 ммоль L-глутамин, 0,04 мг/мл гентамицина при температуре 37 °С в атмосфере 5 %-ного CO₂.

Клетки линии *Mel Ibr* для селекции колоний веретеновидных клеток предварительно культивировали в среде RPMI-1640 с 5 % ТЭС в течение 3 пассажей, а затем рассеивали на чашки в дубликатах диаметром 60 мм в количестве 200–400 клеток на чашку и оставляли в инкубаторе на 14 дней до образования колоний. Каждую из сформировавшихся колоний, состоящих из клеток веретеновидной формы, снимали раствором Версена, переносили в другие чашки и продолжали культивировать в тех же условиях на протяжении более 30 пассажей. Смену среды на свежую проводили 1 раз в 3 дня.

Для исследования морфологии растущих клеток их окрашивали по методу Лейшмана. Окрашенные клетки оценивали под световым микроскопом при увеличении ×100.

Экспрессию антигенов на клетках определяли в реакции непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител серии ICO [4] и Serotec. Тестировали экспрессию антигенов главного комплекса гистосовместимости I (HLA-ABC) и II (HLA-DR), меланоцитов (CD63), клеточной адгезии (CD54), стволовых опухолевых клеток (CD44, CD117, CD133), стволовой гемопоэтической клетки (CD34), рецептора эндотелиальных клеток (CD105), нелинейного антигена (CD-24), антигена эмбриональных стволовых клеток (Oct-4A, RnDSsystem). Реакцию учитывали на проточном цитофлуориметре.

Для кариологического исследования цитогенетические препараты готовили по стандартной методике [5]. Для каждой культуры анализировали не менее 15 метафаз. Анализ препаратов проводили согласно

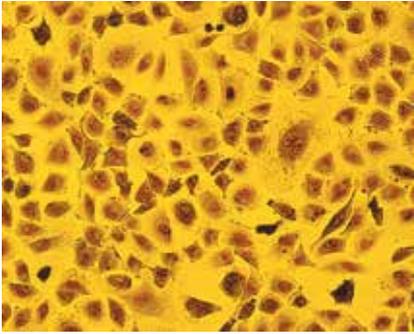


Рис. 1. Фиксированная и окрашенная по методу Лейшмана культура *Mel Ibr*, $\times 100$

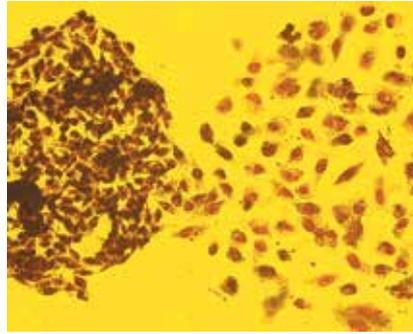


Рис. 2. Фиксированные и окрашенные по методу Лейшмана колонии 1-го типа веретеновидных (слева) и 2-го типа эпителиоподобных клеток линии *Mel Ibr*, $\times 100$

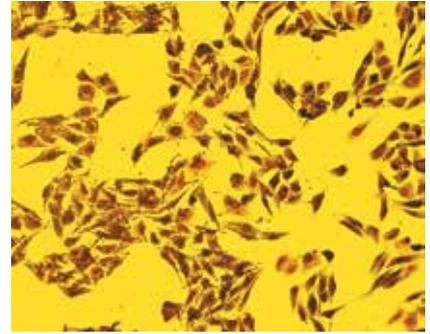


Рис. 3. Фиксированная и окрашенная по методу Лейшмана культура субклона *Mel Ibr*, 5×100

Международной цитогенетической номенклатуре хромосом человека (ISCN, 2005). Препараты анализировали под световым микроскопом при увеличении $\times 1000$.

Результаты и обсуждение

Клетки линии *Mel Ibr*, растущие в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % ТЭС, образовывали адгезионный монослой. Он был представлен преимущественно клетками эпителиоподобного вида с признаками низкой дифференцировки. Клетки в основной массе были неправильной округлой (эпителиоподобной) формы с полиморфными ядрами и обильно вакуолизированной, без четких контуров цитоплазмы. Среди них встречались отдельные клетки (0,5–1 %) вытянутой формы (рис. 1). При культивировании в среде RPMI-1640 с добавлением 5 % ТЭС в чашках диаметром 60 мм наблюдали незначительную гибель клеток. Выросшие в этих чашках колонии состояли из 3 типов клеток, различающихся своей морфологией. Первый тип был представлен веретеновидными клетками, второй – эпителиоподобными, а третий – клетками обоих типов (эпителиоподобными и веретеновидными) примерно в равной степени (рис. 2).

Мы обратили внимание на тот факт, что морфологически клетки 1-го типа были очень похожи на веретеновидные клетки ранее полученного нами субклона после воздействия КЭЭ на клетки меланомной линии человека *Mel Ibr* [2]. Поэтому для дальнейшего изучения и получения субклона под микроскопом были отобраны колонии 1-го типа. После 30 пассажей клетки оставались мономорфными и сохраняли свой иммунологический фенотип. Полученная субпопуляция клеток была обозначена нами как субклон *Mel Ibr 5C* (рис. 3). Действительно, клетки *Mel Ibr 5C* субклона так же, как и ранее полученный субклон с выявленными характеристиками стволовых опухолевых клеток [2], отличались от родительских значительно меньшим размером, большим ядром, занимающим практически весь объем цитоплазмы, длинными

вытянутыми отростками, более интенсивным ростом. Эти клетки росли плотным монослоем и обладали способностью формировать на поверхности монослоя выпуклые образования в виде сфероидов.

С целью дальнейшей характеристики полученного субклона *Mel Ibr 5C* было проведено исследование его иммунологического фенотипа и маркеров стволовых опухолевых клеток. Как видно из табл. 1, указанный фенотип субклона действительно отличался от исходных клеток *Mel Ibr*. В клетках субклона *Mel Ibr 5C* уменьшился процент HLA-DR⁺ клеток, CD95 и CD54⁺, на их поверхности появились антигены стволовых клеток CD133 (24,9 %), но не эмбриональный антиген

Таблица 1. Иммунологический фенотип клеток линии *Mel Ibr* и ее субклона *Mel Ibr 5C*

Маркеры	Количество положительных клеток по маркеру от общего числа клеток, %	
	Исходная линия <i>Mel Ibr</i> , 48-й пассаж	Субклон <i>Mel Ibr 5C</i> , 30-й пассаж
HLA-ABC	97,6 ± 2,0	99,6 ± 0,4
HLA-DR	87,9 ± 2,0	10,2 ± 2,0
CD24	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1
CD34	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1
CD44	99,2 ± 0,5	99,9 ± 0,5
CD133	1,6 ± 1,0	24,9 ± 1,0
CD117	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,5
CD105	95,4 ± 2,0	92,4 ± 10,0
CD63	20,0 ± 3,0	92,4 ± 10,0
CD54	93,1 ± 5,0	24,9 ± 1,0
CD 95	70,0 ± 5,0	10,0 ± 2,0
CD117	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,1
Oct-4A	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1

Таблица 2. Кариотип клеток исходной линии *Mel Ibr* и субклона *Mel Ibr 5C*

Клетки	Кариотип
Mel Ibr – линия	71 87 <4n->,XX,add(X)(q28),del(1)(q12),+7,+7,+7,i(21)(q10), inc.
Mel Ibr C – субклон	92 100<4n+>,XXX,-X,del(6)(p21),?der(6)del(6)(12)dup(6)(q?q?),der(9)t(1;9)(q12;p21), inc.

Ost-4A, повысился процент CD63⁺ клеток и не изменилось число клеток, экспрессирующих антигены HLA-ABC и CD24, CD34, CD44, CD117 и CD105. Похожее отличие по сравнению с родительской линией, за исключением Ost-4A маркера, наблюдались и у ранее полученного субклона [2].

Цитогенетическое исследование показало, что клетки субклона *Mel Ibr 5C* отличаются по кариотипу от популяции клеток исходной линии *Mel Ibr*. Данные представлены в табл. 2.

При анализе 15 метафаз клеток линии *Mel Ibr* выявлено, что число хромосом колеблется от 71 до 87. Модальное число хромосом соответствует гипертетраплоидному набору (4n). Популяция клеток культуры характеризуется увеличенным количеством хромосом 7, их число в клетках колеблется от 4 до 7. Кариотип не соответствует стандартному набору не только по числу хромосом, но и по их структуре. Во всех клетках обнаружен дополнительный хромосомный материал неизвестного происхождения на длинном плече X-хромосомы. Наблюдаются две различные делетированные хромосомы 1, в одном случае имеет место делеция практически всего плеча (p21-pter), а в другом – (q12-qter). Присутствует изохромосома, образованная двумя длинными плечами хромосомы 21.

Определение кариотипа клеток субклона *Mel Ibr 5C* строилось на анализе 25 метафаз. Установлено, что число хромосом колеблется от 92 до 100. Модальное число хромосом соответствует гипертетраплоидному набору (4n+). Обнаружены структурные перестройки: дериватная хромосома 9, образованная транслокацией хромосом 1 и 9; делеция короткого плеча хромосомы 6 (p21-pter), а также, возможно, дериватная хромосома 6, образовавшаяся в результате терминальной делеции короткого плеча (p21-pter) и дубликацией части длинного плеча хромосомы 6. Имели место и другие перестройки, которые возможно было идентифицировать с помощью молекулярно-цитогенетических методов.

В исходной культуре *Mel Ibr* наблюдается одно из характерных для меланомы нарушений: увеличе-

ние числа хромосом 7. На коротком плече хромосомы 7 в районе 7p12.3-p12.1 расположен ген рецептора эпидермального фактора роста, который может вызывать или усиливать злокачественную трансформацию клеток при меланоме. Кроме того, экспрессия этого гена повышена в метастазах.

В клетках субклона *Mel Ibr 5C* общее количество хромосом больше (гипертетраплоидный набор), однако относительное количество хромосом 7 нормальное. В этой культуре наблюдается другое характерное хромосомное нарушение: перестройка, затрагивающая локус p21 хромосомы 9, в котором расположен ген-супрессор опухоли CDKN2A (p16), играющий важную роль при многих злокачественных новообразованиях (он кодирует белок, участвующий в регуляции клеточного цикла и клеточного старения).

Таким образом, выявленные хромосомные нарушения в популяции клеточной линии *Mel Ibr* и клетках субклона *Mel Ibr 5C* полностью различны.

Выводы

На основании полученных данных можно предположить, что в исходной популяции линии *Mel Ibr* присутствует небольшое число клеток с веретеновидной морфологией, утративших антигены гистосовместимости II класса (HLA-DR) и имеющих антиген стволовых клеток-CD133 (но не Ost-4A). В условиях роста клеток *Mel Ibr* в среде со сниженной концентрацией ТЭС до 5 % и в результате отбора колоний из клеток веретеновидной формы и дальнейшего их культивирования на протяжении длительного времени произошла селекция форм с признаками стволовых клеток. Потомки этих клеток имеют пролиферативное преимущество по сравнению с клетками родительской линии и могут, возможно, представлять собой метастазирующий клон. Дальнейшее изучение полученного субклона *Mel Ibr 5C* как модели меланомных клеток с характеристиками стволовых клеток позволит определить их роль в опухолевой прогрессии.

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

1. Геращенко Т.С., Денисов Е.В., Литвяков Н.В. и др. Внутриопухолевая гетерогенность: природа и биологическое значение. *Биохимия* 2013;78(11):1531–49.
2. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самойлов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (MEL 1BR) в результате воздействия куриного эмбрионального экстракта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(4):521–4.
3. Сураева Н.М., Самойлов А.В. Получение фармацевтических белков с помощью трансгенной птицы. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2009;20(4):19–25.
4. Барышников А.Ю. Моноклональные антитела серии ИКО к дифференцировочным антигенам лимфоцитов человека. *Гематология и трансфузиология* 1990;8:4–7.
5. Short protocols in human genetics: a compendium of methods from current protocols in human genetics. N.C. Dracopoli et al. (eds.). New York: Wiley, 2004.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ОРМУСТИНА НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ ЛЕЙКОЗАХ МЫШЕЙ

Н.С. Сапрыкина¹, Л.М. Борисова¹, М.П. Киселева¹, З.С. Смирнова¹, В.П. Краснов², Г.Л. Левит²,
В.В. Мусияк², М.А. Барышникова¹, В.М. Бухман¹, З.С. Шпрах¹, М.М. Давыдов¹

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБУН «Институт органического синтеза им. И.Я. Постовского» УрО РАН;
Россия, 620990, Екатеринбург, ул. С. Ковалевской, 22

Контакты: Сапрыкина Нина Семеновна Saprikina.nin@yandex.ru

Цель исследования — изучить *in vivo* противоопухолевую активность лекарственной формы нового препарата из класса нитроалкилмочевин «Ормустина» (алкилнитрозокарбамоил производного аминокислоты L-орнитин) на мышях с перевиваемыми лимфолейкозами.

Материалы и методы. Оценку потенциальной противоопухолевой активности ормустина проводили на мышях B6D2F1 с асцитными (L1210, L1210 / араноза, L1210 / нитруллин и P388) и солидными (P388) формами лимфолейкозов. В работе были использованы препараты из группы производных нитроалкилмочевины: ормустин, араноза и лизомустин. Лечение животных начинали через 24 ч после прививки лейкозов внутрибрюшинно и через 48 ч после прививки P388 подкожно. Препараты в широком диапазоне доз вводили мышам однократно внутривенно. Наблюдение за животными продолжали до их гибели. Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили увеличение продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными и их излечение.

Результаты Исследована противоопухолевая активность нового препарата класса нитроалкилмочевин «Ормустин». Влияние ормустина изучено *in vivo* на рост перевиваемых штаммов лимфолейкозов мышей: L1210 (асцитный вариант) и P388 (асцитный и солидный варианты). Препарат эффективно ингибировал рост экспериментальных лейкозов, вызывая излечение значительной части мышей с лимфолейкозами. На L1210 и P388 установлена терапевтическая доза ормустина (125 мг / кг) при однократном внутривенном его введении.

Выводы. Выявленная активность характеризует ормустин как потенциальный противоопухолевый препарат.

Ключевые слова: ормустин, нитроалкилмочевины, противоопухолевые препараты, перевиваемые лимфолейкозы мышей

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-24-31

ANTITUMOR ACTIVITY OF ORMUSTINE AGAINST TRANSPLANTED LEUKEMIA IN MICE

N.S. Saprykina¹, L.M. Borisova¹, M.P. Kiseleva¹, Z.S. Smirnova¹, V.P. Krasnov², G.L. Levit²,
V.V. Musiyak², M.A. Baryshnikova¹, V.M. Bukhman¹, Z.S. Shprakh¹, M.M. Davydov¹

¹N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch, Russian Academy of Sciences;
22 S. Kovalevskaya St., Ekaterinburg, 620041, Russia

Objective: Evaluation of antitumor activity of a novel alkylnitrosoureas derivative Ormustine (an alkylnitrosocarbamoyl L-ornithine) in mouse lymphoid leukemia models.

Materials and methods. Antitumor activity of Ormustine has been evaluated in B6D2F1 mice with ascites form of leukemia (L1210, L1210/arenosa, L1210/citrullin and P388) and the solid (P388) form. In this study we used preparations from the alkylnitrosourea group: Ormustine, Aranoza and Lizomustine. Treatment of animals was started 24 hours after inoculation of leukemia intraperitoneally, and 48 hours after inoculation subcutaneous P388.

Drugs in a wide range of doses were administrated once intravenously. The follow up period of the animals continued until their death. Criteria of antitumor effect were increasing life expectancy and cure. Evaluation criteria of antitumor effect was the increase in life of experimental mice compared to control ones.

Results. Antitumor activity of a novel alkylnitrosoureas derivative, Ormustine has been studied *in vivo* on the growth of transplanted lymphoid leukemia, such as L1210 (ascites version) and P388 (ascites and solid tumor). Effective dose of single intravenous injection Ormustine against lymphoid leukemia L1210 and P388 was 125 mg/kg.

The drug effectively inhibited growth of experimental leukemia. The significant part of the mice with limfoleukemia has been cured. We have also established the single intravenous therapeutic dose of Ormustine on L1210 and P388 leukemia — 125 mg/kg of body weight.

Conclusion. The data obtained characterizes Ormustin as a promising anticancer drug.

Key words: Ormustine, alkylnitrosoureas, antitumor drugs, transplanted murine leukemia

Введение

Производные нитрозоалкилмочевины (НАМ) — одна из наиболее высокоэффективных групп противоопухолевых препаратов, однако низкая избирательность и высокая отсроченная и кумулятивная токсичность значительно лимитируют их эффективность. Поэтому столь актуально введение в арсенал противоопухолевых средств новых производных НАМ, менее токсичных и действующих более избирательно [1, 2]. Поиск новых противоопухолевых препаратов из класса НАМ перспективен, так как для этих соединений характерны широкий спектр противоопухолевой активности, различия в молекулярных механизмах действия у близких по структуре соединений и отсутствие полной перекрестной устойчивости с алкилирующими соединениями [3, 4].

Известно, что при развитии опухолевого процесса увеличивается содержание аминокислот в опухоли и возрастает скорость их проникновения через клеточные мембраны [1, 5]. Данный факт позволил обосновать рациональность использования остатков аминокислот и олигопептидов в качестве молекул-носителей цитотоксических фрагментов для создания соединений с высокой избирательностью действия [1].

В Институте органического синтеза им. И.Я. Попова УрО РАН разработаны оригинальные методы синтеза большой группы алкилнитрозокарбамоил-производных аминокислот, в которых цитотоксическая N-алкил-N-нитрозомочевинная группировка находится в боковой цепи аминокислоты,

а α-амино- и карбоксильная группы, определяющие основные биохимические свойства аминокислот и являющиеся важными для активного транспорта через клеточные мембраны, сохранены [1, 6, 7]. При разложении таких соединений *in vivo* возможно образование не только характерных для биологического действия НАМ алкилирующих и карбамоилирующих частиц, но и производных α-аминокислот — потенциальных антиметаболитов, за счет чего можно ожидать расширения спектра их противоопухолевой активности по сравнению с известными НАМ [1]. Указанная группа соединений имеет большой потенциал для создания высокоэффективных противоопухолевых агентов, так как у многих синтезированных веществ выявлено наличие более высокой специфической активности по сравнению с применяемыми в клинике препаратами группы нитрозомочевин. На основе 2-хлорэтилнитрозоуреидопроизводного аминокислоты L-лизина был создан отечественный противоопухолевый препарат «Лизомустин» (рис. 1), который разрешен к медицинскому применению для лечения злокачественной меланомы и мелкоклеточного рака легкого, хорошо переносится, обладает антиметастатическим действием [3, 8–10]. Не менее перспективен в плане создания нового противоопухолевого средства его близкий аналог, получивший название «Ормустин» (рис. 1) [10].

Ормустин представляет собой смесь изомеров положения нитрозогруппы: N^δ-нитрозо-N^δ-[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина (изомер 1) и N^δ-[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина (изомер 2)

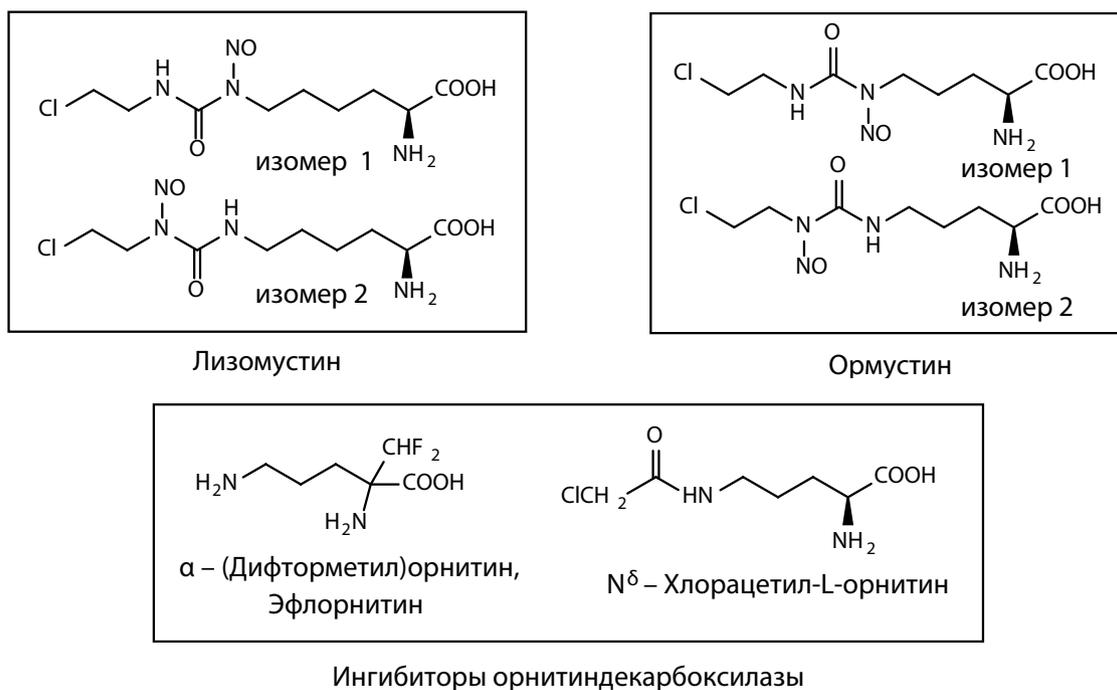


Рис. 1. Структура лизомустина, ормустина и ингибиторов орнитиндекарбоксилазы

нитрозо-N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитина (изомер 2). При развитии опухоли усиливается метаболизм полиаминов, а непротеиногенная аминокислота орнитин является основным источником синтеза полиаминов [11–14]. Следовательно, можно предположить, что использование L-орнитина в качестве молекулы-носителя может не только повысить избирательность доставки цитотоксической группировки в опухолевые клетки, но и воздействовать на их метаболизм [11, 15, 16], тем более что производное орнитина α -(дифторметил)орнитин (DFMO, эфлорнитин) вошло в клиническую практику как противопаразитарное средство против *Trypanosoma brucei gambiense* (West African Sleeping Sickness) [17]. Но первоначально DFMO рассматривался как потенциальное противоопухолевое средство, так как он необратимо ингибирует орнитиндекарбоксилазу (высоко активный в опухолевых клетках ключевой фермент синтеза полиаминов) [17]. Было установлено, что DFMO оказывает антипролиферативное действие на некоторые опухоли человека, имеет проапоптотические, антиинвазивные и антиметастические свойства [16, 18]. Как правило, DFMO обладает обратимым цитостатическим действием. При монотерапии его противоопухолевые эффекты незначительны, и на II фазе клинических испытаний он был признан недостаточно активным [19]. Несмотря на это, исследования DFMO в онкологии продолжаются, так как у него выявлен значительный потенциал для химиопрофилактики опухолевых заболеваний, основанный на его способности в малых дозах, которые нетоксичны при длительном использовании, понижать уровни полиаминов в слизистой оболочке толстого кишечника [17, 19].

Недавно М. М. Medina-Enríquez и соавт. показали, что другой ингибитор орнитиндекарбоксилазы N^δ-хлорацетил-L-орнитин (рис. 1) селективно тормозит рост клеток опухолей человека по сравнению с нормальными клетками и вызывает их гибель [20]. Кроме того, возможно, производные L-орнитина будут эффективны в существенно меньших дозах, так как данные ряда исследований указывают на то, что ингибирование синтеза полиаминов сопровождается повышением чувствительности клеток к действию нитрозомочевин BCNU (1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевина), ACNU (1-(4-амино-2-метилпиримидин-5-ил)метил-3-(2-хлорэтил)-3-нитрозомочевина) и CCNU (1-(2-хлорэтил)-3-циклогексил-1-нитрозомочевина) [15, 21–23].

Ранее была выявлена высокая противоопухолевая активность фармацевтической субстанции ормустина *in vitro* на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека *Mel Kor* и T-лимфобластного лейкоза человека *Jurkat* и *in vivo* на перевиваемых опухолях мышей LLC, B-16 и лимфолейкозе P388 [24]. При сравнении на линии клеток меланомы человека *Mel Z*

цитотоксического действия различных лекарственных форм ормустина (синоним OR-2011) и разрешенных для клинического применения производных НАМ (араноза и лизомустин) было выявлено, что наиболее активным является ормустин [25].

Цель наших исследований состояла в оценке *in vivo* противоопухолевой активности лекарственной формы ормустина — «Ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» — на мышцах с перевиваемыми лимфолейкозами.

Материалы и методы

В работе были использованы мыши-гибриды первого поколения (C57Bl/6 × DBA/2) F1 (B6D2F1) массой 18–25 г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Мыши содержались в экспериментально-биологической лаборатории (виварий) ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на брикетированном корме, с постоянным доступом к воде и в помещении с дневным освещением и контролем температуры и влажности воздуха.

Все экспериментальные процедуры с мышами проводились в соответствии с принятыми в ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России правилами работы с животными, которые соответствуют международным и российским нормам.

Штаммы опухолей лимфолейкоз L1210 и лимфолейкоз P388 были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Штаммы сублиний лимфолейкоза L1210 с индуцированной устойчивостью к аранозе (L1210/араноза) или нитруллину (новое название — «Лизомустин») (L1210/нитруллин) были получены Н.М. Перетолчиной в НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (ЭДиТО) ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и любезно предоставлены автором для проведения данного исследования. Субштаммы L1210/араноза и L1210/нитруллин описаны и охарактеризованы в ряде публикаций [3, 26–27]. Штаммы перевиваемых опухолей поддерживались *in vivo* на мышцах линии D2. В опытах использовались 2–10-й пассажи.

Оценку потенциальной противоопухолевой активности ормустина проводили на мышцах B6D2F1 с асцитными (L1210, L1210/араноза, L1210/нитруллин и P388) и солидными (P388) формами лимфолейкозов. Опухоли перевивали лабораторным животным по стандартным методикам [17]. Затем методом случайного выбора формировали контрольную (8–12 животных) и опытные группы (по 6–8 мышей).

В работе были использованы препараты из группы производных НАМ:

— «Ормустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» (лекарственная форма

создана в лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [28]);

– «Араноза лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 500 мг» производства филиала «Накопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

– «Лизомустин лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 0,1 г» производства ООО «Компания «Деко»» (Москва).

Растворы препаратов в глюкозе (декстроза 5 % раствор для инфузий производства ООО «МОСФАРМ», Россия) готовили *ex tempore*.

Лечение мышей начинали через 24 ч после прививки лейкозов внутрибрюшинно и через 48 ч после прививки Р388 подкожно согласно «Методическим рекомендациям по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств» [17]. Препараты в широком диапазоне доз вводили мышам с лимфолейкозами однократно внутривенно (в вену хвоста по 0,1–0,35 мл раствора / мышь), т. е. в соответствии с режимом, который применяется в клинической практике для данной группы противоопухолевых соединений [2]. В ряде экспериментов параллельно определяли влияние растворителя на рост перевиваемых опухолей: всем мышам из этой группы в том же режиме (однократно внутривенно) вводили 5 % раствор глюкозы в объеме, равном максимальному объему (0,2–0,35 мл) раствора препарата, который был инъецирован животному, леченному максимальной для данного опыта дозой ормустина.

Критериями оценки количества асцитной жидкости и внутрибрюшинных опухолевых узлов при асцитной форме лимфолейкоза Р388 являлись:

– количество асцита: 1,0–1,5 мл+++; 0,5–1,0 мл++ и 0,1–0,5 мл+;

– масса опухолевых узлов: 1,5–2,5 г+++; 1,0–1,5 г++ и 0,5–1,0 г+.

Наблюдение за животными продолжали до их гибели.

Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) опытных мышей в сравнении с контрольными и их излечение.

Увеличение продолжительности жизни вычисляли по формуле

$$\text{УПЖ} = [(\text{СПЖ}_0 - \text{СПЖ}_x) / \text{СПЖ}_x] \times 100,$$

где СПЖ_x и СПЖ_0 – средняя продолжительность жизни животных в днях в контрольной и опытной группах, соответственно. Минимальным критерием активности является УПЖ 50 % и более [29]. СПЖ и УПЖ рассчитывали только для животных, проживших менее 90 дней.

Излеченными считали мышей, которые прожили 90 дней после прививки им опухоли и у которых при вскрытии не выявлено признаков опухолевого процесса [29].

Критериями оценки противоопухолевого эффекта препарата также служили объем асцитной жидкости и масса внутрибрюшинных опухолевых узлов при асцитном варианте лимфолейкоза.

Токсичность препаратов оценивали по гибели мышей в опытной группе по сравнению с гибелью животных в контрольной группе и макроскопической картине внутренних органов, а также по снижению массы тела более чем на 20 %.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Excel, Statistica v. 6.0; использовали t- и непараметрический критерий Колмогорова – Смирнова. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ прогностической значимости используемых для скрининга моделей показал, что, несмотря на ряд ограничений, перевиваемые лимфолейкозы L1210 и Р388 мышей, дополненные другими *in vivo* и *in vitro* моделями, позволяют выявлять большинство потенциально эффективных препаратов для лечения онкологических больных. Поэтому они продолжают оставаться значимыми для скрининга потенциальных противоопухолевых соединений [30, 31].

Оценку противоопухолевой активности ормустина проводили на мышах В6D2F1 с асцитными вариантами лимфолейкозов Р388 и L1210 (чувствительного и субштаммов с индуцированной устойчивостью: L1210/араноза, L1210/нитруллин) и солидной формой Р388.

Была выявлена высокая противоопухолевая активность ормустина при лечении мышей с перевиваемыми лимфолейкозами (табл. 1–4). Как видно из табл. 1, однократное внутривенное введение ормустина в диапазоне доз от 50 до 175 мг/кг мышам-самкам В6D2F1 с лимфолейкозом L-1210 вызывало не только высокое дозозависимое увеличение продолжительности их жизни, но и привело к излечению части животных. Так, если в дозе 50 мг / кг ормустин вызывал только УПЖ на 70 %, то при дозах препарата 100–125 мг/кг выявлено и сильное УПЖ (242–346 %), и излечение большей части (50–67 %) мышей. В более высоких (135–175 мг/кг) дозах ормустина вызывал хотя и значительное излечение (в 44–75 % случаев) мышей с лимфолейкозом L-1210, но и их гибель в 22–25 % случаев, т. е. выявленный на этой модели опухоли интервал терапевтических доз ормустина является узким (табл. 1).

Аналогичные результаты были получены и при исследовании влияния ормустина в широком диапазоне

Таблица 1. Зависимость противоопухолевого эффекта ормустина от дозы при однократном внутривенном введении препарата мышам с L-1210

Группа	Доза, мг/кг	СПЖ, дни	УПЖ, %*	Излечение**	Гибель от токсичности***	Асцит	Узлы
Контроль	—	7,1 ± 1,1	—	—	—	+	++
5% раствор глюкозы	0,2 мл	7,3 ± 1,4	3	0/8	0/8	+	++
Ормустин	50	12,1 ± 1,4	70	0/8	0/8	+	++
	100	24,3 ± 9,0	242	4/8 (50)*	0/8	+	++
	125	31,7 ± 13,3	346	6/9 (67)*	0/9	++	++
	135	—	—	6/9 (67)*	2/9 (22)	++	++
	150	—	—	4/9 (44)*	2/9 (22)	++	++
	175	—	—	—	6/8 (75)*	2/8 (25)	0

* $p < 0,05$ (достоверность различий с контрольной группой — t -критерий);

**в числителе дано число излеченных мышей, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент излеченных животных;

***в числителе дано число погибших мышей от токсичности, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент погибших животных.

Здесь и в табл. 2: СПЖ — средняя продолжительность жизни животных, УПЖ — увеличение продолжительности жизни животных.

Таблица 2. Зависимость противоопухолевого эффекта ормустина от дозы при однократном внутривенном введении препарата мышам с P388 (асцитный вариант)

Группа	Доза, мг/кг	СПЖ, дни	УПЖ, %*	Излечение**	Гибель от токсичности***	Асцит	Узлы
Контроль	—	9,7 ± 1,0	—	—	—	+++	+++
5% раствор глюкозы	0,35 мл	9,9 ± 2,1	3	0/9	0/9	+++	+++
Ормустин	50	18,2 ± 1,8	90	0/9	0/9	++	++
	100	26,7 ± 6,7	178	2/9 (22)	0/9	++	++
	125	26,3 ± 2,7	174	3/9 (33)*	0/9	++	++
	135	26,4 ± 4,0	175	3/9 (33)*	1/9 (10)	++	++
	150	25,4 ± 2,9	165	2/8 (25)*	2/8 (25)	++	++
	175	38,0 ± 3,3	186	3/9 (33)*	2/9 (22)	++	++

* $p < 0,05$ (достоверность различий с контрольной группой — t -критерий);

**в числителе дано число излеченных мышей, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент излеченных животных;

***в числителе дано число погибших мышей от токсичности, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент погибших животных.

Таблица 3. Изменение массы тела мышей с P388 (асцитный вариант) после однократного введения ормустина

Доза, мг/кг	Масса тела**, г			Гибель от токсичности***
	исходная	после лечения		
		на 6-й день	на 8-й день	
Контроль	19,7 ± 1,4	21,0 ± 1,5	19,9 ± 2,2	0/9
50	21,4 ± 1,9	20,0 ± 1,0	20,8 ± 1,0	0/9
100	20,1 ± 0,6	19,7 ± 0,8	19,7 ± 0,8	0/9
125	19,0 ± 1,3	19,0 ± 1,3	19,0 ± 0,8	0/9
135	18,5 ± 1,1	16,4 ± 1,2 (13)	18,5 ± 1,3	1/9 (10)
150	21,1 ± 1,6	16,4 ± 1,8 (22)*	17,6 ± 2,2	2/8 (25)
175	19,9 ± 0,7	15,1 ± 1,1 (24)*	17,2 ± 1,7	2/9 (22)

* $p < 0,05$ (достоверность различий с контрольной группой — t -критерий)

**уменьшение средней массы тела мышей в группе по отношению к исходной средней массе тела, в скобках указано в процентах;

***в числителе дано число погибших мышей от токсичности, в знаменателе — общее число животных в группе, в скобках — процент погибших животных.

Таблица 4. Зависимость противоопухолевого эффекта ормустина от дозы при однократном внутривенном введении препарата мышам с P388 (солидный вариант)

Группа	Доза, мг/кг	СПЖ, дни	УПЖ, %*	Излечение**	Гибель от токсичности***
Контроль	–	17,5 ± 1,7	–	–	–
Ормустин	75	37,2 ± 10,5*	112	1/7 (14)	0/7
	100	44,8 ± 9,0*	156	3/7 (43)	0/7
	125	40	–	6/7 (86)	0/7

* $p \leq 0,05$ (достоверность различий с контрольной группой по критерию Колмогорова–Смирнова);

** в числителе дано число излеченных мышей, в знаменателе – общее число животных в группе, в скобках – процент излеченных животных;

*** в числителе дано число погибших от токсичности мышей, в знаменателе – общее число животных в группе.

доз (от 50 до 175 мг / кг) на рост лимфолейкоза P388, привитого мышам-самкам B6D2F1 (C57Bl/6 x DBA/2) внутрибрюшинно (табл. 2). Как и в случае с лимфолейкозом L-1210, была выявлена зависимость терапевтического эффекта от дозы препарата: в более низкой дозе (50 мг / кг) отмечено только УПЖ на 90 %, в дозах 100–125 мг/кг – высокий уровень УПЖ и излечение значительной части мышей. Высокая противоопухолевая активность ормустина в дозах 135 мг/кг и выше сопровождалась дозозависимой гибелью животных с признаками токсического действия препарата (табл. 2 и 3).

Проявления токсического действия ормустина оценивались при сравнении сроков гибели животных и динамики изменения средних масс тела мышей в контрольной и опытных группах (табл. 1–3). Данные, представленные в табл. 3, показывают, что однократное внутривенное введение мышам с асцитным вариантом P388 ормустина в дозах 50–125 мг/кг не вызывало более ранней, чем в контрольной группе, гибели животных, а изменения средней массы тела в этих группах были практически сходными с таковыми в контрольной группе. Масса тела мышей с P388 при внутривенном однократном введении ормустина в дозе 135 мг/кг, вызывающей гибель 10 % животных, упала на 6-й день наблюдения на 2,1 г, а к 8-му дню восстановилась. Ормустин в дозах 150 мг/кг и выше имел выраженное токсическое действие: в 22–25 % случаев более ранняя, чем в контрольной группе, гибель мышей, резкое падение средней массы тела на 4,6–4,8 г (22–24 % по сравнению с исходной) к 6-му дню после окончания введения препарата и постепенное ее увеличение к 8-му дню.

Таким образом, при однократном внутривенном введении ормустина мышам с перевиваемыми асцитными лимфолейкозами доза 125 мг/кг является терапевтической, 135 мг/кг – максимально переносимой (LD_{10}), а 150 мг/кг – летальной (LD_{25}).

Ормустин проявил высокий противоопухолевый эффект и при лечении мышей-самцов B6D2F1 с лимфолейкозом P388 (солидный вариант). При введении препарата также показана зависимость продолжи-

тельности жизни опытных мышей от дозы препарата (табл. 4). В контрольной группе у всех животных развились подкожные опухолевые узлы, и к 20-м сут опыта все мыши погибли при явлениях генерализованного опухолевого процесса. При этом не представилось возможным оценить активность препарата при сравнении средних объемов подкожных опухолевых узлов в контрольной и опытных группах, так как ормустин не только значительно увеличивал латентное время развития опухоли, но и сдерживал развитие опухолевых узлов у значительной части мышей в опытных группах в течение 90 дней наблюдения. Эти мыши считались излеченными [29].

Так как для препаратов из группы производных НАМ показано достаточно быстрое развитие резистентности к их действию и отсутствие полной перекрестной устойчивости, особый интерес вызывает способность новых соединений преодолевать подобные осложнения [3, 26, 27]. Было исследовано противоопухолевое действие ормустина на мышах-самцах BDF1 с перевиваемым лимфолейкозом L-1210 с индуцированной устойчивостью к аранозе (L-1210/араноза) и L-1210, нарабатанной устойчивостью к лизомустину (L-1210 / нитруллин), которые имеют различные механизмы устойчивости [26].

В условиях организма для НАМ характерна реакция гидролитического распада с образованием алкилирующих и карбамоилирующих частиц. Взаимодействие этих частиц с макромолекулами, такими как ДНК, РНК, ДНК- и РНК-полимеразы, цитоплазматические и ядерные белки, белковые компоненты клеточных мембран, обуславливают молекулярные механизмы биологического действия НАМ. Результаты многих исследований свидетельствуют о том, что образование в ДНК аддуктов O^6 -алкилгуанина и длительность существования этой модификации в значительной степени определяют цитотоксичность НАМ [30].

ДНК-репарирующий акцепторный белок O^6 -алкилгуанин-ДНК алкилтрансфераза (O^6 -метилгуанин-ДНК метилтрансфераза, MGMT; EC 2.1.1.63) репарирует аддукты O^6 -алкилгуанина в ДНК, и уровень его активности коррелирует с чувствительностью

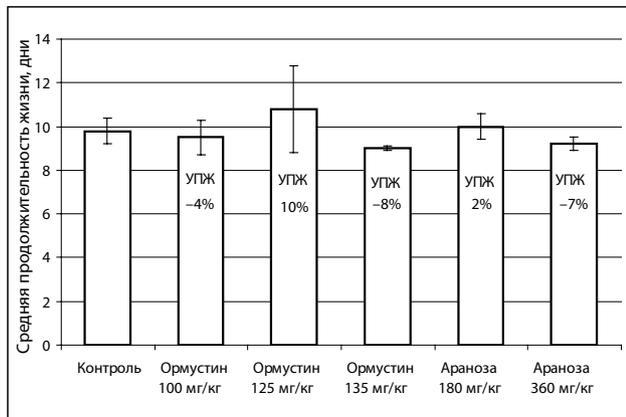


Рис. 2. Влияние ормустина на продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом L1210/араноза

клеток к цитотоксическому действию НАМ. Существует множество экспериментальных и клинических данных о том, что высокий уровень экспрессии MGMT в клетках опухоли приводит к резистентности химиотерапии НАМ [4].

Было выявлено значительное увеличение уровня MGMT в субштамме L-1210 / араноза по сравнению с чувствительным штаммом L-1210, которое, по-видимому, играет существенную роль в возникновении индуцированной устойчивости к аранозе [9].

Но существенных различий в уровнях MGMT в клетках чувствительного штамма L-1210 и клетках субштамма L-1210 / нитруллин не выявлено, и было признано маловероятным, что эти различия ответственны за возникновение устойчивости к нитруллину [26]. В клетках субштамма L-1210/нитруллин было обнаружено менее глубокое, чем в клетках чувствительного штамма L-1210, ингибирование и существенно более быстрое восстановление синтеза ДНК и РНК, повышение активности основного фермента репарации ДНК полимеразы β , увеличение уровня SH-групп. Такие различия в скорости репарации повреждений ДНК и могут обуславливать возникновение лекарственной устойчивости к нитруллину [26].

Араноза, которая обладает высоким противоопухолевым эффектом при лечении мышей с чувствительным штаммом L-1210 [2], ни в дозе 180 мг/кг (1/2 максимальной переносимой дозы, МПД), ни в дозе 360 мг/кг (близкой к МПД) не увеличивала продолжительности жизни мышей с L-1210/араноза (рис. 2). Ормустин в дозах 100–135 мг/кг также не проявил противоопухолевой активности у мышей с L-1210/араноза (рис. 1).

Лизомустин, который обладает высоким противоопухолевым эффектом при лечении мышей с чувствительным штаммом L-1210 [3, 26], ни в дозе 80 мг/кг (доза, которая была использована при индукции устойчивости [12]), ни в МПД (150 мг/кг) не оказал влияния на продолжительность жизни мышей

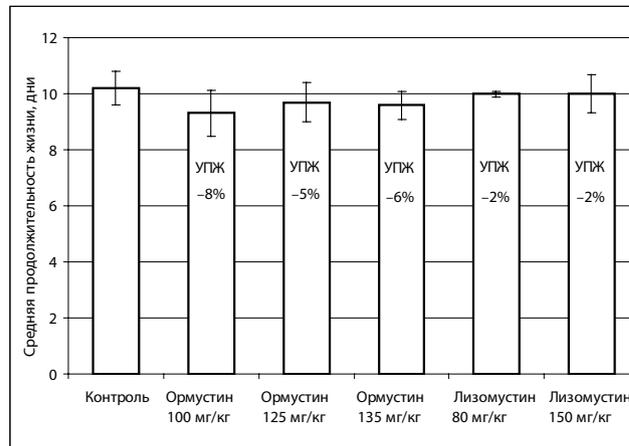


Рис. 3. Влияние ормустина на продолжительность жизни мышей с лимфолейкозом L1210/нитруллин

с L-1210/нитруллин (рис. 3). Ормустин в дозах 100–135 мг/кг также не проявил противоопухолевой активности у мышей с L-1210 / нитруллин.

Таким образом, ормустин в изученных дозах и режиме введения не проявил противоопухолевой активности при лечении мышей с лейкозами с индуцированной устойчивостью к аранозе или лизомустину. Ранее было показано [3, 26, 27], что противоопухолевое действие лизомустина на этих субштаммах тоже невысоко (отсутствие такового при L1210/нитруллин, а при L1210 / араноза – только незначительное УПЖ) [3]. Возможно, что такое снижение эффективности лизомустина на этом субштамме (по сравнению с чувствительным штаммом L1210) обусловлено высоким уровнем экспрессии MGMT в L1210 / араноза [26].

Полученные результаты позволяют предположить, что механизмы развития лекарственной устойчивости к ормустину и лизомустину сходны.

Заключение

Проведенные исследования показали высокую дозозависимую противоопухолевую активность ормустина на асцитных формах лимфолейкозов L1210 и P388 с излечением мышей в 67 и 33 % случаев соответственно. Ормустин проявляет еще более высокий противоопухолевый эффект при лечении мышей с солидной формой лимфолейкоза P388 – излечение наблюдается в 86 % случаев. Кроме того, на L1210 и P388 установлена терапевтическая доза ормустина, которая составляет 125 мг/кг при однократном внутривенном его введении.

Однако выявлена перекрестная устойчивость ормустина на мышцах с перевиваемым лимфолейкозом L1210 с индуцированной устойчивостью к аранозе (L1210/араноза) и L1210 с наработанной устойчивостью к лизомустину (L-1210/нитруллин), которые обладают разным механизмом устойчивости.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Краснов В.П., Чупахин О.Н., Левит Г.Л. и др. Химические аспекты создания оригинального противоопухолевого препарата лизомустин. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003:135–46.
2. Переводчикова Н.И. Клинико-фармакологическая характеристика противоопухолевых средств. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой и В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015:37–48.
3. Перетолчина Н.М., Герасимова Г.К., Белоусова А. К., Барышников А.Ю. Доклиническое изучение противоопухолевой активности и механизма действия лизомустина. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003: 147–60.
4. Сыркин А.Б., Горбачева Л.Б. Биохимические механизмы действия N-алкил-N-нитрозомочевин. Возможные причины лекарственной устойчивости к этим соединениям. Экспериментальная и клиническая фармакология 1996;59(2):69–75.
5. Poschke I., Mao Y., Kiessling R. et al. Tumor-dependent increase of serum amino acid levels in breast cancer patients has diagnostic potential and correlates with molecular tumor subtypes. J Transl Med 2013;16;11:290. doi: 10.1186/1479-5876-11-290. PMID:24237611.
6. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П. и др. N ω -Алкилнитрозокарбамоил- α , ω -диаминокарбоновые кислоты. II. Синтез и противоопухолевая активность нитрозопроизводных N ω -(2-хлорэтил)-карбамоил- α , ω -диаминокарбоновых кислот. Химико-фармацевтический журнал 1996;30(4):15–7.
7. Левит Г.Л., Радина Л.Б., Краснов В.П. и др. N ω -Алкилнитрозокарбамоил- α , ω -диаминокарбоновые кислоты. III. Синтез и противоопухолевая активность N ϵ -нитрозо-N ϵ -[N'-(2-хлорэтил)карбамоил]-L-лизина и N ϵ -[N'-(2-хлорэтил)-N'-нитрозокарбамоил]-L-лизина. Химико-фармацевтический журнал 1996;30(5):23–5.
8. Горбунова В.А., Манзюк Л.В., Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Лизомустин – отечественный препарат из группы производных нитрозомочевин в лечении меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):55–6.
9. Горбунова В.А., Семина О.В., Кадагидзе З.Г. и др. Нитруллин – новый оригинальный отечественный препарат из группы нитрозомочевин. Вопросы онкологии 2001;6:680–3.
10. Краснов В.П., Левит Г.Л., Барышникова М.А. и др. Нитрозомочевин на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат Лизомустин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):46.
11. Majumdar R., Shao L., Minocha R. et al. Ornithine: The Overlooked Molecule in the Regulation of Polyamine Metabolism. Plant Cell Physiol 2013;54(6):990–1004. doi: 10.1093/pcp/pcr053. Epub 2013 9. PMID:23574701.
12. Pegg A.E., Casero R.A. Current status of the polyamine research field. Methods Mol Biol 2011;720:3–35. doi: 10.1007/978-1-61779-034-8_1. PMID:21318864.
13. Seidenfeld J., Sprague W.S. Comparisons between sensitive and resistant human tumor cell lines regarding effects of polyamine depletion on chloroethylnitrosourea efficacy. Cancer Res 1990; 1;50(3):521–6. PMID:2137022.
14. Webber M.M., Buffkin D.C., Juillard G.J-F. et al. Ornithine metabolism in normal subjects and patients with cancer. J Nucl Med 1980;21(12):1194–6. PMID:6777468.
15. Ikeguchi Y., Mackintosh C.A., McCloskey D.E., Pegg A.E. Effect of spermine synthase on the sensitivity of cells to anti-tumour agents. Biochem J 2003; 1;373(Pt 3):885–92. PMID:12737625.
16. Manni A., Washington S., Mauger D et al. Cellular mechanisms mediating the anti-invasive properties of the ornithine decarboxylase inhibitor alpha-difluoromethylornithine (DFMO) in human breast cancer cells. Clin Exp Metastasis. 2004;21(5):461–7. PMID:15672871.
17. Casero R.A., Woster P.M. Recent Advances in the Development of Polyamine Analogues as Antitumor Agents. J Med Chem. 2009; 13;52(15):4551–73. doi: 10.1021/jm900187v. PMID: 19534534.
18. O'Shaughnessy J.A., Demers L.M., Jones St.E. et al. α -Difluoromethylornithine as Treatment for Metastatic Breast Cancer Patients. Clin Cancer Res. 1999;5(11):3438–44. PMID:10589756.
19. Raul F. Revival of 2-(difluoromethyl)ornithine (DFMO), an inhibitor of polyamine biosynthesis, as a cancer chemopreventive agent. Biochem Soc Trans. 2007;35(Pt 2):353–5. PMID:17371277.
20. Medina-Enriquez M.M., Alcántara-Farfán V., Aguilar-Faisal L. et al. N ω -chloroacetyl-l-ornithine, a new competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, induces selective growth inhibition and cytotoxicity on human cancer cells versus normal. J Enzyme Inhib Med Chem. 2015;30(3):345–53. doi: 10.3109/14756366.2014.926342. Epub 2014 Jun 18. PMID:24939101.
21. Hung D.T., Oredsson S.M., Pegg A.E. et al. Potentiation of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea cytotoxicity in 9L rat brain tumor cells by methylglyoxal-bis(guanylhydrazone), an inhibitor of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase. Eur J Cancer Clin Oncol. 1984;20(3):417–20. PMID:6538500.
22. Hunter K.J., Deen D.F., Pellarin M., Marton L.J. Effect of alpha-difluoromethylornithine on 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea and cis-diamminedichloroplatinum(II) cytotoxicity, DNA interstrand cross-linking, and growth in human brain tumor cell lines in vitro. Cancer Res. 1990; 1;50(9):2769–72. PMID:2109657.
23. Wolff S., Feeny L., Afzal V. Depletion of cellular polyamines by alpha-difluoromethylornithine increases 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea-induced sister-chromatid exchanges. Mutat Res 1993;289(1):107–14. PMID:7689156.
24. Барышникова М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитрозоалкиломочевин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):8.
25. Грищенко И.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):49–54.
26. Горбачева Л.Б., Дедерер Л.Ю. Исследование механизмов лекарственной устойчивости к нитруллину (лизомустину). Российский биотерапевтический журнал 2005;4(3):42–7.
27. Перетолчина Н.М., Семина О.В. Араноза – новый отечественный противоопухолевый препарат из группы нитрозомочевин. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышникова. М.: Изд-е РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003:201–14.
28. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевин. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):113.
29. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012:640–54.
30. Bibby M.C. Making the most of rodent tumour systems in cancer drug discovery. Br J Cancer 1999;79(11-12):1633–40. PMID:10206270
31. Marsh J.C., Shoemaker R.H., Suffness M. Stability of the in vivo P388 leukemia model in evaluation of antitumor activity of natural products. Cancer Treat Rep 1985;69(6):683–5. PMID:4016772.

ИЗУЧЕНИЕ ХИМИОПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛИКОПИНА НА МОДЕЛИ РАКА ПИЩЕВОДА, ИНДУЦИРОВАННОГО У КРЫС N-МЕТИЛ-N-БЕНЗИЛНИТРОЗАМИНОМ

И.И. Басиева¹, Л.З. Болиева¹, А.В. Сергеев²

¹ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Минздрава России, Россия, 362019, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, 40;

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Россия, 115478, г. Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Басиева Инна Иславовна bolievalz@mail.ru

Введение. Рак пищевода занимает 6-е место в мире в структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями и характеризуется значительной территориальной вариабельностью заболеваемости.

Цель исследования — сравнительное изучение химиопрофилактической активности ликопина в отношении новообразований пищевода, индуцированных у крыс N-метил-N-бензилнитрозамином.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 160–180 г. Новообразования пищевода индуцировали введением с питьевой водой N-метил-N-бензилнитрозамина в разовой дозе 0,5 мг/кг массы тела в 10 % растворе этилового спирта ежедневно в течение 8 нед.

Результаты. Применение ликопина в дозе 50 мг/кг массы тела приводило к статистически достоверному снижению частоты возникновения новообразований в группе животных, получавших канцероген, со 100 до 44 % ($p < 0,05$). Количество опухолей на одну особь в группе животных, получавших ликопин, достоверно уменьшилось в 2,4 раза ($p < 0,05$). Средний балл микроскопических изменений снизился под воздействием ликопина в 2,4 раза ($p < 0,001$) по сравнению с группой животных, получавших канцероген, что свидетельствует о торможении процессов малигнизации неопластических изменений в органе-мишени. Дополнительное введение ликопина экспериментальным животным, получавшим N-метил-N-бензилнитрозамин, препятствовало формированию дисбаланса в системе перекисного окисления липидов — антиоксидантной защиты: снижению активности антиоксидантных ферментов и накоплению основного продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида.

Выводы. Согласно полученным на данном этапе исследований результатам, каротиноид ликопин обладает антиоксидантной и химиопрофилактической активностью.

Ключевые слова: канцерогенез, рак пищевода, химиопрофилактика, ликопин

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-32-35

COMPARATIVE STUDY OF CHEMOPREVENTIVE ACTIVITY OF LYCOPENE ON EXPERIMENTAL MODEL OF ESOPHAGUS CANCER INDUCED BY N-METHYL-N-BENZYLNITROSOUREA IN RATS

I.I. Basieva¹, L.Z. Bolieva¹, A.V. Sergeev²

¹North-Ossetian State Medical Academy; 40 Pushkinskaya St, Vladikavkas, 362019, Russia;

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Cancer of the esophagus is the sixth most common malignancy worldwide and there is a remarkable variation in the incidence of esophageal cancer in different parts of the world.

Objective: The present study was designed to evaluate chemopreventive activity of lycopene on esophagus carcinogenesis induced by N-methyl-N-benzylnitrosourea in rats.

Methods. The study was conducted on male Wistar rats with body weight at the beginning 160–180 g. Tumors of esophagus were induced by N-methyl-N-benzylnitrosourea in dose of 0.5 mg/kg body weight in 10 % ethanol given daily with drinking water during 8 weeks.

Results. Lycopene given in dose of 50 mg/kg reduced incidence of tumors of esophagus from 100 % in N-methyl-N-benzylnitrosourea group to 44 % ($p < 0.05$). Lycopene also inhibited tumor multiplicity, the standard end point in this tumor model 2,4 times in comparison with N-methyl-N-benzylnitrosourea group ($p < 0.005$). The average score of neoplastic changes decreased 2.4 times in lycopene group ($p < 0.001$) and indicates inhibition of malignization of neoplastic changes in target organ. Additional feeding of N-methyl-N-benzylni-

trosoarea-treated rats with lycopene prevented formation of the imbalance in lipid peroxidation – antioxidant defense system by prevention of inhibition of antioxidant enzymes and accumulation of malonic dialdehyde.

Conclusion. *At this stage of our study, we can conclude that lycopene appears to be worthy of consideration as an antioxidant, and anti-tumor medicine.*

Key words: *carcinogenesis, esophagus cancer, chemoprevention, lycopene*

Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями человека рак пищевода занимает шестое место в мире, однако заболеваемость и смертность варьируют в широких пределах в зависимости от географического региона. Наиболее высокие уровни заболеваемости отмечены в северных районах Китая, Казахстане, Киргизии, Монголии, Иране, Прикаспийском регионе. В России в структуре заболеваемости рак пищевода составляет 2,5 % всех злокачественных новообразований у мужчин и 0,68 % у женщин и занимает соответственно 11-е и 18-е места, а в структуре смертности – 7-е место, при этом наиболее высокая частота наблюдается в Республике Саха, Бурятии, на Алтае, в Чеченской Республике и Чукотском автономном округе [1, 2].

Наличие эндемичных регионов и, соответственно, групп высокого риска заболеваемости плоскоклеточным раком пищевода позволяет говорить о целесообразности проведения в данной популяции мероприятий по первичной профилактике злокачественных новообразований. Учитывая имеющиеся в литературе данные о наличии у каротиноида ликопина химиофилактической активности, а также данные о высокой безопасности ликопина, представляется актуальным изучение антиканцерогенной активности данного каротиноида на модели плоскоклеточного рака пищевода [3–6]. Ликопин, в отличие от бета-каротина, не превращается в ретиноиды (ретинол, ретиналь, ретиноевая кислота и др.) и обладает ярко выраженными антиоксидантными и антиканцерогенными свойствами [7, 8].

Целью нашего исследования было изучение химиофилактической активности ликопина на модели рака пищевода, индуцированного у крыс N-метил-N-бензилнитрозамином (МБН).

Материалы и методы

Исследование проведено на крысах-самцах линии Вистар с исходной массой 160–180 г, полученных из вивария Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Животные содержались в стандартных условиях вивария при температуре 20–22 °С и естественном

световом режиме, получали стандартный рацион и без ограничений питьевую воду. После двухнедельного карантина животных делили на группы случайным образом. В контрольные и опытные группы входили половозрелые животные одного возраста, полученные одновременно из вивария, разброс по исходной массе тела составил не более 10 %. Эксперименты проводились в соответствии с действующими нормативными актами Российской Федерации [9, 10].

Новообразования пищевода индуцировали введением с питьевой водой МБН в разовой дозе 0,5 мг/кг массы тела в 10 % растворе этилового спирта ежедневно в течение 8 нед [11]. Животные были разделены на 4 группы по 25 крыс в каждой. Крысы I группы служили интактным контролем. Животные получали: во II группе только канцероген, в III группе – 10 % раствор этанола с питьевой водой, в IV группе – МБН и дополнительно с кормом ликопинсодержащую биологически активную добавку «Томатол» (ЗАО «Био-прогресс», Россия) ежедневно в дозе 50 мг/кг массы тела в пересчете на ликопин [6].

Продолжительность опыта составила 36 нед после начала введения канцерогена. Павших в ходе эксперимента и забитых по его окончании животных подвергали патологоанатомическому исследованию. Все новообразования в пищеводе, глотке и преджелудке подсчитывали и измеряли. Отдельно фиксировали изменения в следующих отделах: глотке, верхней трети пищевода (от глотки до уровня бифуркации трахеи), средней трети пищевода (от уровня бифуркации трахеи до уровня диафрагмы), нижней трети пищевода (от уровня диафрагмы до входа в преджелудок), собственно в преджелудке. Материал, взятый для гистологического исследования, фиксировали в 10 % растворе формалина и подвергали микроскопическому исследованию после окраски срезов гематоксилином и эозином. Эффективность модифицирующего воздействия оценивали по изменению частоты возникновения, множественности и степени малигнизации новообразований в опытных группах по сравнению с контрольной. Частоту возникновения новообразований определяли по отношению к эффективному числу животных (доживших до появления первой опухоли). Индекс множественности рассчитывали по отношению к эффективному числу крыс и числу крыс с опухолями. Микроскопические изменения в пищеводе оценивали по трехбалльной

системе: предопухольные изменения – 1 балл, папилломы – 2 балла, рак – 3 балла [12].

Состояние системы перекисного окисления липидов – антиоксидантной защиты (ПОЛ – АОЗ) оценивали по накоплению малонового диальдегида (МДА), активности каталазы (КТ), супероксиддисмутазы (СОД) и глутатионпероксидазы (ГП) в эритроцитах [13–16].

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с помощью программного обеспечения «Statistica 10.0». Для анализа данных использовали среднюю величину выборки (M) и ошибку средней (m). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Эксперимент был завершен, когда в II группе, получавшей только канцероген, пали все животные. В то же время в I группе оставались 22 крысы, или 88 % ($p < 0,05$), в III группе – 20 крыс, или 80 % ($p < 0,05$), в IV группе – 12 крыс, или 48 % ($p < 0,05$). К концу эксперимента средняя масса животных в группах составила $286,2 \pm 6,4$ г, $218,2 \pm 5,2$ г, $268,7 \pm 5,6$ г, $276,4 \pm 4,6$ г ($p < 0,05$) соответственно. До обнаружения первой опухоли в II группе дожили 23 крысы, в остальных группах – по 25 крыс.

Множественные новообразования пищевода, глотки и преджелудка развились у 100 % животных II группы; в IV группе новообразования развились у 11 крыс, или у 44 % ($p < 0,05$), в I и III группах новообразований не обнаружено (табл. 1). Опухоли располагались на слизистой оболочке и имели вид округлых образований диаметром 0,1–0,4 см (в единичных случаях – 0,5 см и более). Наибольшее число опухолей развивалось в пищеводе. Не было выявлено новообразований других локализаций и метастази-

рования развившихся опухолей. В группе животных, получавших ликопин, количество опухолей на одно животное достоверно снизилось в 2,4 раза ($p < 0,05$). При морфологическом анализе установлено, что опухоли развивались на фоне гиперплазии и (или) дисплазии эпителия. Гистологически большинство новообразований классифицировались как папилломы. Плоскоклеточные карциномы были обнаружены у 14 (58,3 %) крыс II группы. Карциномы встречались в виде одиночных узлов до 15 мм в диаметре и имели экзофитный или инфильтративный рост. При балльной оценке микроскопических изменений получены следующие результаты (табл. 1): средний балл составил $2,6 \pm 0,12$ во II группе и $1,08 \pm 0,04$ ($p < 0,001$) в группе животных, получавших ликопин.

Оценка состояния системы ПОЛ–АОЗ дала следующие результаты. В группе животных, получавших канцероген, выявлено статистически достоверное повышение содержания МДА и понижение активности СОД, КТ и ГП по сравнению с группой крыс интактного контроля. Дополнительное введение экспериментальным животным, получавшим МБН, ликопина препятствовало формированию дисбаланса в системе ПОЛ–АОЗ: снижению активности антиоксидантных ферментов и накоплению основного продукта ПОЛ–МДА (табл. 2).

Анализ полученных данных свидетельствует о наличии у ликопина антиканцерогенной активности в отношении новообразований пищевода, индуцированных МБН, которая в условиях проведенного эксперимента проявилась в статистически достоверном снижении частоты возникновения опухолей и индекса множественности в группе животных, получавших ликопин, а также в значимом уменьшении степени малигнизации развившихся новообразований во всех опытных группах животных, что согласуется с имею-

Таблица 1. Влияние ликопина на возникновение опухолей пищевода, индуцированных у крыс *N*-метил-*N*-бензилнитрозамином

Группа, воздействие	Эффективное число крыс в группе	Все локализации (глотка, пищевод, преджелудок)			Пищевод		
		Число крыс с опухолями	ИМ	Микроскопическая оценка, баллы	Число крыс с опухолями	ИМ	Микроскопическая оценка, баллы
I – Интактный контроль	25	–	–	–	–	–	–
II – МБН	24	24 (100 %)	$7,7 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,12$	24 (100 %)	$6,9 \pm 1,2$	$2,6 \pm 0,12$
III – 10 % раствор этанола	25	–	–	–	–	–	–
IV – МБН + ликопин	25	11 (44 %)**	$3,2 \pm 0,6$ **	$1,08 \pm 0,04$ ***	11 (44 %)**	$2,9 \pm 0,5$ *	$1,08 \pm 0,04$ ***

Примечания: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – различия с контрольной группой достоверны.

Сокращения: ИМ – индекс множественности (количество опухолей на одно животное), МБН – *N*-метил-*N*-бензилнитрозамин.

Таблица 2. Влияние ликопина на систему ПОЛ–АОЗ в крови экспериментальных животных

Группа	СОД, ед/мг	КТ, ед/мг	ГП, ед/мг	МДА, нмоль/мг
I	172,2 ± 14,3	28,4 ± 2,1	33,6 ± 3,4	8,4 ± 0,5
II	96,3 ± 7,3*	14,8 ± 1,7*	18,4 ± 2,2*	12,6 ± 0,8*
III	168,4 ± 12,2	26,4 ± 2,3	31,4 ± 3,1	8,1 ± 0,8
IV	128,2 ± 11,3**	22,6 ± 2,1**	26,4 ± 2,8**	9,4 ± 0,7**

Примечания: * $p < 0,05$ – различия с I группой достоверны; ** $p < 0,05$ – различия со II группой достоверны.
Сокращения: СОД – супероксиддисмутаза, КТ – каталаза, ГП – глутатионпероксидаза, МДА – малоновый диальдегид.

щимаются в литературе данными о его химиопрофилактических свойствах. Одним из основных механизмов антиканцерогенного действия ликопина является, по-видимому, его способность препятствовать нарушению баланса в системе ПОЛ – АОЗ [3–6, 8, 17].

Заключение

Таким образом, проведенный эксперимент демонстрирует, что ликопин обладает антиканцерогенной

активностью в отношении канцерогенеза пищевода, индуцированного у крыс МБН. Учитывая благоприятное соотношение эффективности и безопасности, представляется целесообразным дальнейшее экспериментальное и клиническое изучение химиопрофилактической активности ликопина для определения перспектив его применения в качестве средства первичной профилактики плоскоклеточного рака пищевода у человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х. Онкология: учебник. 2010.
2. Полоцкий Б.Е., Тер-Ованесов М.Д., Давыдов М.И., Стилиди И.С. Рак пищевода: современные подходы к диагностике и лечению. Русский медицинский журнал 2006;14: 1006–1010.
3. Gloria N.F., Soares N., Brand C. et al. Lycopene and beta-carotene induce cell-cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell lines *Anticancer Res* 2014;34(3): 377–1386. PMID: 24596385.
4. Kim M.J., Kim H. Anticancer effect of lycopene in fastric carcinogenesis. *J Cancer Prev* 2015;20(2):92–6. doi: 10.15430/JCP.2015.20.2.92. PMID: 26151041
5. Konijeti R., Henning S., Moro A. et al. Chemoprevention of prostate cancer with lycopene in the TRAMP model. *Prostate* 2010;70:1547–1554. doi: 10.1002/pros.21190. PMID: 20687227
6. Luo C., Wu X.-G. Lycopene enhances antioxidant enzyme activities and immunity function in N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric cancer rats. *Int J Mol Sci* 2011;12:3340–3351. doi: 10.3390/ijms12053340. Epub 2011 May 23. PMID: 21686188
7. Trumbo P.R. Are there adverse effects of lycopene exposure? *J Nutr* 2005;135(8):2060–2061. PMID: 16046742
8. Wang Y., Ausman L.M., Greenberg A.S. et al. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats *Int J Cancer* 2010;126(8):1788–1796.
9. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Доступно на: <http://www.rg.ru/2010/10/22/laboratornaya-praktika-dok.html>.
10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005.
11. Болиева Л.З., Джиоев Ф.К., Коростелев С.А. Ингибирующее влияние отечественного синтетического бета-каротина на возникновение у крыс опухолей пищевода, глотки и преджелудка, индуцированных N-метил-N-бензилнитрозамином. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 1995;6(3):21–24.
12. Гуркало В.К., Забежинский М.А. Модифицирующий эффект гемитона, кофеина и этилового спирта на канцерогенез, вызванный N-нитрозодизетиламином. *Экспериментальная онкология* 1982;4(3):25–28.
13. Справочник по лабораторным методам исследования. Под ред. Л.А. Даниловой. СПб.: Питер, 2003.
14. Aebi H.E. Catalase. In: Bergmeyer H.U. (Ed.). *Methods of enzymatic analysis*. Weinheim: Verlag Chemie, 1983: 273–286.
15. Flohe L.; Gunzler W.A. Assays of glutathione peroxidase *Meth. Enzymol* 1984;105:114–121.
16. Marklund S., Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase *Eur J Biochem* 1974;47:469–474.
17. Койбаева М.Т., Болиева Л.З., Решетникова В.В., Сергеев А.В. Влияние ликопина на возникновение опухолей печени, индуцированных у крыс N-нитрозодизетиламином. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):26.

ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В СОЧЕТАНИИ С ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЕЙ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО И КАЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЖЕНЬШЕНЯ В ФИТОЭКСТРАКТАХ

Р.В. Карпова¹, В.Е. Шевченко¹, Е.В. Бочаров¹, О.П. Шейченко²,
О.А. Бочарова¹, В.Г. Кучеряну³, В.А. Быков²

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
Россия, 115478, г. Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», Россия,
117216, г. Москва, ул. Грина, 7/1;

³ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН,
Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

Контакты: Карпова Регина Васильевна planta39@rambler.ru

Статья посвящена идентификации и количественному определению гинзенозидов в составе мультифитоадаптогенного препарата «Фитомикс-40» (ФМ-40) с компонентами 40 растительных экстрактов, включая женьшень. Препарат обладает широким спектром действия, в том числе антимуtagenным, противоопухолевым, радио- и нейропротекторным, иммуно- и гормономодулирующим, антиоксидантным эффектами.

Цель исследования — определение состава гинзенозидов и их количественного содержания в ФМ-40 с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС).

Материалы и методы. В работе исследовали ФМ-40, препарат сравнения, содержащий компоненты тех же экстрактов растений, что и ФМ-40, только в иных (известных) соотношениях, а также экстракт женьшеня. Для определения отдельных гинзенозидов применяли коммерческие стандарты, а также данные литературы. Хроматограммы были получены в коротком (с достижением удовлетворительного разделения веществ) и длинном (более информативном) градиентах подачи мобильной фазы.

Результаты. ВЭЖХ-МС/МС с использованием стандартов гинзенозидов и данных литературы была успешно применена для идентификации и количественного определения гинзенозидов. Установлены оптимальные условия их разделения. Полученные в ходе данных исследований хроматограммы и спектры компонентов препарата могут быть использованы в качестве стандартов гинзенозидов. В составе ФМ-40 выявлены гинзенозиды Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rg₂, Re, Rf, Ro, малонил-Rb₁, -Rb₂/Rb₃/Rc и -Rd.

Ключевые слова: фитоадаптоген, гинзенозиды, электрораспыление, тандемная масс-спектрометрия, пределы детектирования

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-36-46

GINSENOSIDES DEFINITION IN PLANT EXTRACTS BY MEANS OF HIGH THROUGH LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS-SPECTROMETRY

R. V. Karpova¹, V. E. Shevchenko¹, E. V. Bocharov¹, O. P. Sheychenko², O. A. Bocharova¹, V. G. Kucheryanu³, V. A. Bykov²

¹ N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

² All-Russian Research Institute of Medical and Aromatic plants, 7/1 Green St, Moscow, 117216, Russia

³ Institute of general pathology and pathophysiology, 8 Baltiyskaya St, Moscow, 125315, Russia

Background. Present study was dedicated to identification and evaluation of the biologically active components in multiphytoadaptogene preparation phytomix-40 (PhM-40). It consists of forty plant extracts components including Panax ginseng. PhM-40 demonstrates wide spectrum of biological effects including antimutagenic, antitumor, radioprotective, hormone-modulating, antioxidant, neuroprotective and immunomodulating activities. **Objective:** of this study was to identify and to quantify ginsenosides content in the preparation. **Materials and method.** Experimental design included the comparison of ginsenosides content evaluation in PhM-40, comparison preparation (which contains similar to PhM-40 plant extracts components but another rations) and Panax ginseng extract by means

of LC–MS/MS spectroscopy method. Two different gradients were used: the short and the long ones. By means of the short one rapid compound identification with economical consumption of chemicals was possible as well as the long one allowed us to identify compounds with better resolution capability. Commercially available ginsenosides were the standards for calibration. Literature data were also used for ginsenosides identification.

Results. High through liquid chromatography method with tandem mass-spectrometry was successfully used for ginsenosides identification quantitatively and qualitatively in plant preparation PhM-40. The data obtained show the ginsenosides qualitative composition which has been identified as Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rg₂, Re, Rf, Ro, malonyl-Rb₁, -Rb₂/Rb₃/Rc, -Rd enumeration in PhM-40

Key words: phytoadaptogene, ginsenosides, electro spray, tandem mass-spectrometry, limits of detection.

Введение

В РОНЦ им. Н.Н. Блохина разработан мультифитоадаптогенный препарат «Фитомикс-40» (ФМ-40) с целью профилактики и комплексного лечения онкологических заболеваний в частности и возрастных патологий в общем [1, 2]. Препарат исследован на экспериментальных моделях и в клинике. Выявлено антимуtagenное, противоопухолевое, радио- и нейропротекторное, антиоксидантное, гормоно- и иммуномодулирующее (в том числе противовоспалительное и интерферогенное) действие ФМ-40 [3–12]. При клиническом изучении ФМ-40 был доказан лечебный эффект в отношении доброкачественной гиперплазии предстательной железы (возрастное заболевание), лейкоплакии слизистой оболочки полости рта (предрак), распространенного рака желудка (IV стадия развития) и болезни Паркинсона (возрастное нейродегенеративное заболевание) [13–18]. Полученные в рамках проведенных исследований данные свидетельствуют об эффективности ФМ-40, которая, вероятно, обусловлена комплексом биологически активных веществ 40 растительных экстрактов, входящих в его состав [19–24], из них компоненты экстракта женьшеня являются одними из важнейших.

В ранее проведенных исследованиях с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса были установлены характеристики компонентов экстрактов растений мультифитоадаптогена ФМ-40, а также количественно определены действующие вещества в одномерных спектрах методом внутреннего стандарта [25]. Установлен состав летучих веществ препарата при использовании хромато-масс-спектрометрии [26].

Применение обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором при использовании стандартных образцов в составе мультифитоадаптогена ФМ-40 позволило определить наличие полифенольных соединений и аминокислот. В результате обнаружены 8 веществ фенольной природы: гиперозид, рутин, нарингенин, кверцетин, лютеолин, апигенин (флавоноиды), арбутин (фенологликозид) и глицирризиновая кислота (тритерпеновый сапонин). Кроме того, выявлены 18 аминокислот, из них

7 незаменимых [27]. Подход к идентификации и количественной оценке растительных компонентов комплексных фитопрепаратов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) имеет научно-практическое значение.

Целью данного исследования является определение состава гинзенозидов и их количественного содержания в ФМ-40 при использовании ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы

ФМ-40 представляет собой комплексный препарат на основе компонентов экстрактов 40 растений, в том числе женьшеня, включенных в Государственную фармакопею РФ. Препарат сравнения (ПС) содержит компоненты тех же экстрактов растений, что и ФМ-40, только в иных (известных) соотношениях.

Анализ комплексных препаратов (ФМ-40 и ПС) и отдельно экстракта женьшеня (полученного аналогичным способом) проводили с использованием тройного квадрупольного масс-спектрометра TSQ Vantage серии Thermo Scientific TSQ, соединенного с ВЭЖХ-хроматографом Accela («Thermo Scientific», США), снабженного колонкой ACQUITY UPLC VEN C18 (1,7 мкм, 2,1 × 100 мм, производства компании «Waters», США).

В работе использовали стандарты гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rh₁ и Rh₂ (ChromaDex), стандарт ланатозид С (в качестве внутреннего стандарта), а также метанол («Sigma-Aldrich», США) и ацетонитрил («Reiden-deHaen», Германия) для ВЭЖХ.

Для приготовления рабочих растворов стандарты гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rh₁ и Rh₂ растворяли в метаноле с конечной концентрацией 1,0 мг/мл. Из каждого рабочего раствора отбирали по 100 мкл и переносили в чистую пробирку, затем доводили метанолом до объема 1 мл. Таким образом получали раствор смеси стандартов с концентрацией каждого 0,1 мг/мл.

Калибровочные растворы готовили на основе метанола с концентрациями 3,3; 5; 10; 12,5; 16,7; 20; 25; 50; 100; 125; 166,7; 200; 250 и 500 мкг/мл. Каждый образец содержал 2 мкг внутреннего стандарта (ланатозид С). Калибровочные кривые построены в коор-

динатах: «отношение площади пика стандарта к площади пика внутреннего стандарта — концентрация стандарта».

Образец экстракта женьшеня разводили метанолом в 100 раз, после чего пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

Образцы фитомикстур смешивали с метанолом в соотношении 1:2 и центрифугировали 5 мин при 13 000 об/мин. Надосадочную жидкость пропускали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и центрифугировали 1 мин при 13 000 об/мин.

Условия хроматографирования:

- фаза А: 100 % вода и 0,1 % муравьиная кислота (FA);
- фаза В: 95 % ацетонитрил, 5 % вода и 0,1 % FA.

Для анализа стандартов гинзенозидов, экстракта женьшеня и препаратов ФМ-40 и ПС использовали 2 градиента:

- 1) «короткий»: 0–15 мин (21–60 % фазы В), 15–18 мин (60–100 % В), 18–25 мин (100 % В), 25–33 мин (21 % В);
- 2) «длинный»: 0–68 мин (0–60 % фазы В), 68–70 мин (60–100 % В), 70–75 мин (100 % В), 75–80 мин (0 % В).

Объем вводимой пробы составлял 5 мкл при объеме петли 25 мкл, скорость потока — 450 мкл/мин.

Ионизацию осуществляли с помощью электроспрея. Условия ионизации: отрицательная полярность, напряжение капилляра электроспрея — 4 кВ, газ (создающий спрей) — 60 psi (1 psi = 6894,757 Па), обтекающий газ — 15 отн. ед., температура капилляра — 270 °С. Спектры в режиме полного сканирования и режиме сканирования отдельных ионов были сняты в диапазоне 150–1500 Да, время сканирования — 0,1 с.

МС/МС-спектры стандартов и соединений в экстракте получали прямым вводом пробы через шприц со скоростью 5 мкл/мин; давление газа в камере соударений — 0,9 мТорр¹. Напряжение в камере соударений было подобрано для каждого соединения отдельно.

Для количественного определения гинзенозидов в режиме детектирования отдельных ионов были проанализированы образцы смеси стандартов, экстракта женьшеня, а также препаратов ФМ-40 и ПС.

Для качественного и количественного определения основных компонентов женьшеня в составе фитопрепаратов с использованием стандартов гинзенозидов были сняты отдельные хроматограммы смеси стандартов гинзенозидов, экстракта женьшеня, входящего в составы фитоконпозиций, а также самих препаратов ФМ-40 и ПС. Все перечисленные

хроматограммы были получены в коротком (более экономном) и длинном (более информативном) градиентах подачи мобильной фазы. Для построения калибровочной кривой, необходимой для количественного определения гинзенозидов в препаратах, нужно было получить хроматограммы стандартов гинзенозидов в большом диапазоне концентраций. Для экономии реактивов и времени использован максимально короткий градиент подачи растворителя, при котором достигалось удовлетворительное разделение веществ (рис. 1), при этом экстракт женьшеня и фитопрепараты также были сняты в этих же условиях (см. рис. 2 и 3, а на с. 40, рис. 4 и 5, а на с. 41). Хроматограммы экстракта женьшеня, ФМ-40 и ПС с длинным градиентом (как более информативные) получены для анализа по данным литературы тех гинзенозидов, стандартов которых у нас не было.

Результаты и обсуждение

Хроматограмма полного ионного тока смеси стандартов гинзенозидов Rg₁, Rb₁, Rh₁, Rc, Rb₂, Rd и Rh₂ (в соответствии с очередностью выхода) представлена на рис. 1. В табл. 1 для каждого гинзенозида приведены молекулярная масса (ММ), структурная формула, время удерживания (R_t), значения отношения массы иона к его заряду (m/z) для основного молекулярного иона, а также для фрагментов молекулярного иона, полученных в результате тандемной масс-спектрометрии (данные МС/МС). Как следует из данных табл. 1, при первичной ионизации (в отрицательном режиме) большинство гинзенозидов (Rb₁, Rc, Rb₂, Rd) образовывали квазимолекулярные ионы [M – H][–], а некоторые из них (с меньшей молекулярной массой, такие как Rg₁, Rh₁ и Rh₂) — ионы-аддукты [M + FA – H][–] с FA, входящей в состав мобильной фазы.

Полученные данные МС/МС (при вторичной ионизации и фрагментации молекулярных ионов) хорошо согласуются со структурными формулами гинзенозидов. Результаты анализа фрагментов ионов и сопоставление их со структурной формулой для каждого гинзенозида также приведены в табл. 1.

Фрагменты гинзенозидов образуются в основном за счет последовательного отщепления молекул сахаров (глюкозы, арабинозы). Конечные фрагменты соответствуют агликонам 20 (S) — протопанаксациолю (для гинзенозидов Rb₁, Rb₂, Rc, Rh₂) и 20 (S) — протопанаксатриолю (для гинзенозидов Rg₁, Rg₂, Rh₁).

Хроматограмма полного ионного тока экстракта женьшеня получена с использованием короткого градиента подачи растворителей (рис. 2). Она содержит не менее 12 пиков, которые можно отнести к гинзе-

¹1 Торр = 1 мм рт. ст. = 133,322 Па.

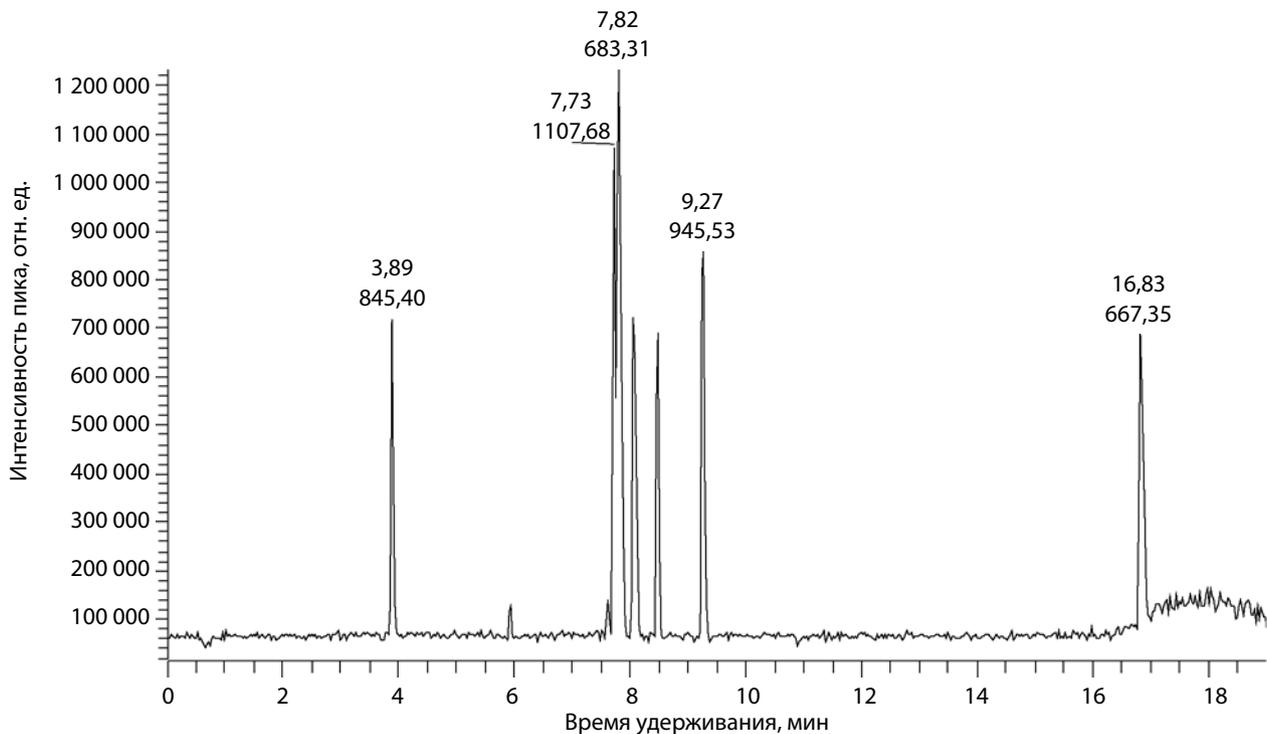


Рис. 1. Хроматограмма полного ионного тока смеси стандартов гинзенозидов

нозидам. Пик со временем удерживания $R_t = 6$ мин соответствует внутреннему стандарту ланатозид С. В экстракте женьшеня при сопоставлении времени удерживания и масс-спектров со стандартами гинзенозидов были идентифицированы следующие гинзенозиды: R_{g_1} , R_c , R_{b_1} , R_{b_2} , R_d (пики 1, 4, 6, 8 и 11 соответственно). Гинзенозиды R_{h_1} и R_{h_2} не были выявлены.

Хроматограммы полного ионного тока препаратов ФМ-40 и ПС сняты в режиме полного сканирования ионов (рис. 3 и 4). Для обнаружения гинзенозидов хроматограммы ФМ-40 и ПС сняты в режиме сканирования отдельных ионов, массы которых соответствовали массам молекулярных ионов гинзенозидов:

- а) 845–846 (R_{g_1}),
- б) 945–946 (R_d),
- в) 1077–1078 (R_c и R_{b_2}),
- г) 1107–1108 (R_{b_1}).

В качестве иллюстрации на рис. 5 приведена хроматограмма препарата ФМ-40, снятая в режиме сканирования указанных ионов [28–31].

В результате сопоставления времени удерживания и масс-спектров со стандартами гинзенозидов в составе ФМ-40 и ПС были идентифицированы гинзенозиды R_{g_1} , R_c , R_{b_1} , R_{b_2} , R_d , такие же, как и в экстракте женьшеня. При этом сравнивая хроматограммы препаратов (рис. 3 и 4), легко заметить, что в ФМ-40 уровень гинзенозидов значительно выше, чем в ПС.

Для более точной оценки количественного содержания гинзенозидов в препаратах для каждого

гинзенозида построены калибровочные кривые с использованием ланатозид С в качестве внутреннего стандарта.

Из стокового раствора стандартов гинзенозидов приготовлены растворы для калибровки с концентрацией каждого стандарта в диапазоне $3 \div 500$ мкл/мл. В пробы добавляли внутренний стандарт ланатозид С, концентрация которого во всех пробах составляла 1 мкг/мл. По полученным данным для каждого стандарта построена калибровочная кривая в координатах: «отношение площади пика стандарта гинзенозида к площади пика внутреннего стандарта – концентрация стандарта гинзенозида». Как видно в табл. 2, коэффициент корреляции (r) для всех полученных калибровочных кривых превышает 0,98 ($r > 0,98$). Растворы вводили в прибор трижды: в 1-й, 2-й и 5-й дни приготовления раствора смеси стандартов. Образцы хранили при температуре 4 °С. Относительное стандартное отклонение для проб составило 0,5–2,7 % для снятых в один день и 0,4–3,2 % для снятых в разные дни.

Как следует из результатов качественного и количественного анализа гинзенозидов в препаратах ФМ-40 и ПС (табл. 3), в ФМ-40 по сравнению с ПС содержится в 3 раза больше всех установленных гинзенозидов, что согласуется с различиями в составе фитокомпозиций (в ФМ-40 было внесено заведомо в 3 раза больше по объему экстрактов растений-адаптогенов, чем в ПС).

Большой объем научной литературы, посвященной составу экстрактов женьшеня, позволил иденти-

Таблица 1. Результаты хроматографического исследования гинзенозидов, сопоставление экспериментальных данных МС/МС структурных формул гинзенозидов

№ пика	Гинзенозид	ММ, г/моль	Rt, мин	Данные МС, m/z
1	Rg ₁ C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	801	3,9–4,0	845,5 [M + FA – H] ⁻ 799,5 [M – H] ⁻ 637,5 [M – H – Glc] ⁻ 475,3 Agl.
2	Rb ₁ C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	1109,3	7,7–8	1107,78 [M – H] ⁻ 783,2 [M – H – 2Glc] ⁻ 621,5 [M – H – 3Glc] ⁻ 459,25 Agl.
3	Rh ₁ C ₃₆ H ₆₂ O ₉	639	7,8–7,9	683,35 [M + FA – H] ⁻ 637,4 [M – H] ⁻ 475,2 Agl.
4	Rc C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1079,3	8,1–8,4	1077,62 [M – H] ⁻ 945,6 [M – H – Araf] ⁻ 783,2 [M – H – Araf – Glc] ⁻ 621,3 [M – H – Araf – 2Glc] ⁻ 455,2 Agl.
5	Rb ₂ C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	1079,3	8,5–8,8	1077,62 [M – H] ⁻ 945,6 [M – H – Arap] ⁻ 783,2 [M – H – Arap – Glc] ⁻ 621,3 [M – H – Arap – 2Glc] ⁻ 455,2 Agl.
6	Rd C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	947,2	9,25–9,6	945,34 [M – H] ⁻ 783,19 [M – H – Glc] ⁻ 621,6 [M – H – 2Glc] ⁻ 459,4 Agl.
7	Rh ₂ C ₃₆ H ₆₂ O ₈	623	16,8–17	667,43 [M + FA – H] ⁻ 621,49 [M – H] ⁻ 459,04 Agl.

Примечание: ММ – молекулярная масса, R_t – время удерживания, МС – масс-спектрометрический анализ, Araf – арабиноза (фураноза), Arap – арабиноза (пираноза), Glc – глюкоза, Agl. – агликон, FA – муравьиная кислота, m – масса иона; z – заряд иона.

фицировать в экстракте не только те гинзенозиды, стандарты которых у нас были [28–34, 35]. Сопоставление полученных нами экспериментальных и литературных данных позволило (на основании результатов МС/МС) с большой долей вероятности идентифицировать в составе экстракта женьшеня гинзенозиды Re, Ro, Rg₂, Rf и др. (табл. 4 и 5) и оценить их присутствие в фитопрепаратах (соответствие массы иона и времени удерживания на хроматограммах экстракта и препарата). Корректность идентификации веществ в экстракте женьшеня на основании данных литературы (табл. 4) подтверждается результатами МС/МС (табл. 5).

Поскольку площадь пика на хроматограмме, полученной с использованием масс-детектора типа ионной ловушки, является величиной, прямо пропорциональной количеству вещества, дающего дан-

ный пик, то при сравнении площади соответствующих пиков на хроматограммах ФМ-40 и ПС можно приблизительно оценить содержание интересующих нас веществ в одном препарате относительно другого.

В первую очередь были определены соотношения площадей пиков на хроматограммах ФМ-40 и ПС для гинзенозидов Rg₁, Rc, Rb₁, Rb₂, Rd, количество и соотношение которых в препаратах было точно установлено по калибровочным кривым с использованием внутреннего стандарта (см. табл. 3). Площади пиков были определены на хроматограммах полного ионного тока препаратов, снятых в режиме полного сканирования ионов с использованием длинного градиента подачи мобильной фазы. Отрезки этих хроматограмм с временными интервалами, соответствующими временам выхода пиков гинзенозидов Rg₁, Rc, Rb₁, Rb₂ и Rd, представлены на рис. 6–7. Полученные результаты приведены в табл. 6 и 7. Как видно, площади пиков на хроматограммах препаратов различаются приблизительно на одинаковую величину, в среднем пики гинзенозидов на хроматограмме ФМ-40 имеют площадь в 1,15 раз большую, чем на хроматограмме ПС. А поскольку (в соответствии с данными табл. 3) они должны различаться в среднем в 3 раза, правомерно ввести поправочный коэффициент 2,62 (результат деления 3 на 1,15). Тогда содержание гинзенозидов в препарате ФМ-40, установленное как методом количественного определения, так и непосредственным сравнением площадей пиков, получается в 3 раза выше по сравнению с содержанием гинзенозидов в препарате ПС. Следует отметить, что применять этот коэффициент правомерно только для данных конкретных хроматограмм ФМ-40 и ПС, для которых он был рассчитан. Для других хроматограмм нужно будет рассчитывать свой поправочный коэффициент.

Введение поправочного коэффициента может быть оправдано тем обстоятельством, что хроматограммы препаратов ФМ-40 и ПС были получены независимо друг от друга (таким образом, возможны неконтролируемые изменения условий хроматографирования и т. п.). В данном случае эти гинзенозиды выступают в роли внутреннего стандарта, присутствующего в установленном количестве в обоих препаратах, с его помощью можно привести хроматограммы разных образцов к одинаковым универсальным условиям получения (т. е. выровнять условия получения хроматограмм разных образцов).

Таким образом, с использованием стандартов гинзенозидов, помимо прочего, определен поправочный коэффициент, позволяющий через сравнение хроматограмм препаратов количественно оценить различия между ФМ-40 и ПС по содержанию основных биологически активных веществ.

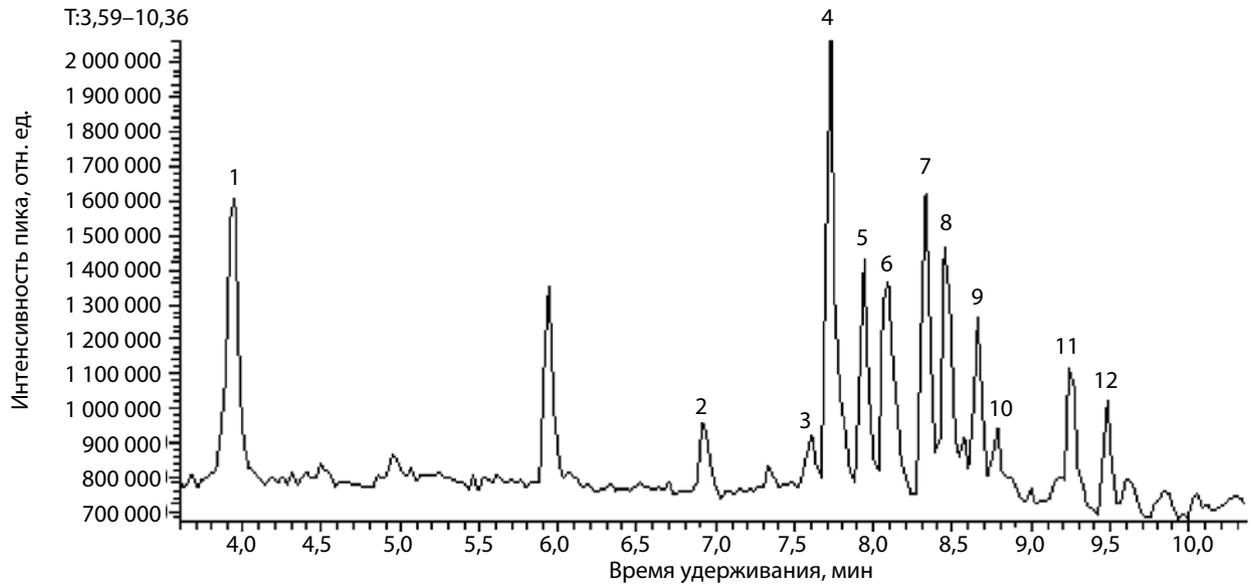


Рис. 2. Хроматограмма полного ионного тока экстракта женьшеня (короткий градиент)

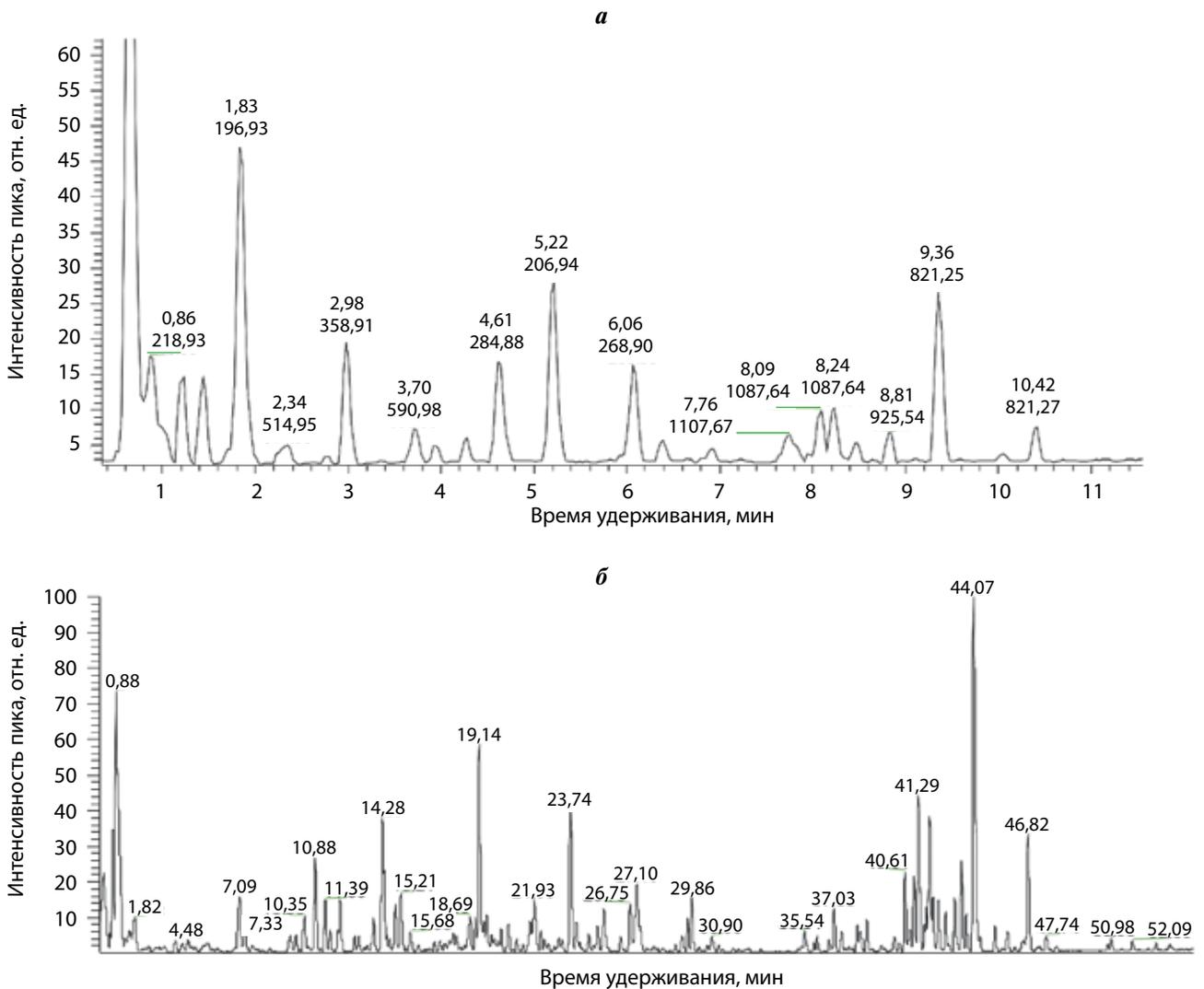


Рис. 3. Хроматограмма полного ионного тока препарата «Фитомикс-40»: а – короткий градиент; б – длинный градиент

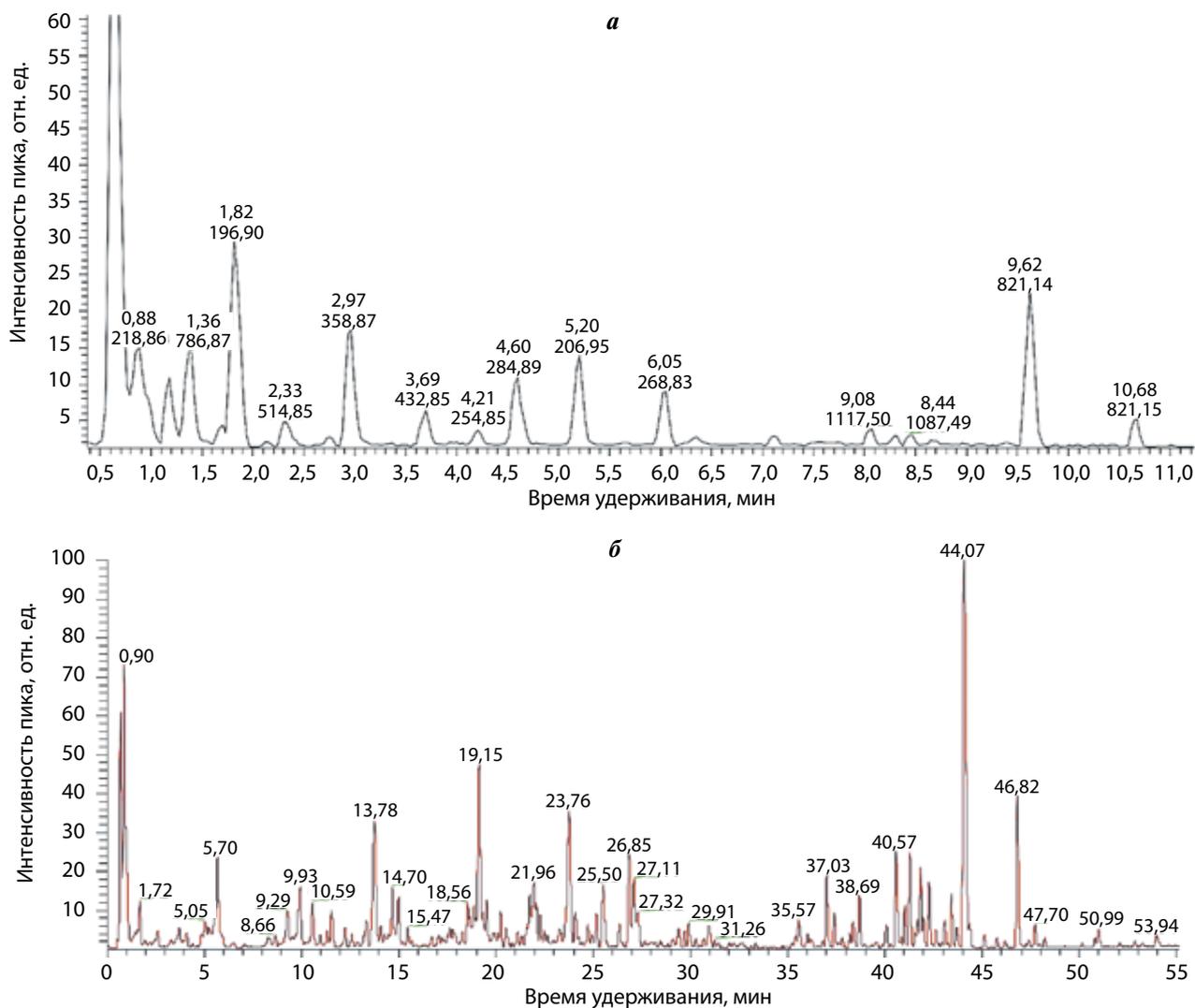


Рис. 4. Хроматограмма полного ионного тока препарата сравнения; а – короткий градиент; б – длинный градиент

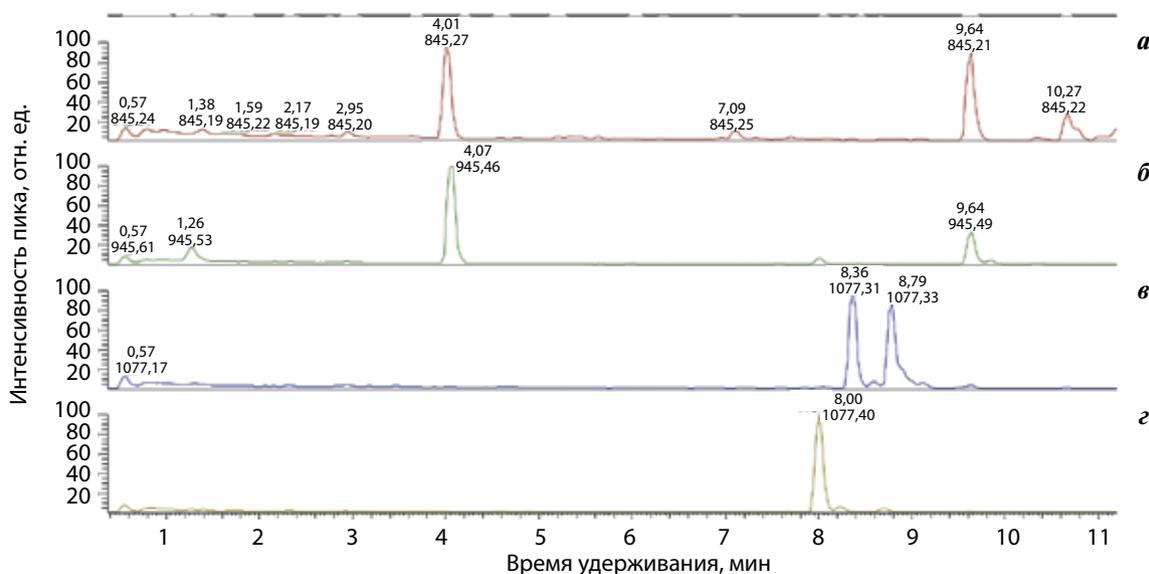


Рис. 5. Хроматограммы препарата «Фитомикс-40» (короткий градиент) в режиме сканирования отдельных ионов массы: 845–846 (а); 945–946 (б); 1077–1078 (в); 1107–1108 (г)

Таблица 2. Калибровочные кривые и коэффициенты корреляции для стандартов гинзенозидов

Гинзенозид	Уравнение калибровочной кривой	Коэффициент корреляции <i>r</i>
Rg ₁	$y = 0,0122x - 0,0322$	0,9902
Rb ₁	$y = 0,0202x + 0,1484$	0,9900
Rc	$y = 0,0108x - 0,0112$	0,9918
Rb ₂	$y = 0,0091x - 0,0255$	0,9897
Rd	$y = 0,0220x + 0,0985$	0,9907

Таблица 3. Качественный и количественный состав гинзенозидов в фитопрепаратах

Гинзенозид	Содержание гинзенозида, мкг/мл		Соотношение гинзенозидов в ФМ-40 и ПС
	ФМ-40	ПС	
Rg ₁	278,343	95,651	2,91
Rb ₁	339,801	111,410	3,05
Rc	279,293	93,409	2,99
Rb ₂	432,531	149,149	2,90
Rd	112,462	35,702	3,15

Примечание: ФМ-40 – фитомикс-40, ПС – препарат сравнения.

Таблица 4. Определение гинзенозидов в экстракте женьшеня с использованием ВЭЖХ-МС/МС на основании данных литературы (номера пиков соответствуют данным, представленным на рис. 2)

№ пика	R _t , мин	Гинзенозид	Масса ионов		
			[M – H] ⁻	[M + FA – H] ⁻	[M – CO ₂ – H] ⁻
1	3,95	Re	945	–	–
2	6,91	Rf	799	845	–
4	7,79	Rg ₂	783	–	–
5	7,94	Малонил-Rb ₁	–	–	1149
7	8,33	Малонил-Rb ₂ /Rb ₃ /Rc	–	–	1119
7	8,33	Ro	955	–	–
9	8,66	Малонил-Rb ₂ /Rb ₃ /Rc	–	–	1119
10	8,78	Малонил-Rb ₂ /Rb ₃ /Rc	–	–	1119
12	9,48	Малонил-Rd	–	–	987

Примечание: R_t – время удерживания, FA – муравьиная кислота.

Расчетное соотношение гинзенозидов, идентифицированных в препаратах на основании данных литературы [28–34, 35], приведено в табл. 7. Из ее

RT: 26,00–31,75 SM: 7B

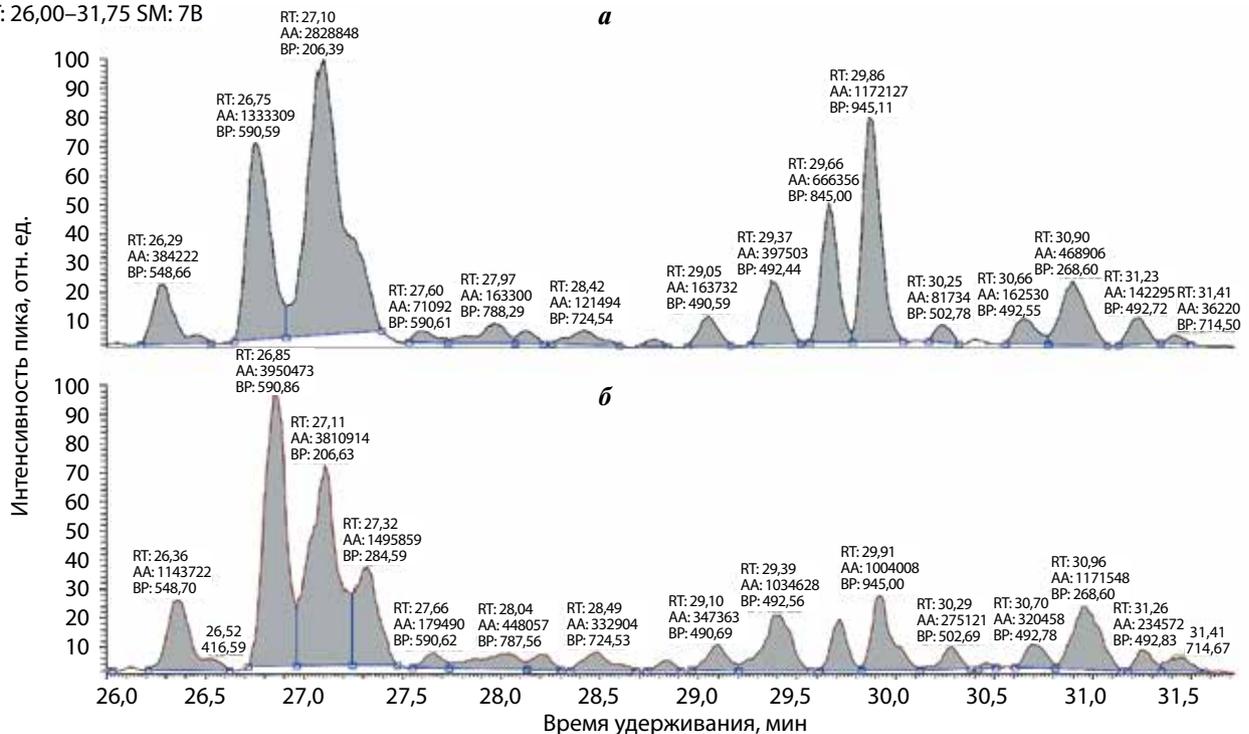


Рис. 6. Отрезки хроматограмм препаратов «Фитомикс-40» (а) и сравнения (б) во временном интервале 26–31,75 мин (присутствуют пики гинзенозидов Re и Rg₁)

Таблица 5. Результаты тандемной масс-спектрометрии (номера пиков соответствуют данным, представленным на рис. 2)

№ пика	—	ММ, г/моль	Данные МС, m/z
1	Re $C_{48}H_{82}O_{18}$	947,15	945,3 [M – H] ⁻ 799,1 [M – H – Rha] ⁻ 783,2 [M – H – Glc] ⁻ 637,1 [M – H – Glc – Rha] ⁻ 475,1 Agl.
2	Rf $C_{42}H_{72}O_{14}$	801,01	845,5 [M + FA – H] ⁻ 799,5 [M – H] ⁻ 637,5 [M – H – Glc] ⁻ 475,3 Agl.
4	Rg ₂ $C_{42}H_{72}O_{13}$	785,01	783,2 [M – H] ⁻ 636,8 [M – H – Rha] ⁻ 621,1 [M – H – Glc] ⁻ 475,1 Agl.
7	Ro $C_{48}H_{76}O_{19}$	957,1	955,3 [M – H] ⁻ 793,1 [M – H – Glc] ⁻ 631,1 [M – H – 2Glc] ⁻ 613,2 [M – H – 2Glc – H ₂ O] ⁻

Примечание: ММ – молекулярная масса, МС – масс-спектрометрический анализ, FA – муравьиная кислота, Glc – глюкоза, Agl. – агликон, FA – муравьиная кислота, m – масса иона; z – заряд иона, Rha – рамноза.

данных видно, что количество гинзенозидов Re, Rf и Rg₂ в препарате ФМ-40 превышает таковое в ПС в 3,06, 3,82 и 2,95 раза соответственно. В препарате ФМ-40 гинзенозидов Ro, малонил-Rb₁, -Rb₂/Rb₃/Rc и -Rd содержится соответственно в 2,94, 2,68, 2,9 и 3,47 раз больше, чем в ПС.

Таким образом, установлено, что в составе препарата ФМ-40 в сравнении с ПС присутствует в среднем в 3 раза больше всех идентифицированных (с использованием стандартов и по литературным данным) соединений женьшеня. Полученные результаты согласуются с различиями в составе фитокомпозиций (экстрактов растений-адаптогенов в ФМ-40 в 3 раза больше, чем в ПС) и тем самым подтверждают корректность данных исследований.

Выводы

В настоящих исследованиях установлены оптимальные условия разделения гинзенозидов на обращенно-фазовой колонке ACQUITY UPLC VEN C18 с использованием градиентного изократического элюирования. Оптимизированы условия работы источника ионизации пробы электрораспылением. Получен-

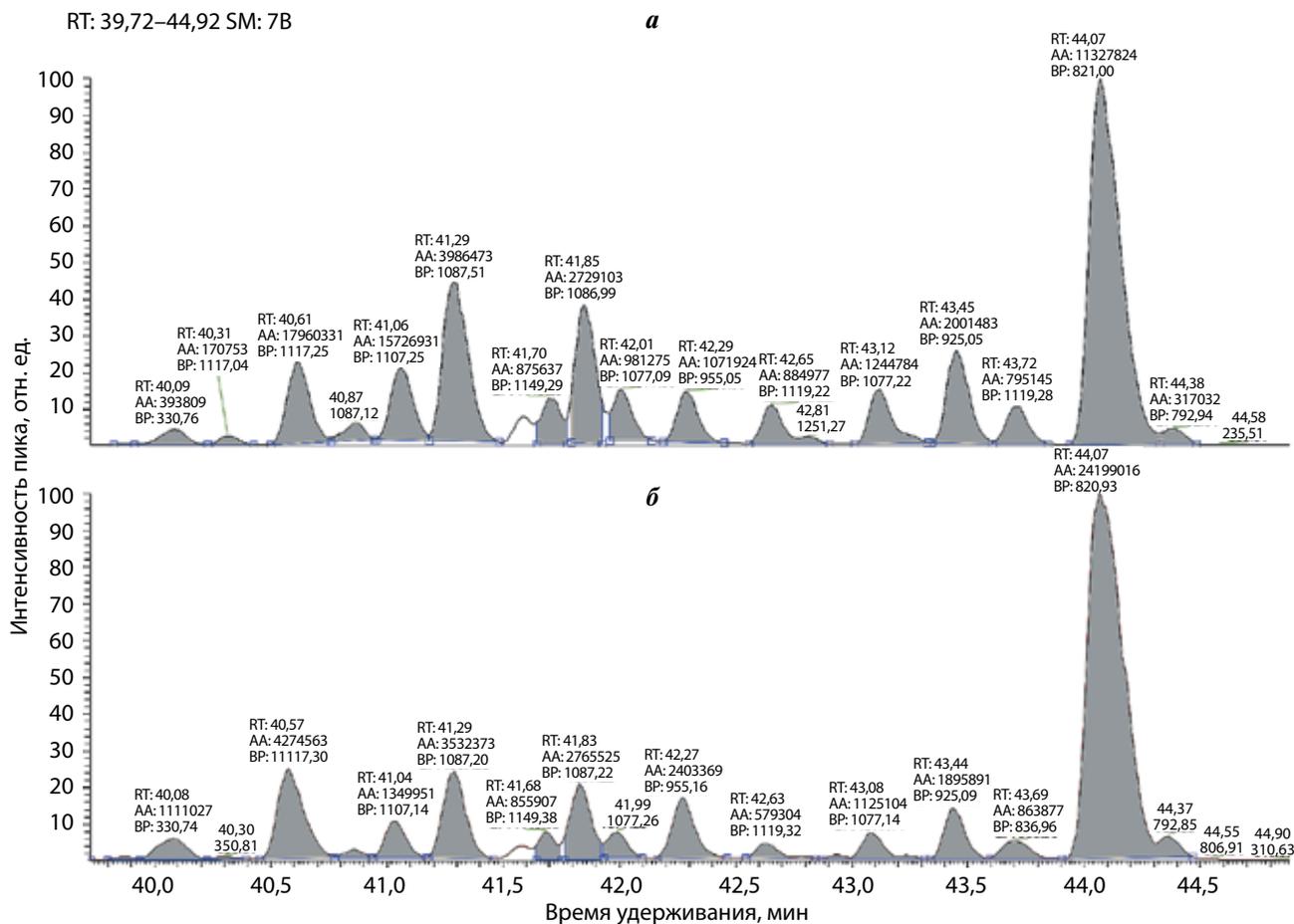


Рис. 7. Отрезки хроматограмм препаратов «Фитомикс-40» (а) и сравнения (б) во временном интервале 39,72–44,92 мин (присутствуют пики гинзенозидов Rb₁, Rc, Ro, Rb₂)

Таблица 6. Площади пиков гинзенозидов и их соотношение между препаратами ФМ-40, ПС (данные соответствуют хроматограммам, представленным на рис. 6 и 7)

Гинзенозид	R _t , мин	Площадь соответствующего пика на хроматограмме, ед. площади		Коэффициент соотношения веществ	
		ФМ-40	ПС	ФМ-40 и ПС	ФМ-40 и ПС с учетом поправочного множителя
Rg ₁	29,7	666 356	601 349	1,11	2,91
Rb ₁	41,1	1 572 693	1 349 951	1,16	3,05
Rc	42,0	981 275	856 113	1,14	2,99
Rb ₂	43,1	1 244 784	1 125 104	1,11	2,90
Rd	45,2	561 062	466 446	1,20	3,15

Примечание: R_t – время удерживания, ФМ-40 – фитомикс-40, ПС – препарат сравнения.

Таблица 7. Площади пиков гинзенозидов, идентифицированных на основании литературных данных, а также их соотношение между препаратами ФМ-40 и ПС (данные соответствуют хроматограммам, представленным на рис. 6 и 7)

Гинзенозид	R _t , мин	Площадь соответствующего пика на хроматограмме, ед. площади		Коэффициент соотношения веществ	
		ФМ-40	ПС	ФМ-40 и ПС	ФМ-40 и ПС с учетом поправочного множителя
Re	29,9	1 172 127	1 004 008	1,17	3,06
Rf	36,8	276 190	189 237	1,46	3,82
Rg ₂	39,4	143 357	127 381	1,13	2,95
Ro	42,3	1 071 924	953 369	1,12	2,94
Малонил-Rb ₁	41,7	875 637	855 907	1,02	2,68
Малонил-Rb ₂ /Rb ₃ /Rc	42,6	654 107	578 934	1,13	2,96
Малонил-Rb ₂ /Rb ₃ /Rc	43,7	795 145	712 569	1,12	2,92
Малонил-Rd	45,8	435 126	327 972	1,33	3,47

Примечание: ФМ-40 – фитомикс-40, ПС – препарат сравнения, R_t – время удерживания.

ные в ходе данной работы хроматограммы и спектры компонентов препарата могут быть использованы в качестве стандартов гинзенозидов. ВЭЖХ-МС/МС с использованием стандартов гинзенозидов и данных литературы была успешно применена для идентификации и количественного определения гинзенозидов

Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Rg₁, Rg₂, Re, Rf, Ro, малонил-Rb₁, -Rb₂/Rb₃/Rc и -Rd в качестве составляющих мультифитоадаптогена на примере ФМ-40. В результате определены подходы к стандартизации фитопрепаратов, в состав которых входят биологически активные вещества женьшеня, в том числе гинзенозиды.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бочарова О.А., Барышников А.Ю., Давыдов М.И. Фитоадаптогены в онкологии и геронтологии. М.: МИА. 2008.
2. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Барышников А.Ю. и др. Комплексные фитоадаптогены в онкологии и геронтологии. Вестник РАМН 2009;8:21–5.
3. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Крыжановский Г.Н. и др. Влияние комплексного фитоадаптогена на МФТП-индуцированный паркинсонический синдром у мышей. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006;141(5):495–8.
4. Бочаров Е.В., Кучеряну В.Г., Бочарова О.А., Карпова Р.В. Нейропротекторные свойства фитоадаптогенов. Вестник РАМН 2008;4:47–50.
5. Бочаров Е.В., Карпова Р.В., Казеев И.В. и др. Исследование радиозащитной активности мультифитоадаптогена

- в эксперименте на мышах. Патологическая физиология и экспериментальная терапия 2013;3:55–8.
6. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Голубева В.А. и др. Токсикологическое изучение препарата Фитомикс-40. Гигиена и санитария 1999;5:60–1.
 7. Бочарова О.А., Чекалина Т.Л., Мезенцева М.В. и др. Перспективы использования Фитомикс-40 для профилактической онкологии. Российский биотерапевтический журнал 2002;1(2):114.
 8. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Мезенцева М.В. и др. Фитоадаптоген для профилактической онкологии: иммунобиологические критерии состава. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2003;136(12):670–3.
 9. Бочарова О.А., Карпова Р.В., Ильенко В.А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатокарциногенезе мышей высокоракетной линии СВА. Российский биотерапевтический журнал. 2013;12(3):53–6.
 10. Карпова Р.В., Бочаров Е.В., Казеев И.В. и др. Радиозащитная эффективность мультифитоадаптогена в опытах на собаках. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2013;4:51–4.
 11. Куренная О.Н., Карпова Р.В., Бочарова О.А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. Генетика. 2013; 49(12):1364–9.
 12. Bocharova O.A., Kucheryanu V.G., Kruzhanovsky G.N. et al. Phytomix-40: antiparkinsonian and antioxidant activities. Abstracts of 2nd World Meeting on Pharmaceuticals, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology 1998:1161–2.
 13. Бочаров Е.В., Иванова-Смоленская И.А., Полещук В.В. и др. Возможности фитоадаптогена-нейропротектора при лечении нейродегенеративного заболевания (на примере болезни Паркинсона). Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2010;149(6):619–21.
 14. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л., Воронин В.Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. Методическое руководство для врачей. М.: ВУНМЦ, 2004.
 15. Бочарова О.А., Пожарицкая М.М., Чекалина Т.Л. и др. Лейкоплакия слизистой оболочки полости рта: патогенез и возможности коррекции фитоадаптогеном. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2004;138(12):652–7.
 16. Бочарова О.А., Матвеев В.Б., Карпова Р.В. и др. Коррекция клинических и иммунобиологических показателей у мужчин с доброкачественной гиперплазией предстательной железы фитоадаптогеном. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2006;141(5):555–9.
 17. Бочарова О.А., Давыдов М.И., Клименков А.А. и др. Перспективы применения фитоадаптогена в лечении распространенного рака желудка. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2009;148(7):96–9.
 18. Бочков Н.П., Бочарова О.А., Аксенов А.А. и др. Частота хромосомных aberrаций в лимфоцитах пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы. Медицинская генетика 2005;4(1):15–9.
 19. Багирова В.Л., Северцев В.А. Настойки, экстракты и их стандартизация. СПб: СпецЛит, 2001.
 20. Бочарова О.А., Куренная О.Н., Серебрякова Р.В., Бодрова Н.Б. Новый способ биологического тестирования препаратов адаптогенов. Биотехнология 1993(8):28–34.
 21. Бочарова О.А., Лыженкова М.А., Куренная О.Н., Княжев В.А. Способ биологического контроля комплексного фитоадаптогена. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2003;136(12):694–9.
 22. Бочарова О.А., Барышников А.Ю. Фитоадаптогены в онкологии. М.: ЗооМедВет, 2004.
 23. Зенкевич И.Г., Багирова В.Л., Сокольская Т.А., Нечаева Е.Б. Обзор физико-химических методов стандартизации настоек, экстрактов и эликсиров в ведущих странах Европы и Америки. Фармация 2002;1:43–5.
 24. Бочарова О.А. Композиция ингредиентов для препарата Фитомикс-40. Патент РФ № 2099410, 1998.
 25. Шейченко В.И., Бочарова О.А., Шейченко О.П. и др. Аналитические возможности метода ЯМР для определения компонентов препарата Фитомикс-40. Заводская лаборатория. Диагностика материалов 2006;2(8):15–23.
 26. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Определение химического состава летучих соединений фитоадаптогена «Фитомикс-40» методом хроматомасс-спектрометрии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2008;5:18–28.
 27. Шейченко О.П., Бочарова О.А., Крапивкин Б.А. и др. Исследование комплексного фитоадаптогена методом ВЭЖХ. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2012;10:52–9.
 28. Li H., Lee J.H., Ha J.M. Effective purification of ginsenosides from cultured wild ginseng roots, red ginseng and white ginseng with macroporous resins. J Microbiol Biotechnol 2008;18(11):1789–91. PMID: 19047822
 29. Liu Z., Li Y., Li X. et al. The effects of dynamic changes of malonyl ginsenosides on evaluation and quality control of Panax ginseng C.A. Meyer. J Pharm Biomed Anal 2012;64–65:56–63. doi: 10.1016/j.jpba.2012.02.005. Epub 2012 Feb 15. PMID: 22387101
 30. Morinaga O., Uto T., Yuan C.S. et al. Evaluation of a new eastern blotting technique for the analysis of ginsenoside Re in American ginseng berry pulp extracts. Fitoterapia 2010;81(4):284–8. doi: 10.1016/j.fitote.2009.10.005. Epub 2009 Oct 20. PMID: 19850112
 31. Wong V.K., Cheung S.S., Li T. et al. Asian ginseng extract inhibits in vitro and in vivo growth of mouse lewis lung carcinoma via modulation of ERK-p53 and NF-κB signaling. J Cell Biochem 2010;111(4):899–910. doi: 10.1002/jcb.22778. PMID: 20665661
 32. Chen G., Yang M., Song Y. et al. Comparative analysis on microbial and rat metabolism of ginsenoside Rb1 by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Biomed. Chromatogr. 2008;22(7):779–85. doi: 10.1002/bmc.1001. PMID:18384066
 33. Deng G.F., Wang D.L., Meng M.X. et al. Simultaneous determination of notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, Re, Rb1 and icariin in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed 2009;877(22):2113–22. doi: 10.1016/j.jchromb.2009.06.003. Epub 2009 Jun 10. PMID: 19541552
 34. Li X., Tang M.H., Zhang F. et al. Quantitative determination of ginsenoside Re and Rg1 in human plasma by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2009;40(5):912–7. PMID: 19950613
 35. Zhao Q., Zheng X., Jiang J. et al. Determination of ginsenoside Rg3 in human plasma and urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2010;878(24):2266–73. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.06.019. Epub 2010 Jun 25. PMID: 20673651

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ТРИМЕТИЛОВОГО ЭФИРА ХЛОРИНА E_6 И ЕГО ГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Е.А. Плотникова¹, Н.Б. Морозова¹, А.Д. Плотинская¹, Р.И. Якубовская¹,
В.И. Чиссов¹, М.А. Грин², А.Ф. Миронов²

¹ ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» – филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр., 3

² ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»; Россия, 119454 Москва, просп. Вернадского, 78

Контакты: Екатерина Александровна Плотникова plotnikovaekaterina62@gmail.com

Цель исследования – сравнение эффективности фотодинамического действия триметилового эфира хлорина e_6 (3MeChl) и его производного с остатком галактозы в пирроле А (3MeChl_gal_NoAc), а также сравнительная характеристика накопления этих соединений в опухоли и их биораспределения в нормальных органах и тканях животных.

Материалы и методы. Исследования в системе *in vitro* проводили на опухолевых клетках мышинной карциномы легкого Льюиса (LLC) в мультипараметрической системе. Фотоиндуцированную противоопухолевую активность и биораспределение 3MeChl и 3MeChl_gal_NoAc изучали на мышах BDF₁ с LLC. Биораспределение и фармакокинетику оценивали методом локальной флуоресцентной спектроскопии. Облучение проводили на 7-й день роста опухоли светодиодным источником с длиной волны 661 ± 16 нм при варьировании дозы фотосенсибилизаторов от 0,5 до 7,5 мг/кг и интервале времени между введением и облучением от 5 до 120 мин и при плотности энергии 90 Дж/см².

Результаты. В экспериментах на культивируемых клетках мышинной LLC установлено, что 3MeChl_gal_NoAc обладает более высокой фотоиндуцированной цитотоксичностью, чем его незамещенный предшественник: концентрация ФС, при которой наблюдается 50 % ингибирование клеток ($ИК_{50}$), составила $25 \pm 1,5$ нмоль и $171 \pm 4,0$ нмоль соответственно. При внутривенном введении мышам с подкожной LLC уровень нормированной флуоресценции в опухоли достигал максимальных значений для 3MeChl ($18,4 \pm 0,7$ отн. ед.) в течение 60 мин, для MeChl_gal_NoAc ($34,1 \pm 6,9$ отн. ед.) в течение 15 мин. Введение 3MeChl обеспечивало более высокий флуоресцентный контраст опухоли относительно нормальной кожи и мышечной ткани (до 7,4 и 4,1 соответственно), чем введение 3MeChl_gal_NoAc (до 5,0 и 2,5 соответственно). При сходном профиле биораспределения конъюгат 3MeChl_gal_NoAc быстрее, чем 3MeChl, элиминировался из организма мышей-опухолосителей. На модели подкожной LLC у мышей при внутривенном введении 3MeChl_gal_NoAc в дозе 5,0 мг/кг и интервале между введением фотосенсибилизатора и началом светового воздействия 5 мин (длительность облучения 15 мин, доза света 90 Дж/см²) получен высокий противоопухолевый эффект фотодинамической терапии – 100 % излеченных животных. Однако стремительное выведение галактозильного производного из ткани опухоли, низкая избирательность ее фотодинамического повреждения, а также узкий интервал высокоэффективных терапевтических доз значительно ограничивают перспективность применения данной модификации триметилового эфира хлорина e_6 для фотодинамической терапии злокачественных опухолей.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, гликозилированное производное хлорина e_6 , фотоиндуцированная противоопухолевая активность, биораспределение

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-47-54

SPECIFIC PROPERTIES OF CHLORIN E_6 TRIMETHYL ESTER AND ITS GLYCOLIZED DERIVATIVE AS PHOTSENSITIZERS *IN VITRO* AND *IN VIVO*

E.A. Plotnikova¹, N.B. Morozova¹, A.D. Plyutinskaya¹, R.I. Yakubovskaya¹, V.I. Chissov¹, M.A. Grin², A.F. Mironov²

¹ P. A. Herzen Moscow Oncology Research Institute, Branch National Medical Radiology Research Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy proezd, Moscow, 125284, Russia

² Moscow Technological University; 78 Vernadskiy proezd, Moscow, 119454, Russia

The aim of the study was to compare the biodistribution and the photodynamic efficacy of the chlorin e_6 trimethyl ester (3MeChl) and its galactose-substituted in pyrrole A derivative (3MeChl_gal_NoAc).

Materials and methods. *In vitro* experiments were carried out on cultivated murine Lewis lung carcinoma (LLC) cells using multiparametric mode. Biodistribution and therapeutic efficacy of 3MeChl 3MeChl_gal_NoAc were studied in BDF₁ mice bearing s. c. transplanted LLC. The biodistribution study was performed using local fluorescence spectroscopy. For evaluation of the photoinduced antitu-

mor activity the photosensitizer was administered *i. v.* on day 7 of tumor growth in doses varying from 0.5 to 7.5 mg/kg. The tumors were irradiated by LED source with a wavelength of the emitted light 661+/- 16 nm, at various drug-light time interval (from 5 to 120 min), and at energy density 90 J/cm².

Results. It was shown in cultured murine Lewis lung carcinoma cells that 3MeChl_gal_NoAc has higher photo-induced cytotoxicity than the unsubstituted compound (IC₅₀ value of 25 ± 1.5 nM and 171 ± 4.0 nM, respectively). When administered intravenously to mice with subcutaneous LLC a normalized fluorescence intensity of 3MeChl in tumor reached the maximum value (18.4 ± 0.7 a. u.) within 60 min, and for MeChl_gal_NoAc it reached the maximum value (34.1 ± 6.9 a. u.) within 15 min. A higher fluorescent contrast between tumor and normal skin or muscle was registered for 3MeChl (up to 7.4 and 4.1, respectively) than for 3MeChl_gal_NoAc (up to 5.0 and 2.5, respectively). Having similar biodistribution profile in normal organs and tissues of tumor-bearing mice, 3MeChl_gal_NoAc was eliminated from the body faster than 3MeChl. Intravenous administration of 3MeChl_gal_NoAc in dose of 5.0 mg/kg following 15 min light exposure (light dose 90 J/cm²) with a drug-light interval of 5 min caused a high antitumor effect, 100 % of animals were cured. However, a rapid elimination of the galactosyl derivative from the tumor tissue, a low selectivity of photodynamic damage of the tumor, as well as a narrow range of highly effective therapeutic doses considerably limit prospects for this modification of chlorin *e*₆ for photodynamic treatment of the malignant tumors.

Key words: photosensitizer, galactose-substituted chlorine *e*₆ derivative, photo-induced antitumour activity, biodistribution

Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) и флуоресцентная диагностика являются современными, интенсивно развивающимися методами лечения и диагностики злокачественных новообразований. ФДТ основана на разрушении опухолевого очага активными свободнорадикальными частицами, возникающими в результате взаимодействия предварительно введенного в организм и накапливающегося в опухолевой ткани фотосенсибилизатора (ФС) с лазерным излучением определенной длины волны. В настоящее время наибольшее распространение получили ФС 2-го поколения с интенсивным поглощением в области 660 нм. К ним относятся производные на основе природного хлорина *e*₆ – радахлорин и фотодитазин (Россия), фотолон (Белоруссия), МАСЕ (Япония) и мн. др. [1]. Эти флуорохромы существенно превосходят препараты 1-го поколения – фотофрин (Канада), фотогем (Россия), но все же обладают определенными недостатками. Так, в частности, при внутривенном введении производных хлорина *e*₆ уровень их накопления в опухолевых клетках остается достаточно низким, преимущественно это происходит в сосудах стромы опухоли [2].

Для повышения избирательности накопления флуорохромов в опухолевом очаге применяют различные наноразмерные носители – мицеллы, липосомы, металлические частицы – ниосомы, дендримеры, квантовые точки и др.; в качестве средств адресной доставки используют конъюгаты ФС с липопротеидами, моноклональными антителами, а также с лигандами, способными специфически связываться с рецепторами на поверхности опухолевых клеток [3].

Известно, что клетки многих злокачественных опухолей экспрессируют белки, специфично связывающие β-галактозиды. В связи с этим особое внимание привлекает возможность включения в структуру ФС остатков галактозы из-за возможности повышать селективность накопления соединений

в клетках-мишенях [4, 5–7, 8]. Кроме того, углеводные фрагменты являются структурными модификаторами, способствующими увеличению растворимости гидрофобных ФС в водных растворах [9].

Ранее нами был описан синтез ФС на основе триметилового эфира хлорина *e*₆ с углеводными заместителями в различных положениях макроцикла (в пирролах А и С или экзоцикле Е) и с максимумом поглощения при 665 ± 10 нм, изучены их физико-химические свойства и фотоиндуцированная цитотоксичность в формате скрининга *in vitro* на ряде культур опухолевых клеток человека (A549, HEP2 и HT29) [5, 6, 10]. Показано, что наибольшей активностью характеризуется производное с остатком галактозы в пирроле А, тогда как введение углеводных остатков в пиррол С или экзоцикл Е хлорина *e*₆ уменьшало фотоактивность красителя в 5–10 раз.

Целью данной работы являлось сравнение в системах *in vitro* и *in vivo* эффективности фотодинамического действия триметилового эфира хлорина *e*₆ и его производного с остатком галактозы в пирроле А, а также сравнительная характеристика их накопления в опухоли и биораспределения в нормальных органах и тканях животных.

Материалы и методы

Фотосенсибилизатор

Производные хлорофилла *a* – триметиловый эфир хлорина *e*₆ (3MeChl) и его конъюгат с остатком галактозы в пирроле А (3MeChl_gal_NoAc) – растворяли в кремофоре EL до конечной концентрации 1,5 ммоль. Разведения концентрированного раствора перед внесением в клеточную среду или для введения животным готовили на физиологическом растворе.

Исследования *in vitro*

Изучение фотоиндуцированной активности проводили на клетках мышинной карциномы легкого Льюиса (LLC), выделенных из солидной опухоли

и адаптированных нами для роста в культуре *in vitro*. Для культивирования клеток использовали среду «Игла-МЕМ» с добавлением L-глутамин и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (все – производства «ПанЭко», Россия).

Методика проведения фотодинамического воздействия *in vitro* подробно описана в предыдущей работе [10]. Фотоиндуцированную цитотоксичность оценивали, варьируя концентрацию ФС (от 9 нмоль до 15 мкмоль) и время инкубации клеток с ФС (от 15 мин до 6 ч). Световое воздействие проводили в дозе 10 Дж/см² в 2 модификациях: в присутствии красителя в среде инкубации и при замене перед облучением содержимого лунок на среду, не содержащую ФС. Выживаемость клеток после воздействия оценивали визуально под инвертированным световым микроскопом и с использованием колориметрического теста (МГТ-теста) [11].

Исследования *in vivo*

Животные. В работе использовали мышей-гибридов BDF₁, самок весом 18–22 г в возрасте 8–9 нед. LLC поддерживали в виде штамма на самцах мышей C57BL/6. Для экспериментов опухолевый материал прививали подкожно в область икроножной мышцы с внешней стороны бедра, по 10 мг измельченной опухолевой ткани на мышь в 0,05 мл физиологического раствора.

Изучение биораспределения ФС в органах и тканях животных. Проводилось методом локальной флуоресцентной спектроскопии контактным способом на лазерном спектральном анализаторе «ЛЭСА-6» («БИОСПЕК», Москва) [12]. ФС вводили внутривенно в дозе 5,0 мг/кг. Животных умерщвляли дислокацией шейных позвонков сразу после введения ФС и через различные промежутки времени (5 и 15 мин; 1, 2, 4, 24, 48 и 72 ч). Флуоресценцию измеряли *ex vivo* в опухоли, печени, почках, селезенке, жировой ткани, коже и скелетной мышце. Исследовали материал, полученный от 3 животных на каждый срок наблюдения. Накопление ФС в тканях оценивали по максимальным значениям нормированной флуоресценции (ФН) при длине волны, соответствующей максимуму флуоресценции соединений. Флуоресцентный контраст (ФК) рассчитывали как отношение ФН в опухоли к ФН в коже или мышечной ткани.

Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности. ФДТ у мышей проводили на 7-й день роста опухоли. К моменту выполнения ФДТ объем опухоли составлял 120 ÷ 150 мм³. Экспериментальные группы включали по 6 животных. Облучение проводили светодиодным источником с длиной волны 661 ± 16 нм (ФГУП ГНЦ «НИОПИК», Россия) по мультипараметрической системе: варьировали дозу красителей (0,5 ÷ 7,5 мг/кг) и интервал времени

между введением ФС и началом светового воздействия (интервал $\Delta_t = 5 \div 120$ мин). Варианты режима ФДТ изложены в разделе «Результаты». Плотность энергии составляла 90 Дж/см² при плотности мощности 100 мВт/см². В качестве анестезии применяли раствор дроперидола в дозе 0,25 мг/мышь внутривенно за 15 мин до сеанса ФДТ.

Оценку влияния ФДТ на рост опухолей проводили по общепринятым в экспериментальной онкологии критериям (в %): торможению роста опухоли (ТРО), увеличению продолжительности жизни (УПЖ) и критерию излеченности (КИ) [3]. Биологически значимым терапевтическим эффектом считали ТРО ≥ 70 %; УПЖ ≥ 50 %; КИ ≥ 25 %. Для статистической оценки различий между группами применяли U-критерий Манна–Уитни, расчеты проводили с использованием программы “Primer of Biostatistics” версии 4.03. Отличия считали достоверными при уровне значимости *p* менее 0,05.

Результаты и обсуждение

Исследования *in vitro*

При облучении клеток LLC в среде инкубации, содержащей ФС, максимальная фотоиндуцированная цитотоксичность 3MeChI зарегистрирована через 2 ч взаимодействия клеток и красителя (ИК₅₀ = 171 ± 4 нмоль), а для конъюгата 3MeChI_{gal}_NoAc – уже через 1 ч инкубации красителя с клетками (ИК₅₀ = 25 ± 1,5 нмоль). Дальнейшее увеличение до 6 ч времени инкубации ФС с клетками не влияло на выраженность фототоксического эффекта (рис. 1).

В тестах *in vitro* замена перед облучением культуральной среды на свежую, не содержащую ФС, позволяет косвенно оценить вклад фотоиндуцированного повреждения, обусловленного красителем, накопившимся внутри клеток. Облучение в свежей среде клеток, прединкубированных с 3MeChI в течение 2 ч и более, в 1,5 раза достоверно снижало фототоксический эффект красителя (рис. 1). В случае конъюгата 3MeChI_{gal}_NoAc в подобных условиях эксперимента снижения эффективности ФДВ после инкубации клеток с красителем в течение 1 ч и более не наблюдалось, т. е. фотоиндуцированная цитотоксичность галактозильного производного хлорина *e*₆ преимущественно реализуется за счет фотоактивации внутриклеточного ФС.

В отсутствие светового воздействия 24-часовая инкубация клеток с 3MeChI или 3MeChI_{gal}_NoAc в концентрациях до 15 мкмоль не оказывала цитотоксического действия на клетки.

Таким образом, хлорин *e*₆ с остатком галактозы в пирроле А эффективнее накапливается в культивируемых клетках LLC и обладает более высокой фотоиндуцированной активностью по сравнению с незамещенным красителем, что согласуется с дан-

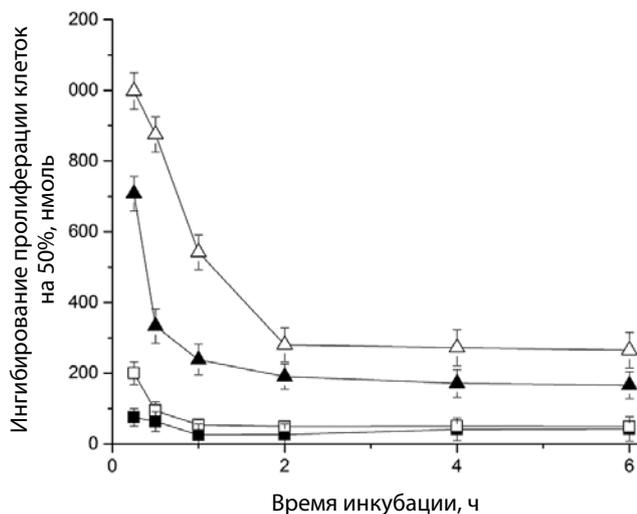


Рис. 1. Фотоиндуцированная цитотоксичность 3MeChI (треугольные символы) и конъюгата 3MeChI_gal_NoAc (квадратные символы) *in vitro* в зависимости от длительности инкубации клеток LLC с красителями. Темные символы (■ и ▲) – облучение в присутствии красителя в среде, светлые символы (□ и △) – облучение после предварительной замены среды, содержащей краситель, на свежую

ными, полученными ранее на других клеточных культурах [3].

Исследования *in vivo*

Биораспределение ФС в органах и тканях животных. Уровень флуоресценции ФС в тканях, как правило, коррелирует с содержанием в них мономерной формы красителя, способной инициировать повреждающие фотохимические реакции в процессе облучения. Таким образом, исследование нормированной флуоресценции ФС позволяет оценить особенности распределения фотоактивной формы соединения в организме.

При анализе спектров флуоресценции, полученных *ex vivo* после внутривенного введения мышам 3MeChI или 3MeChI_gal_NoAc, установлено, что максимум флуоресценции для обоих красителей в органах и тканях животных регистрируется при 671 ± 2 нм.

Оба исследованных производных хлорина e_6 при внутривенном введении сравнительно быстро поступают в ткань опухоли, а также во внутренние органы и ткани животных.

Для 3MeChI уровень ФН в LLC достигает максимального значения через 60 мин после введения красителя и в среднем составляет $18,4 \pm 0,7$ отн. ед. Для конъюгата 3MeChI_gal_NoAc максимальное значение ФН в опухоли регистрируется уже через 15 мин после инъекции раствора ФС и в среднем составляет $34,1 \pm 6,9$ отн. ед. Таким образом, максимальный зарегистрированный показатель ФН в опухоли для галактозильного производного в 1,8 раза превышает соответствующую величину для незамещенного соединения.

Через 72 ч средний уровень ФН в опухоли составляет 36,9 % от максимального зарегистрированного значения для 3MeChI и снижается до 2,9 % от максимального значения для 3MeChI_gal_NoAc. Характер динамики изменения показателей ФН свидетельствует о более длительном удержании незамещенного 3MeChI в опухолевой ткани (рис. 2).

Среди нормальных органов и тканей повышенное накопление 3MeChI зарегистрировано в печени, почках и селезенке, а 3MeChI_gal_NoAc – в печени и почках.

Уже в 1-е сут содержание обоих ФС во внутренних органах достигает минимальных значений, однако скорость выведения из внутренних органов 3MeChI_gal_NoAc и незамещенного красителя существенно различается (рис. 3). Так, уже через 4 ч после внутривенного введения красителей уровень ФН для 3MeChI в печени и почках снижается на 44 и 26 %

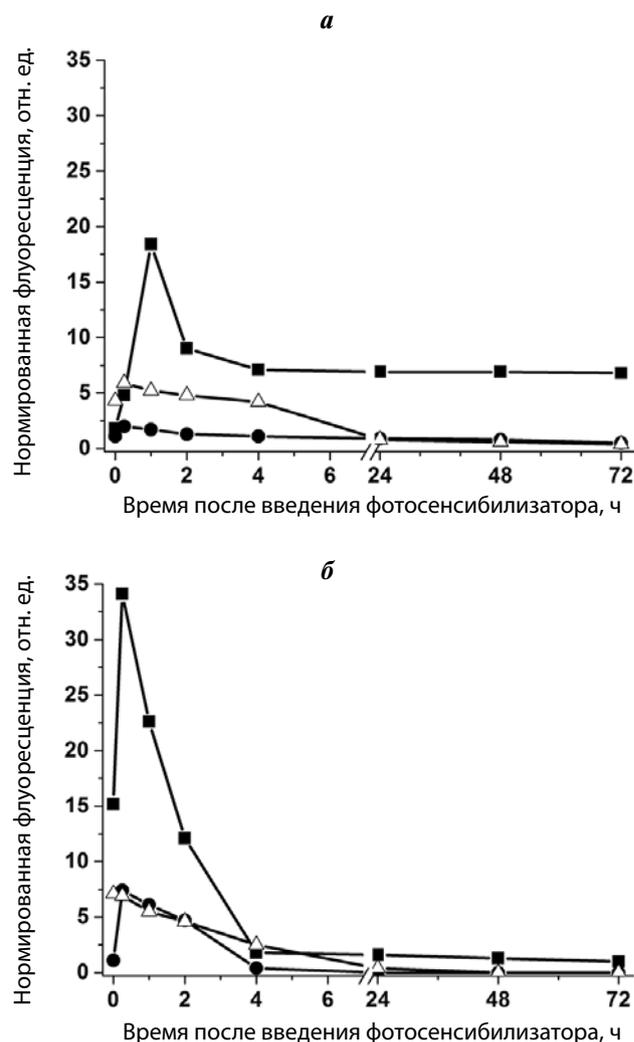


Рис. 2. Уровни нормированной флуоресценции 3MeChI (а) и 3MeChI_gal_NoAc (б) в коже (●), мышце (△) и опухоли (■) у мышей с подкожно привитой LLC на различные сроки после внутривенного введения красителей

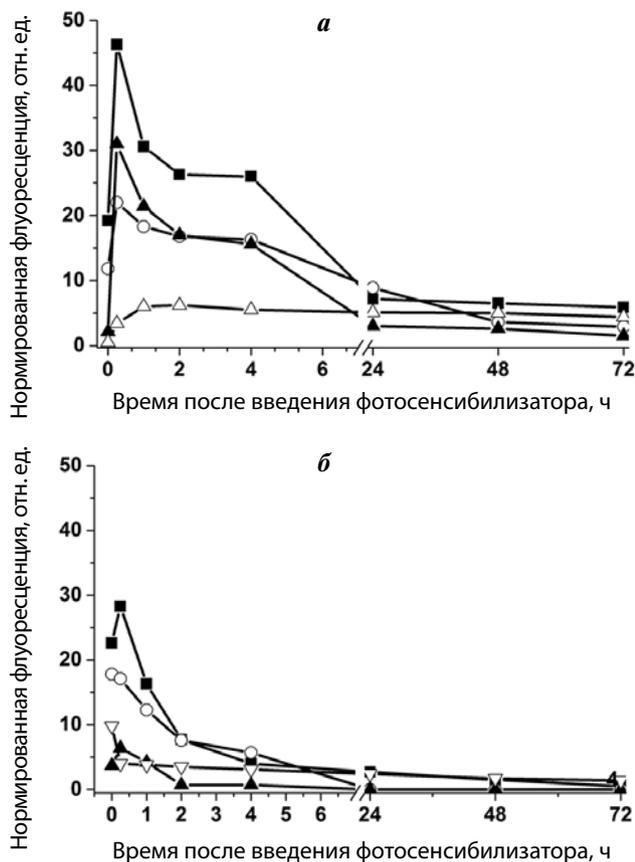


Рис. 3. Уровни нормированной флуоресценции 3MeChl (а) и 3MeChl_gal_NoAc (б) в почках (○), печени (■), селезенке (▲) и жировой ткани (△) у мышей с подкожно привитой LLC на различных сроках после внутривенного введения красителей

от максимального значения соответственно, для 3MeChl_gal_NoAc – на 85 % и 68 % соответственно.

В почках через 24 ч после введения 3MeChl показатель ФН красителя снижается на 60 % от максимального значения, через 72 ч – на 87 %. Для конъюгата 3MeChl_gal_NoAc снижение уровня ФН в почках через 24 ч составляет 87 % от максимального значения, а через 72 ч его флуоресценция в почках не определяется.

В печени через 24 ч после введения 3MeChl наблюдается снижение показателя ФН красителя на 84 %, однако через 72 ч показатель ФН сохраняется почти на том же уровне (87 %). Флуоресценция 3MeChl_gal_NoAc в печени через 24 ч снижается на 90 %, а через 72 ч – на 98 % от максимального значения.

Показатель ФН в мышечной и жировой тканях для 3MeChl, по сравнению с максимально зарегистрированным значением, через 3 сут снижается на 93 и 29 % соответственно. Флуоресценция 3MeChl_gal_NoAc в этих тканях не определяется уже через 48 ч (рис. 2 и 3).

Полученные данные свидетельствуют о более быстрой элиминации 3MeChl_gal_NoAc из организмов мышей, по сравнению с незамещенным 3MeChl,

и о преимущественном выведении обоих соединений через выделительные системы почек и печени.

Важной характеристикой ФС в аспекте его потенциального клинического применения является величина ФК опухоли относительно прилежащих к опухоли нормальных тканей.

ФК опухоли LLC относительно нормальной кожи (ФК₁) для незамещенного 3MeChl резко возрастает в течение первого часа после внутривенного введения красителя до величины $7,8 \pm 0,3$, затем несколько снижается и в интервале от 24 до 72 ч наблюдения варьирует в диапазоне 5,0–7,4. Сходные изменения для 3MeChl претерпевает величина ФК опухоли относительно скелетной мышцы (ФК₂) с той разницей, что в интервале от 24 до 72 ч после введения красителя наблюдается тенденция к увеличению ФК₂ до 3,6–4,1 (рис. 4, а).

Для 3MeChl_gal_NoAc максимальная величина ФК₁ регистрируется сразу после введения флуорохрома и составляет $8,5 \pm 0,3$, затем ФК₁ существенно снижается до 3,1–5,0 и сохраняется на этом уровне в течение 72 ч. Значение ФК₂ для 3MeChl_gal_NoAc кратковременно увеличивается через 15 мин после введения красителя до $4,2 \pm 0,2$ и в течение 72 ч наблюдения сохраняется на уровне величин 1,5–2,5 (рис. 4, б).

Фотоиндуцированная противоопухолевая активность ФС у мышей с LLC. Для корректного сравнения в системе *in vivo* фотоиндуцированного противоопухолевого эффекта, обусловленного незамещенным 3MeChl или его гликозилированным производным, эксперименты проводили по мультипараметрической системе, варьируя дозы красителей и интервал Δ_t .

Наилучшие результаты ФДТ с использованием 3MeChl на модели подкожной LLC получены при начале облучения опухоли через 15 мин после внутривенного введения красителя. Уменьшение интервала Δ_t до 5 мин или его увеличение до 1 или 2 ч при фиксированной дозе 3MeChl достоверно снижало эффективность ФДТ.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, высокий противоопухолевый эффект воздействия достигается при использовании 3MeChl в дозах 2,5 мг/кг и выше: ТРО составляет 100 % и сохраняется на этом уровне до 19 сут наблюдения после начала лечения, величина УПЖ достигает 86–120 %. Однако высокий показатель излеченности животных (КИ = 100 % при наблюдении за животными 120 сут после лечения) зафиксирован только в группах мышей, получавших 3MeChl в дозах 5,0 и 7,5 мг/кг.

При всех исследованных режимах ФДТ с 3MeChl не зафиксировано гибели животных в ранние или отдаленные сроки после лечебной процедуры.

Наибольший противоопухолевый эффект ФДВ с галактозильным производным на модели подкожной LLC достигается при использовании

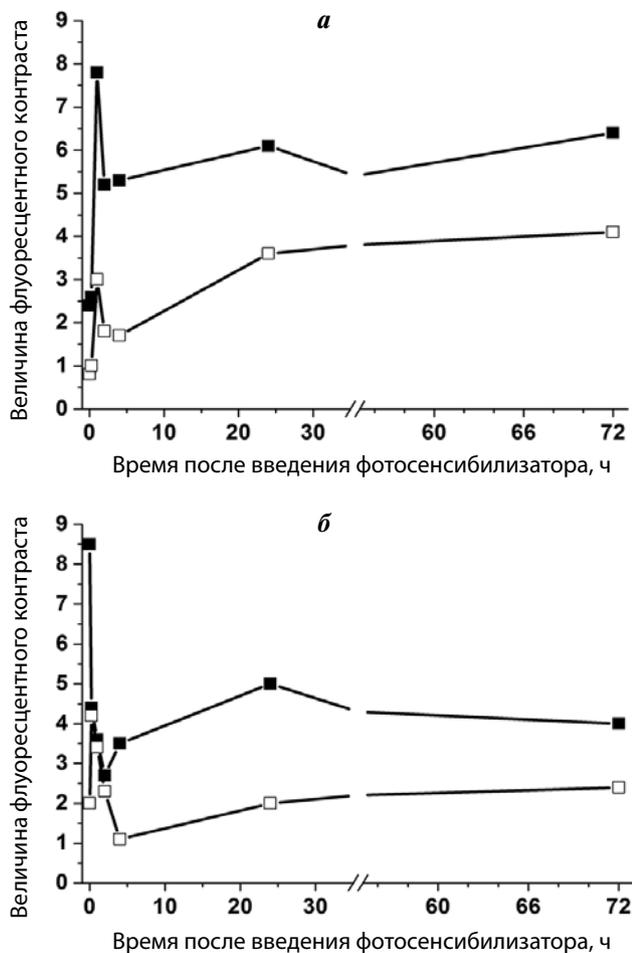


Рис. 4. Величина флуоресцентного контраста опухоли относительно кожных покровов (■) и мышечной ткани (□) для 3MeChl (а) и 3MeChl_gal_NoAc (б) на различных сроках после внутривенного введения красителей мышам с подкожно привитой LLC

3MeChl_gal_NoAc в дозе 5,0 мг/кг с интервалом $\Delta t = 5$ мин: ТРО = 100 %, УПЖ = 100 %, КИ = 100 % (табл. 2). При этом отмечено, что фотоиндуцированное

повреждение тканей не ограничивается опухолевым узлом и практически совпадает с размером светового пятна. Это указывает на низкую избирательность ФДТ в данном режиме воздействия.

При фиксированном интервале Δt (5 мин) отмечена выраженная зависимость фотодинамических эффектов от дозы галактозильного производного хлорина e_6 (табл. 2). Так, в отличие от незамещенного 3MeChl, снижение дозы 3MeChl_gal_No до 2,5 мг/кг приводит к заметному снижению противоопухолевой эффективности ФДТ, а при увеличении дозы 3MeChl_gal_NoAc до 7,5 мг/кг наблюдается гибель животных сразу после проведения сеанса ФДТ.

Увеличение интервала времени до 15 и 120 мин приводило к резкому снижению величины ТРО до биологически незначимых величин (рис. 5). Кроме того, при интервале Δt , равном 15 или 120 мин, не зафиксировано излеченности животных в экспериментальных группах.

Заключение

Таким образом, в сравнительном исследовании выявлены как общие свойства, так и существенные отличия триметилового эфира хлорина e_6 и его галактозильного производного.

На культивируемых клетках мышинной LLC установлено, что включение в пиррольное кольцо А остатка галактозы существенно увеличивает фотоиндуцированную цитотоксичность 3MeChl в системе *in vitro*, предположительно, за счет более эффективного проникновения красителя в клетки.

На модели подкожной LLC у мышей показано, что как 3MeChl, так и 3MeChl_gal_NoAc после внутривенного введения практически мгновенно регистрируются в опухоли и основных внутренних органах животных. При этом показатели ФН в опухоли достигают максимальных значений в течение 60 мин для 3MeChl и 15 мин

Таблица 1. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с 3MeChl у мышей с карциномой легкого Льюиса в зависимости от дозы фотосенсибилизатора*

Доза ФС, мг/кг	Торможение роста опухоли, %					УПЖ, %	КИ, %
	Время наблюдения за животными после ФДТ, сут						
	7	10	14	17	19		
0,5	50,5	45,2	33,4	17,8	10,4	2,1	0
1,0	52,3	51,6	48,5	34,2	22,7	13,4	0
2,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	86,0	25,0
5,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	120,0	100,0
7,5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	120,0	100,0

*Интервал между введением красителя и облучением — 15 мин, доза света — 90 Дж/см². Сокращения (здесь и в табл. 2): ФС — фотосенсибилизатор, ФДТ — фотодинамическая терапия, УПЖ — увеличение продолжительности жизни, КИ — критерий излеченности.

Таблица 2. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с 3MeChI_gal_NoAc у мышей с карциномой легкого Льюиса в зависимости от дозы фотосенсибилизатора*

Доза ФС, мг/кг	Торможение роста опухоли, %					УПЖ, %	КИ, %
	Время наблюдения за животными после ФДТ, сут						
	7	10	14	17	19		
0,5	53,0	30,9	36,2	38,2	34,7	2,8	0
1,0	57,1	41,6	20,5	13,2	12,4	4,5	0
2,5	72,4	69,2	60,1	64,2	55,9	25,0	25,0
5,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	120,0	100,0
7,5	Гибель животных в течение 2 сут после ФДТ						

*Интервал между введением красителя и облучением – 5 мин, доза света – 90 Дж/см².

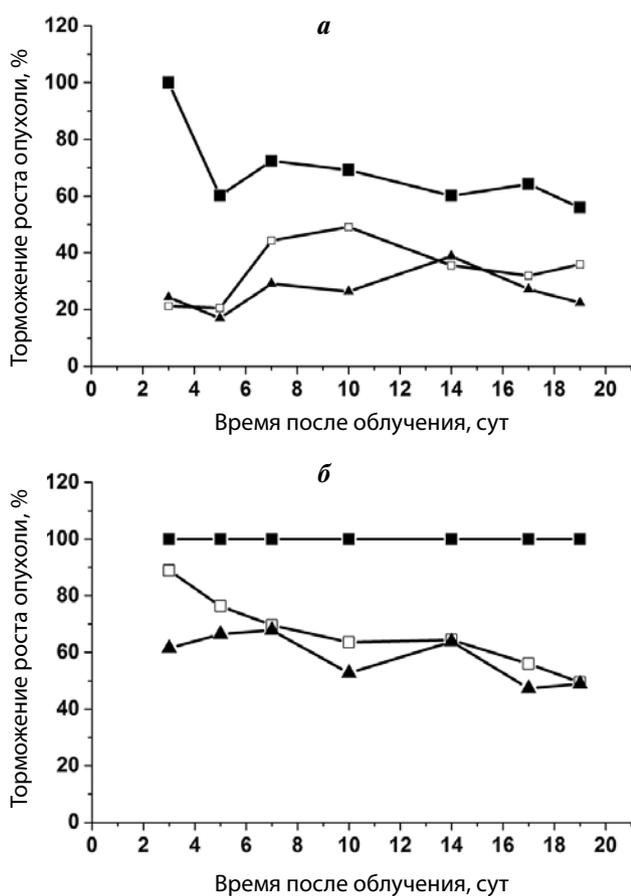


Рис. 5. Противоопухолевая эффективность фотодинамической терапии с 3MeChI_gal_NoAc в дозе 2,5 мг/кг (а) или 5 мг/кг (б) на модели подкожной LLC у мышей в зависимости от интервала времени между внутривенным введением красителя и облучением (■ – 5 мин, □ – 15 мин, ▲ – 120 мин)

для 3MeChI_gal_NoAc. Незамещенный 3MeChI в остаточных количествах задерживается в организме животных до 72 ч, в то время как конъюгат 3MeChI_gal_NoAc к этому времени практически полностью элиминируется из организма мышей-опухоленосителей.

Как незамещенный 3MeChI, так и его производное с галактозой в пирроле А позволяют достичь высокого противоопухолевого эффекта на модели подкожной LLC при оптимально подобранных режимах проведения ФДТ. При этом стоит отметить, что в случае использования 3MeChI, даже с учетом длительности накопления необходимой дозы света, световое воздействие приходилось на интервал времени, в котором показатель ФН для данного красителя в опухолевой ткани еще не достиг своего максимума. Наиболее вероятно, что первичной мишенью фотодинамического действия 3MeChI на данной модели является система кровеносных сосудов, эндотелий которых в ранние сроки после внутривенного введения ФС более доступен для взаимодействия с красителем, чем клетки солидного опухолевого образования. Максимум противоопухолевого эффекта ФДТ с 3MeChI_gal_NoAc по времени соответствовал зарегистрированному пику накопления его мономерной формы в опухоли. Кратковременность периода максимального накопления 3MeChI_gal_NoAc в опухоли делает затруднительным в этом случае предположение о потенциальной структурной мишени в опухолевой ткани.

Более долгое удержание в ткани незамещенного 3MeChI создает условия для проведения адекватного сеанса облучения, в то время как стремительное выведение конъюгата 3MeChI_gal_NoAc оставляет лишь короткое время для светового воздействия на опухоль после введения красителя, что технически осложняет проведение сеанса ФДТ. Кроме того, сравнительно низкий ФК опухоли, зарегистрированный для галактозильного производного, который приводит к повреждению окружающих нормальных тканей при облучении опухоли, а также узкий интервал высокоэффективных терапевтических доз значительно ограничивают перспективы применения данной модификации триметилового эфира хлорина е₆ для ФДТ злокачественных опухолей.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Якубовская Р.И., Морозова Н.Б., Панкратов А.А. и др. Экспериментальная фотодинамическая терапия: 15 лет развития метода. Российский химический журнал 2013;2:10–30.
2. Yakubovskaya R.I., Plotnikova E.A., Plutinskaya A.D. et al. Photophysical properties and *in vitro* and *in vivo* photoinduced antitumor activity of cationic salts of meso-tetra(N-alkyl-3-pyridyl) bacteriochlorin. J Photochem Photobiol B. 2014;130:109–14. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.017. Epub 2013 Nov 17.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: Ч. 1. М.: Гриф и К., 2012:657–71.
4. Назарова А.И., Феофанов А.В., Кармакова Т.А. и др. Влияние заместителей на фотохимические и биологические свойства 13,15-N-циклоимидных производных хлорина е6. Биоорганическая химия 2005;31(5):535–48.
5. Grin M.A., Lonin I.S., Lakhina A.A. et al. 1,3 – dipolar cycloaddition in the synthesis of glycoconjugates of natural chlorins and bacteriochlorins. J Porphyrins Phthalocyanines 2009;13:336–45.
6. Grin M.A., Lonin I.S., Makarov A.I. et al. Synthesis of chlorin-carbohydrate conjugates by «click chemistry». Mendeleev Commun 2008;18(3):135–7.
7. Park Y.K., Bold B., Cui B.C. et al. Binding Affinities of Carbohydrate-Conjugated Chlorins for Galectin-3. Bull Korean Chem Soc 2008;29(1):130–4.
8. Zhang M., Zhang Z., Blessington D. et al. Porphyrinophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters. Bioconjugate Chem 2003;14(4):709–14. PMID: 12862422.
9. Ahmed S., Davoust E., Savoie H., Boa A.N., Boyle R.W. Thioglycosylated cationic porphyrins – convenient synthesis and photodynamic activity *in vitro*. Tetrahedron Letters 2004;45(31):6045–7.
10. Якубовская Р.И., Плютинская А.Д., Плотникова Е.А. и др. Эффективность в системе *in vitro* гликозилированных производных триметилового эфира хлорина е₆ в зависимости от положения углеводного фрагмента в макроцикле. Фотодинамическая терапия и фотодиагностика 2014;2:3–7.
11. Carmichael J., De Graft W.G., Gazdar A.E. et al. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987;47:936–42. PMID:3802100.
12. Морозова Н.Б. Экспериментальное изучение нового фотосенсибилизатора «Фталосенс» для фотодинамической терапии злокачественных новообразований. Дис. ... канд. биол. наук. М. 2007.

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ ПРОИЗВОДНОГО ИНДОЛОКАРБАЗОЛА ЛХС-1208

И.Д. Гулякин, А. Хашем, Л.Л. Николаева, М.В. Дмитриева, Д.А. Афанасьева,
М.А. Барышникова, Н.А. Оборотова, А.В. Ланцова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва,
Каширское шоссе, 24

Контакты: Илья Дмитриевич Гулякин ilya.gulyakin@yandex.ru

Цель исследования – создание стабильной липосомальной лекарственной формы отечественного гидрофобного противоопухолевого соединения из группы производных индолокарбазолов – ЛХС-1208.

Материалы и методы. Количественное содержание препарата в липосомах определяли спектрофотометрическим методом с использованием стандартного образца при $\lambda = 320 \pm 2$ нм. Эффективность включения рассчитывали по соотношению концентрации препарата в липосомальной дисперсии после фильтрации через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с порами диаметром 0,22 мкм на экструдере к концентрации ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии до фильтрации. Определяли рН липосом методом потенциометрии. Размер липосом изучали с использованием наносайзера. Цитотоксическую активность изучали в МТТ-тесте.

Результаты. Были получены и проанализированы экспериментальные модели составов липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208 с различными молярными соотношениями компонентов. Выбран состав со следующими молярными соотношениями ЛХС-1208: лецитин – 1:150 и лецитин : холестерин : PEG-2000 – 1:0,2:0,003. В данном составе наблюдался максимальный уровень включения ЛХС-1208 (94 %) в липосомы с наиболее приемлемым размером везикул (185 ± 10 нм). Изучена цитотоксическая активность липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208, концентрация вещества, вызывающая гибель 50 % клеток (IC_{50}), составила 1,24 мкг/мл.

Заключение. В результате проведения комплекса фармацевтических исследований определен оптимальный состав компонентов и разработана технология получения липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208.

Ключевые слова: ЛХС-1208, липосомы, стерилизующая фильтрация, наносайзер

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60

THE DEVELOPMENT OF NEW TECHNOLOGY OF THE DOSAGE FORM FOR INTRAVENOUS ADMINISTRATION INDOLOCARBAZOLE DERIVATIVE LHS-1208

I.D. Gulyakin, A. Hashem, L.L. Nikolaeva, M.V. Dmitrieva, D.A. Afanasieva, M.A. Baryshnikova, N.A. Oborotova, A.V. Lantsova
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Objective. Aim of this work was to create a stable liposomal dosage form of native hydrophobic antitumor compound from the group of indolocarbazoles – LHS-1208.

Materials and methods. Quantitative analysis of the drug content in liposomes was determined by spectrophotometry with a standard sample at $\lambda = 320 \pm 2$ nm. The encapsulation was investigated as the ratio of LHS-1208 concentration in the liposomal dispersion after extrusion through nylon membrane filters 0.22 μ m “Pall” to concentration LHS-1208 in liposomal dispersions before filtration. pH of the liposome was determined by the method of potentiometry. The size of liposomes was evaluated by nanosizer. Cytotoxic activity was studied by MTT-test.

Results. Experimental liposomal models of LHS-1208 with different molar ratios of the components were obtained and analyzed. Composition with the molar ratios LHS-1208: lecithin 1:150, and lecithin : cholesterol : PEG-2000 – 1:0,2:0,003 was selected. Encapsulation percentage of LHS-1208 was 94 % and size of the vesicles was 185 ± 10 nm. Cytotoxic activity of liposomal LHS-1208 was studied, IC_{50} was 1.24 μ g/ml.

Conclusion. As a result of complex pharmaceutical research determined the optimum composition of the components and the technology for production of liposomal dosage form LHS-1208.

Key words: LHS-1208, liposomes, sterilizing filtration, nanosayzer

Введение

Актуальной задачей онкологии является создание новых отечественных противоопухолевых препаратов, избирательно разрушающих опухолевую ткань [1–4]. Среди широкого спектра химических соединений особый интерес представляют препараты из группы производных индолокарбазолов. N-гликозиды замещенных индоло[2,3-а]карбазолов и родственных соединений – это группа синтетических соединений, обладающих противоопухолевой, антибактериальной и иммуномодулирующей активностью [5–8].

Значительные успехи фундаментальной медицины в изучении механизма злокачественной трансформации клеток и процесса метастазирования новообразований позволили определить новые мишени воздействия потенциальных противоопухолевых средств. Отличительной особенностью механизма действия препаратов группы производных индокарбазолов является способность взаимодействовать с несколькими мишенями и индуцировать различные пути гибели опухолевых клеток. Для этих соединений такими мишенями служат топоизомеразы, ДНК и протеинкиназы [9–12].

В настоящее время работу по исследованию возможностей получения новых препаратов на основе производных индокарбазолов проводит НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [13]. В лаборатории химического синтеза синтезирована субстанция производного индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1208, для которой в лаборатории разработки лекарственных форм создана модель лекарственной формы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 9 мг» (ЛХС-1208-лио) [14–18]. Доклинические исследования показали высокий противоопухолевый эффект разработанной лекарственной формы ЛХС-1208 на опухолях различного гистогенеза, а также установлено преимущество данного препарата по длительности противоопухолевого действия в сравнении с иринотеканом. Кроме того, изучены механизмы противоопухолевого действия ЛХС-1208 [19, 20]. В результате изучения «острой» токсичности ЛХС-1208-лио были получены расчетные токсические дозы при внутрибрюшинном применении у мышей, самок и самцов [21].

Однако при изучении «субхронической» токсичности ЛХС-1208-лио установлено, что препарат вызывает недозозависимые изменения на электрокардиограмме: увеличение интервалов PQ и QT, понижение вольтажа зубца R и выпадение зубца R (нарушение сердечного ритма), что свидетельствует о нарушении электрической проводимости. Эти изменения могут расцениваться как признаки кардиотоксичности [22]. Разработка липосомальной лекарственной формы (ЛЛФ) может решить вопрос об устранении дан-

ных побочных эффектов, поскольку липосомальные препараты в незначительном количестве проникают в миокард и скелетные мышцы [23].

Низкая избирательность противоопухолевого действия цитотоксических препаратов приводит к дозозависимому эффекту, ограничивающему их применение в клинике. Чем больше доза препарата, тем выше терапевтический эффект и тем больше токсических проявлений [24]. Противоопухолевые препараты отличаются от других лекарств высокой агрессивностью, химической нестабильностью во внешней среде и сильным местнораздражающим действием. В связи с этим большинство препаратов выпускаются в виде жидких или лиофилизированных растворов и применяются в виде внутривенных инфузий. Эти свойства могут меняться с изменением лекарственной формы препарата и путей его введения. Терапевтические подходы к совершенствованию химиотерапии рака сфокусированы на разработке новых систем доставки лекарств непосредственно к злокачественной клетке без повреждения нормальной ткани [25].

По сравнению с обычными инъекционными растворами применение ЛЛФ имеет преимущества. Включение лекарственных веществ в липосомы снижает концентрацию свободных препаратов в кровяном русле и препятствует их ферментативному разрушению и, следовательно, их быстрому выведению почками, за счет изменения фармакокинетики и биораспределения препарата снижается общая токсичность и возрастает терапевтический индекс. Кроме того, липосомы преодолевают множественную лекарственную устойчивость, они биodeградируемы и не вызывают иммунного ответа [26–31].

Цели исследования – создание стабильной ЛЛФ ЛХС-1208, а также изучение и оценка ее цитотоксической активности в сравнении с ранее разработанной лекарственной формой.

Материалы и методы

Препараты и реактивы

Субстанция ЛХС-1208 (аминоиндокарбазол) – аморфный порошок оранжевого цвета без запаха (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, патент РФ № 2548045); яичный фосфатидилхоллин – лецитин Е РС S (Lipoid, Германия); холестерин (Sigma, Япония); пегелированный дистеароилфосфатидилэтанолламин PEG-2000-DSPE (Lipoid, Германия); ацетон стабилизированный, химически чистый («Химмед», Россия); хлороформ стабилизированный, химически чистый («Химмед», Россия); спирт этиловый 95 % (ФС. 2.1.0036.15, «РосБио», Россия).

Приборы и аппаратура

Весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), весы лабораторные Sartorius LA 1200 S (Sar-

torius AG, Германия), рН-метр HANNA pH 211 (Hanna Instruments, Германия), испаритель ротаторный Rotavapor R-200 (BUCHI Labortechnik AG, Швейцария), экструдер Lipex™ Thermobarrel Extruder на 10 мл (Northern Lipids Inc., Lipids Biomembranes, Inc., Канада), нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с порами диаметром 1,2 мкм, 0,45 мкм и 0,22 мкм (Pall Corporation, США; ООО «Палл Евразия», Россия), гомогенизатор Microfluidizer M-110S (Michael Benalt Inc., США), наносайзер Nicomp-380 Submicron Particle Sizer (Particle Sizer Systems, США), спектрофотометр Cary 100 (Varian, Inc., Австралия).

Количественное определение ЛХС-1208 в липосомах

Количественное содержание препарата в липосомах определяли спектрофотометрическим методом с использованием стандартного образца (СО) при $\lambda = 320 \pm 2$ нм. Оптическую плотность спиртовых растворов липосомального ЛХС-1208 и СО измеряли в кювете с толщиной оптического слоя 10 мм относительно 95 % этилового спирта. Концентрацию ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии (мг/мл) рассчитывали по формуле

$$X = \frac{A_1 \cdot V_1 \cdot \alpha}{A_0 \cdot V_0},$$

где A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО ЛХС-1208; α – навеска СО; V_1 – величина разбавления испытуемого раствора; V_0 – величина разбавления СО.

Определение степени включения ЛХС-1208 в липосомы

В связи с тем, что ЛХС-1208 является гидрофобным веществом и при получении липосом включается непосредственно в липидный бислой, эффективность включения рассчитывали по соотношению концентрации препарата в липосомальной дисперсии после фильтрации через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с порами диаметром 0,22 мкм на экструдере к концентрации ЛХС-1208 в липосомальной дисперсии до фильтрации. Показатель выражали в процентах:

$$\text{ЭВ} = \frac{C_{\text{ф}}}{C_{\text{п}}} \times 100 (\%),$$

где ЭВ – эффективность включения, %; $C_{\text{ф}}$ – концентрация ЛХС-1208 в дисперсии после фильтрации, мг/мл; $C_{\text{п}}$ – концентрация ЛХС-1208 в дисперсии до фильтрации, мг/мл.

Определение размера липосом

Анализ среднего диаметра липосом проводили методом корреляционной спектроскопии светорассеяния с использованием наносайзера.

Определение рН липосомальной дисперсии

Определение значения рН осуществляли методом потенциометрии с использованием рН-метра HANNA pH 211. В липосомальной дисперсии значение рН измеряли не разбавляя. Предварительно определяли значение рН воды для инъекций.

Изучение цитотоксической активности в МТТ-тесте

Исследование проводили на клеточной линии карциномы толстой кишки НСТ-116. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина и антибиотиков. С культуральных флаконов клетки снимали раствором Версена.

Для постановки МТТ-теста клетки рассаживали в 96-луночные планшеты в количестве 3 тыс. клеток на лунку. Через сутки, после того как клетки прикреплялись к пластику, в лунки добавляли исследуемые препараты в концентрациях 1,8; 0,9; 0,4 мкг/мл и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °С и 5 % CO_2 . Через 48 ч в лунки добавляли раствор МТТ, который в митохондриях метаболически активных клеток восстанавливается с помощью дегидрогеназ в формазан, представляющий собой кристаллы фиолетового цвета. Через 4 ч в лунки добавляли диметилсульфоксид для растворения образовавшихся кристаллов формазана и производили подсчет оптической плотности на фотометрическом анализаторе «Multiskan» (Thermo Labsystems) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток.

Цитотоксичность (Ц, %) рассчитывали по формуле

$$\text{Ц} = (1 - (O_0/O_k)) \times 100 \%,$$

где O_0 – оптическая плотность в опытных лунках, O_k – оптическая плотность в контрольных лунках.

Для характеристики цитотоксического эффекта определяли ИК_{50} – концентрацию вещества, вызывающую гибель 50 % клеток.

Результаты и обсуждение

Молярные соотношения липидов ЛЛФ ЛХС-1208 подбирали экспериментально с учетом гидрофобных свойств действующего вещества. В качестве основного компонента, формирующего бислой, применяли лецитин. Для придания бислою необходимого уровня жесткости добавляли холестерин. Для предотвращения опсонизации и поглощения липосом клетками ретикулоэндотелиальной системы в состав лекарственной формы вводили PEG-2000-DSPE.

Были получены и проанализированы экспериментальные модели составов ЛЛФ ЛХС-1208 с различными молярными соотношениями компонентов

Таблица 1. Модельные составы липосомальной лекарственной формы ЛХС-1208

№	Молярное соотношение ЛХС-1208 : лецитин	Молярное соотношение лецитин : холестерин : PEG-2000	Эффективность включения, %	Размеры везикул после экструзии, нм	Концентрация ЛХС-1208, мг/мл
1	1:50	1:0,25:0,003	59	215 ± 10	0,6
2	1:100	1:0,25:0,003	75	195 ± 10	0,4
3	1:125	1:0,25:0,003	85	200 ± 10	0,3
4	1:150	1:0,25:0,003	91	205 ± 10	0,2
5	1:150	1:0,33:0,003	92	185 ± 10	0,3
6	1:150	1:0,2:0,003	94	185 ± 10	0,3
7	1:150	1:0,14:0,003	80	185 ± 10	0,3
8	1:150	1:0,1:0,003	75	185 ± 10	0,3
9	1:175	1:0,25:0,003	65	190 ± 10	0,2

(табл. 1). Наибольшее количество включенного препарата в липосомах — основной показатель качества дисперсии. Также для эффективного применения липосомальной лекарственной формы важно, чтобы размеры везикул составляли 100–200 нм [32, 33].

В процессе определения оптимального состава липосомальной формы с ЛХС-1208 с учетом указанных выше критериев качества липосомальной дисперсии был выбран состав № 6 со следующими молярными соотношениями ЛХС-1208 : лецитин — 1:150 и лецитин : холестерин : PEG-2000 — 1:0,2:0,003. При использовании данного состава наблюдался максимальный уровень включения ЛХС-1208 (94 %) в липосомы с наиболее приемлемым размером везикул (185 ± 10) (см. табл. 1).

Липосомы с ЛХС-1208 получали по методу Бэнгема в модификации для гидрофобных субстанций с использованием лецитина, холестерина и PEG-2000-DSPE [34]. Ацетоно-хлороформный раствор (1:1) компонентов ЛЛФ упаривали на ротормном испарителе до образования полупрозрачной липидной пленки, которую досушивали под вакуумом (–0,9 бар) в течение 30 мин. Затем пленку гидратировали водой для инъекций с получением дисперсии многослойных липосом с рН = 7,0 ± 0,5, которые потом измельчали до получения однослойных и однородных везикул приемлемого размера.

В процессе разработки ЛЛФ ЛХС-1208 исследовали способы измельчения многослойных липосом — гомогенизацию (микрофлюидизацию) и экструзию. Поскольку ЛХС-1208 является термолабильным лекарственным веществом, для измельчения липосомальной дисперсии ультразвуковую обработку не применяли.

Размер везикул при экструзии определяется главным образом диаметром пор фильтрующих мембран

и количеством циклов пропускания дисперсии через фильтр [35]. Липосомальную дисперсию ЛХС-1208 последовательно экструдировали через нейлоновые мембранные фильтры «Pall» с уменьшающимся размером пор (1,2; 0,45 и 0,22 мкм) на экструдере «Lipex™ Thermobarrel Extruder» под давлением 0,9 бар. Из результатов исследования, представленных в табл. 2, видно, что оптимальным режимом экструзии липосом ЛХС-1208 является последовательное пропускание дисперсии через нейлоновые мембранные фильтры с уменьшающимся размером пор: 1 раз через фильтр с порами 1,2 мкм, 1 раз через фильтр с порами 0,45 мкм и 2 раза через фильтры с порами 0,22 мкм.

Таблица 2. Влияние экструзии на качество ЛЛФ ЛХС-1208

Диаметр пор фильтра, мкм	Количество циклов	Размеры везикул, нм
0,45	1	205 ± 5
	1	195 ± 5
0,22	2	185 ± 5
	3	185 ± 5

Помимо экструзии липосомы измельчали с применением метода гомогенизации на Microfluidizer M-110S. Использование гомогенизации позволило получить дисперсию липосом ЛХС-1208 с меньшим, чем при экструзии, размером частиц (диаметр преобладающей фракции 60 нм). Однако при гомогенизации наблюдаются большие потери препарата — около 50 % объема дисперсии. В связи с этим данный метод при дальнейших технологических исследованиях не использовали [36].

Таким образом, в результате эксперимента установлено, что наиболее оптимальным способом из-

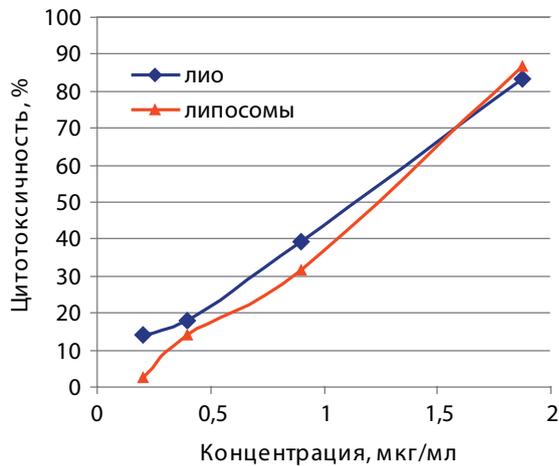


Рис. 1. Цитотоксическая активность лекарственных форм ЛХС-1208 на клеточной линии НСТ-116

мельчения липосом ЛХС-1208 является экструзия под давлением с использованием нейлоновых фильтров.

При хранении в холодильнике в течение нескольких дней происходило расслоение липосомальной дисперсии ЛХС-1208, что свидетельствует о низкой стабильности данной лекарственной формы. В связи с этим для увеличения устойчивости и продления срока годности препарата целесообразно применение метода лиофилизации [37–39]. В настоящее время проводятся исследования по разработке технологии лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208: выбор криопротектора и режима сублимационной сушки.

Результаты сравнения цитотоксической активности ЛЛФ ЛХС-1208 с ЛХС-1208-лио показали, что обе лекарственные формы дозозависимо вызывали гибель клеток линии НСТ-116 после 48 ч инкубации с препаратами (рис. 1). По степени цитотоксической активности обе лекарственные формы оказались практически идентичны: ИК₅₀ для ЛХС-1208-лио составила 1,14 мкг/мл, а для ЛЛФ ЛХС-1208 – 1,24 мкг/мл (рис. 2).

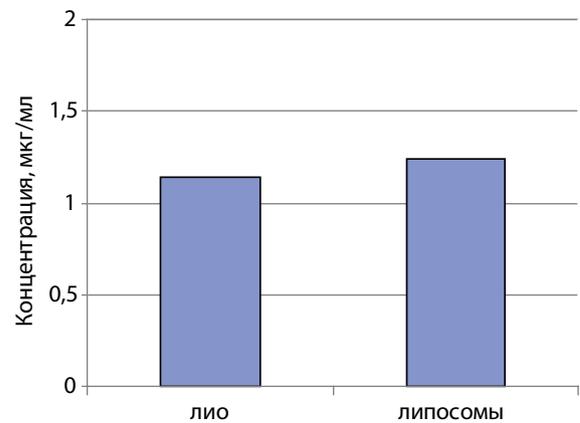


Рис. 2. ИК₅₀ ЛХС-1208-лио и ЛЛФ-лио ЛХС-1208

вила 1,14 мкг/мл, а для ЛЛФ ЛХС-1208 – 1,24 мкг/мл (рис. 2).

Выводы

Определен оптимальный состав компонентов и разработана технология получения ЛЛФ ЛХС-1208. Определены молярные соотношения ЛХС-1208: лецитин – 1:150 и лецитин : холестерин : PEG-2000 – 1:0,2:0,003. Проводятся исследования по разработке технологии лиофилизации ЛЛФ ЛХС-1208. Включение ЛХС-1208 в липосомы составило 94 %, размер везикул – 185 ± 10 нм. Сравнение цитотоксической активности ЛЛФ ЛХС-1208 с таковой ЛХС-1208-лио на клеточной линии карциномы толстой кишки НСТ-116 показало, что уровень активности обеих лекарственных форм идентичен. Ввиду большей направленности и оказания меньшего токсического эффекта ЛЛФ ЛХС-1208 (по сравнению с ЛХС-1208-лио) представляются целесообразными дальнейшие исследования эффективности этой лекарственной формы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение фармацевтической технологии для повышения биодоступности лекарственных веществ. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3):101–8.
2. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Особенности создания лекарственных форм противоопухолевых препаратов для парентерального применения. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2015; 2(11):96–110.
3. Гулякин И.Д., Оборотова Н.А., Печенников В.М. Солюбилизация гидрофобных противоопухолевых препаратов.

4. Дмитриева М.В., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. и др. Наноструктурированные системы доставки противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):21–7.
5. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая активность соединения ЛХС-1208 (N-гликозилированные производные индоло[2,3-а]карбазола). *Российский биотерапевтический журнал* 2010;9(1):80.
6. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая

- эффективность прототипа лекарственной формы соединения ЛХС-1208 для внутривенного введения. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):49.
7. Смирнова З.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):129.
8. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М. и др. Изучение противоопухолевой активности производного индоло[2,3-а]карбазола ЛХС-1006. *Российский биотерапевтический журнал* 2005;4(1):70–71.

9. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М. и др. Изучение связи структуры и противоопухолевой активности в ряду N-гликозидов, производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал* 2006;5(1):20.
10. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М. и др. Корреляция цитотоксической и противоопухолевой активности в отношении лейкозов в ряду N-гликозилированных производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал* 2007;6(1):50–1.
11. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность N-гликозидов производных индоло[2,3-а]карбазола. *Российский биотерапевтический журнал* 2006;5(3):123–127.
12. Смирнова З.С., Кубасова И.Ю., Миникер Т.Д. и др. Изучение противоопухолевой активности N-гликозидов замещенных индоло[2,3-а]карбазолов. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(2):34.
13. Киселева М.П., Смирнова З.С., Борисова Л.М. и др. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов. *Российский онкологический журнал* 2015;(2):33–37.
14. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Изучение влияния фильтрующего материала на содержание действующего вещества при разработке лекарственной формы нового соединения из группы производных индолокарбазолов. *Материалы I Международной научно-практической Интернет-конференции «Технологические и биофармацевтические аспекты растворения лекарственных препаратов разной направленности действия»*. Харьков: 7–8 ноября 2014 года. НФУ Минздрава Украины. 2014. 208–209.
15. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Оценка показателей качества лиофилизированной лекарственной формы ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(3):62.
16. Ланцова А.В., Полозкова А.П., Орлова О.Л. и др. Разработка композиции для внутривенного введения гидрофобной субстанции производной индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(2):50.
17. 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.
18. Ланцова А.В., Санарова Е.В., Полозкова А.П. и др. Разработка лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):104.
19. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. *Сообщение I*. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):71–7.
20. Киселева М.П., Шпрах З.С., Борисова Л.М. и др. Доклиническое изучение противоопухолевой активности производного N-гликозида индолокарбазола ЛХС-1208. *Сообщение II*. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(3):41–7.
21. Николина А.А., Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И. и др. Изучение «острой» токсичности нового противоопухолевого лекарственного средства на основе производного индолокарбазола – ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(4):59–64.
22. Кульбачевская Н.Ю., Коняева О.И., Ермакова Н.П. и др. «Субхроническая» токсичность лекарственного средства на основе производного индолокарбазола на крысах. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):99.
23. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов. *Российский химический журнал* 2012;(3-4):33–40.
24. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор). *Химико-фармацевтический журнал* 2001;35(4):32–8.
25. Саквина О.И., Барышников А.Ю. Липосомы в направленной доставке противоопухолевых препаратов. *Российский биотерапевтический журнал* 2008;7(4):80–5.
26. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Молекулярные механизмы преодоления множественной лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):3–10.
27. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А. Иммунолипосомы – новое средство доставки лекарственных препаратов. *Современная онкология* 2001;3(2):4.
28. Барышников А.Ю., Оборотова Н.А., Герасимова Г.К. и др. Противоопухолевые препараты, разработанные в Российском онкологическом научном центре им. Н.Н. Блохина. *Вестник Московского онкологического общества* 2004;(11):3–4.
29. Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия. *Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева* 2012; LVI(3–4):60–7.
30. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/FAS-рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3):3–7.
31. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии. *Успехи современной биологии* 2009;(5):464.
32. Барышников А.Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. *Вестник РАМН* 2012;(3):23–30.
33. Гуревич Д.Г., Меерович И.Г., Меерович Г.А. и др. Влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенки в опухоли. *Российский биотерапевтический журнал* 2007;6(2):45–9.
34. Гулякин И.Д., Санарова Е.В., Ланцова А.В. и др. Разработка наноструктурированной модели лекарственной формы производного индолокарбазола ЛХС-1208. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):78.
35. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Санарова Е.В. и др. Применение мембранных фильтров в технологии получения стерильных лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал* 2016;50(1):28–32.
36. Гулякин И.Д. Создание липосомальной лекарственной формы отечественного противоопухолевого препарата ЛХС-1208. *Материалы научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическая наука и практика: достижения, инновации, перспективы»*. Пермь: 25–27 ноября 2015 года. *Вестник ПГФА* 2015;16:41–3.
37. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2013;(2):20–5.
38. Николаева Л.Л., Гулякин И.Д., Санарова Е.В. и др. Влияние вспомогательных веществ на процесс лиофилизации ЛХС-1208 и ОР-2011. *Материалы I Международной научно-практической Интернет-конференции «Технологические и биофармацевтические аспекты растворения лекарственных препаратов разной направленности действия»*. Харьков: 7–8 ноября 2014 года. НФУ Минздрава Украины 2014. 216.
39. Оборотова Н.А., Краснюк И.И., Томашевская Н.В. Технологические возможности сублимационной сушки фармацевтических препаратов. *Фармация* 2007;(2):25–6.

НАИБОЛЕЕ ЗНАЧИМЫЕ ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ КРАПИВНИЦЫ

Е.А. Собко^{1,2}, С.В. Чубарова^{1,2}, И.А. Соловьева^{1,2}, О.П. Ищенко^{1,2}, Н.В. Гордеева^{1,2},
А.Ю. Крапошина¹, И.В. Демко¹, Л.В. Аристархова², Е.В. Николаенко², Л.Н. Волкова²

¹ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Минздрава России; Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 1;

²КГБУЗ «Краевая клиническая больница»; Россия, 660022, Красноярск, ул. Партизана Железняка, 3а

Контакты: Елена Альбертовна Собко sobko29@mail.ru

Введение. Крапивница – это распространенное заболевание, характеризующееся образованием на коже зудящих волдырей. Крапивницу легко диагностировать, но не всегда просто лечить из-за различной тяжести течения, частой устойчивости к антигистаминным препаратам, выраженного снижения качества жизни пациентов.

Цель исследования – ретроспективный анализ историй болезней пациентов, страдающих острой и хронической крапивницей, для выявления наиболее значимых этиологических факторов с целью оптимизации диагностики и лечения.

Материалы и методы. Проанализированы данные 307 историй болезней пациентов с различными формами крапивницы, находившихся на лечении в отделении аллергологии в 2008–2014 гг. Диагноз устанавливали на основании результатов общеклинических методов обследования, соответствующих стандартам диагностики заболевания, а также специфического аллергологического исследования.

Результаты. Хотя больные с острой и хронической крапивницей проходят обследование и лечение в стационаре по одному медицинскому экономическому стандарту, пациенты с хронической крапивницей требуют более широкого спектра диагностических мероприятий. Соответственно, их обследование является более дорогостоящим.

Заключение. Несмотря на широкий спектр возможных причин крапивницы, остается ряд пациентов, у которых провоцирующий фактор не выявлен. Крапивница является полиэтиологичным заболеванием, при котором требуется комплексное обследование пациента.

Ключевые слова: хроническая крапивница, острая крапивница, этиологические факторы

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-61-65

THE MOST SIGNIFICANT ETIOLOGICAL FACTORS OF THE ACUTE AND CHRONIC URTICARIA

E.A. Sobko^{1,2}, S.V. Chubarova^{1,2}, I.A. Soloveva^{1,2}, O.P. Ischenko^{1,2}, N.V. Gordeeva^{1,2},
A.Yu. Kraposhina¹, I.V. Demko¹, L.V. Aristarhova², E.V. Nikolaenko², L.N. Volkova²

¹Krasnoyarsk budgetary state medical university named after prof. V.F. Voino-Yasenetsky Ministry of Health of Russia,
1 Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, 660022, Russia;

²Regional Clinical Hospital; 3a Partizana Zheleznyaka St., Krasnoyarsk, 660022, Russia

Background. Urticaria is a common disease characterized by the formation on the skin itchy blisters. It is easy to diagnose an urticaria, but it isn't always simple to treat because of various severity, frequent resistance to antihistamine drugs, a substantial reduction in quality of life.

Objective. The purpose of the study is to carry out the retrospective analysis of medical case history of patients with acute and chronic urticaria for identification of the most significant etiological factors of the disease for the optimization of diagnostics and treatment of such patients.

Materials and methods. There were analysed 307 medical cards of the patients with various forms of urticaria who were on treatment in the allergology department from 2008 till 2014. The diagnosis was established on the basis on the results of the clinical methods conforming to the standards of diagnosis of this disease, and also specific allergological research.

Results. Though patients with acute and chronic urticaria pass examination and treatment in the hospital according to the one medical economic standard, patients with a chronic urticaria demand wider range of diagnostic actions. Respectively, their medical examination is more expensive.

Conclusion. Despite on a wide range of the possible reasons of an urticaria, there are patients at whom the provocative factor isn't taped. Thus, the urticaria is a multicausal disease at which complex examination of the patient is required.

Key words: chronic urticaria, acute urticaria, etiological factors

Введение

Крапивница представляет собой важную медико-социальную проблему, что объясняется высокой

распространенностью этого заболевания среди населения, которая составляет, по данным разных авторов, от 8 до 25 % [1, 2]. Согласно результатам эпидемио-

логических исследований 5-я часть всего населения нашей планеты хотя бы 1 раз в жизни переносит эпизод крапивницы [3, 4]. Крапивница — гетерогенное заболевание, основным клиническим проявлением которого является волдырь [1, 3]. Волдырь представляет собой ограниченный отек поверхностных слоев дермы, имеет бледно-розовый цвет с покраснением по периферии, сопровождается интенсивным зудом, разрешается в течение 24 ч без каких-либо следов. Иногда крапивница сопровождается ангиоотеком (АО), развивающимся в результате отека глубоких слоев дермы, подкожной клетчатки или подслизистых тканей [3, 5]. Показано, что крапивница оказывает отрицательное влияние на качество жизни пациента: интенсивный зуд, косметические проблемы приводят к нарушению сна, раздражительности, депрессии, нарушению социальной активности и снижают трудоспособность [2, 6–8]. В зависимости от длительности крапивницу подразделяют на 2 формы: острую (ОК) и хроническую (ХК). Диагноз ОК предполагает продолжительность заболевания менее 6 нед, тогда как для ХК характерны ежедневные или частые симптомы (волдырные высыпания, зуд, АО) в течение 6 нед и более [9, 10]. Особенную проблему для пациентов представляет именно хроническая форма заболевания, которая регистрируется у 25–45 % всех больных крапивницей [2, 3, 11]. В течение жизни 0,5–1 % всего населения страдает ХК. При этом если ОК обычно связана с действием экзогенных факторов и аллергенов (пища, лекарства, укусы насекомых и т. д.), причиной ХК во многих случаях является другое заболевание или состояние (например, ревматоидный артрит, инфекция и др.). Тогда крапивница выступает лишь «симптомом» этого заболевания. У части пациентов установить причину не удается.

В соответствии с перечисленными критериями Европейская академия аллергологии и клинической иммунологии (2014) предлагает разделять ХК на 2 основных типа: хроническую спонтанную (идиопатическую) крапивницу и индуцированную крапивницу [12].

Диагностика первичной причины ХК зачастую вызывает определенные затруднения не только у терапевтов, но даже и у некоторых узких специалистов (аллергологов, дерматологов). Сложность ведения данного контингента больных обусловлена отсутствием унифицированных подходов к лечению, необходимостью широкого спектра диагностических мероприятий. В большинстве случаев ХК не связана с каким-либо аллергеном [7], а у 30–50 % больных идиопатической крапивницей предполагается аутоиммунная основа заболевания, обусловленная циркулирующими аутоантителами (анти-FcεRIα) [2, 12–15].

Главной особенностью крапивницы является активация тучных клеток, приводящая к высвобождению гистамина [2]. Однако недостаточная эффективность терапии антигистаминными препаратами позволяет предположить, что в патогенезе различных форм заболевания принимают участие и другие медиаторы аллергического воспаления, а также цитокины. В то же время их вклад в развитие ХК до настоящего времени изучен не достаточно [16].

Цель работы — провести ретроспективный анализ историй болезней пациентов, страдающих ОК и ХК, для выявления наиболее значимых этиологических факторов с целью оптимизации диагностики и лечения.

Материалы и методы

Согласно поставленной цели были проанализированы данные 307 историй болезней пациентов с различными формами крапивницы, находившихся на лечении в отделении аллергологии Краевой клинической больницы (Красноярск) в 2008–2014 гг. Истории болезни были разделены на 2 группы, различающиеся по форме крапивницы (табл. 1). Диагноз устанавливался на основании результатов общеклинических методов обследования, соответствующих стандартам диагностики заболевания [9], а также специфического аллергологического исследования, которое включало анализ данных аллергологического анамнеза и проведенных кожных проб с бытовыми, эпидермальными, пыльцевыми аллергенами. При подозрении на наличие физической формы крапивницы проводили холодовую аппликационную пробу, определение уртикарного дермографизма, пробы с дозированной физической нагрузкой.

Статистическая обработка полученных данных выполнена с помощью программы «Statistica» версии 7.0. Проверка нормальности распределения признаков в группах наблюдения проведена с использованием критерия Колмогорова–Смирнова.

Описательная статистика результатов исследования представлена для качественных признаков в виде процентных долей и их стандартных ошибок, а для количественных признаков использованы медиана (Me) и квартили (Q₁, Q₃). При отсутствии нормального распределения переменных мы проводили сравнение групп с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Значимость различий качественных показателей в группах наблюдения оценивали с помощью непараметрического критерия Пирсона χ^2 с поправкой на непрерывность. Различия во всех случаях оценивали как статистически значимые при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ретроспективный анализ показал, что возраст больных ХК был существенно больше, чем у пациен-

Таблица 1. Основные клиничко-anamnestические данные больных острой (ОК) и хронической крапивницей (ХК)

Показатель	ОК, n = 138	ХК, n = 169	p
Давность заболевания, Ме [Q1; Q3], дни	6 [2; 14]	1095 [242; 3650]	< 0,0001
Возраст, Ме [Q1; Q3], годы	29 [23; 42,5]	36 [25; 53]	0,007
Возраст дебюта заболевания, Ме [Q1; Q3], годы	29 [23; 41]	30 [18; 42]	0,647
Пол, n (%): мужской женский	48 (34,8) 90 (65,2)	62 (36,7) 107 (63,3)	0,411 0,411

тов с ОК. По данным литературы, крапивница встречается в любом возрасте, но хроническая форма заболевания приходится на 3–4-е десятилетие жизни и чаще встречается у женщин среднего возраста [11, 17].

Одним из факторов, вызывающих развитие крапивницы, являются лекарственные препараты. По данным ряда авторов, лекарственная аллергия в большинстве случаев индуцирована бета-лактамами антибиотиками и нестероидными противовоспалительными средствами (НПВС) [18]. Причем некоторые из них обычно расцениваются не как причинные, а как провоцирующие агенты ХК (например, аспирин и другие НПВС), приводящие к обострению заболевания по неиммунным механизмам [10].

Согласно полученным результатам, лекарственная аллергия отмечалась у 43 (31,2 ± 3,94 %) больных ОК и 61 (36,1 ± 3,69 %) пациента с ХК ($p = 0,216$) (табл. 2).

Среди больных ХК лекарственная непереносимость в анамнезе отмечалась у 44 (72,1 ± 5,74 %). Более того, у 9 (5,3 ± 1,73 %) пациентов обострение заболевания развилось в результате приема препарата, на который ранее была зарегистрирована аллергическая реакция.

При ОК в равной степени часто встречалась лекарственная аллергия на пенициллины и другие антимикробные препараты.

При ХК наиболее значимым причинным фактором были НПВС – у 21 (34,4 ± 6,08 %) больного, а также пенициллины и другие противомикробные препараты.

Давно известна высокая распространенность заболеваний щитовидной железы у больных ХК [19]. По нашим данным, существенно чаще узловым зобом регистрировался у пациентов с ХК. Так, очаговая патология щитовидной железы среди страдавших ОК была выявлена у 34 (24,6 ± 3,67 %), среди больных ХК – у 70 (41,4 ± 3,79 %) пациентов ($p = 0,003$).

Широко обсуждается роль инфекции при различных формах крапивницы [10]. Есть мнение, со-

Таблица 2. Лекарственная непереносимость у больных острой (ОК) и хронической крапивницей (ХК)

Фактор	Число пациентов, n (%)		p
	ОК, n = 138	ХК, n = 169	
Лекарственная аллергия	43 (31,2)	61 (6,1)	0,216
Пенициллины	12 (8,7)	18 (10,7)	0,703
Другие противомикробные препараты	12 (8,7)	18 (10,7)	0,703
НПВС	9 (6,52)	21 (12,4)	0,123
Ингибиторы АПФ	2 (1,45)	0	0,391
Витамины	6 / 4,35	6 / 3,55	0,950
Рентгенконтрастные вещества	1 / 0,72	1 / 0,59	0,696

гласно которому вирусная инфекция может выступать триггером в развитии обострения ХК [2, 20, 21]. Однако в данном исследовании инфекционная теория не нашла подтверждения. Так, различная вирусная инфекция, которая предшествовала началу заболевания, была отмечена у 8 (5,8 ± 1,99 %) пациентов с ОК и 8 (4,73 ± 1,63 %) с ХК ($p = 0,873$). Положительные маркеры гепатита В и С, определяемые методом иммуноферментного анализа (ИФА), были зарегистрированы у 4 (2,90 ± 1,43 %) больных ОК и 5 (2,96 ± 1,30 %) больных ХК ($p = 0,757$).

По данным литературы, вирусная инфекция является наиболее значимым триггером у детей. Кроме того, трудно установить причинную связь крапивницы с инфекцией, так как пока нет возможности провести провокационный тест с подозреваемым патогеном.

Роль паразитарных инвазий в возникновении крапивницы окончательно не установлена. По данным Британского общества по аллергологии и клинической иммунологии (2014 г.), четкой связи между паразитозом и крапивницей не установлено [2]. В то же время есть и противоположная точка зрения, согласно которой инвазия паразитами считается важной причиной развития крапивницы [10, 22].

По данным нашего анализа установлено, что различные формы паразитоза (описторхоз, токсокароз, лямблиоз) чаще регистрировались у больных ХК (табл. 3).

В условиях стационара продолжался поиск паразитарной инвазии (табл. 4). Так, данный диагноз был установлен у 8,7 % больных ОК и 15,4 % пациентов с ХК ($p = 0,179$).

Методом дуоденального зондирования диагноз паразитарного заболевания был поставлен в 5 % случаев при ОК и 11,8 % случаев при ХК ($p = 0,06$).

При обследовании у всех пациентов были выявлены различные заболевания пищеварительной системы (табл. 5).

Таблица 3. Паразитарная инвазия, выявленная до госпитализации

Паразитарная инвазия	Число пациентов, <i>n</i> (%)		<i>p</i>
	ОК, <i>n</i> = 138	ХК, <i>n</i> = 169	
Описторхоз	6 (4,3)	26 (15,4)	0,003
Токсокароз	0	7 (4,1)	0,042
Лямблиоз	6 (4,3)	26 (15,4)	0,003
Аскаридоз	2 (1,5)	1 (0,59)	0,855
Дифиллоботриоз	2 (1,5)	0 (0)	0,391

Таблица 4. Паразитарная инвазия, выявленная во время госпитализации

Инвазия	Число пациентов, <i>n</i> (%)		<i>p</i>
	ОК, <i>n</i> = 138	ХК, <i>n</i> = 169	
Описторхоз	5 (3,6)	9 (5,3)	0,663
Токсокароз	0	2 (1,2)	0,575
Лямблиоз	4 (2,9)	15 (8,9)	0,024
Дифиллоботриоз	3 (2,2)	0	0,179

Большое внимание уделяется *H. pylori* как одному из многочисленных триггеров крапивницы [10, 23]. Согласно полученным данным этот возбудитель преимущественно был идентифицирован у больных хронической формой заболевания ($p = 0,006$).

Проведя анализ количества лабораторных и инструментальных методов исследования, использованных у данной категории больных, мы еще раз подтвердили, что больным ХК обследования проводятся в большем объеме в сравнении с пациентами с ОК. Однако несмотря на широкий спектр возможных причин крапивницы, у ряда больных провоцирующий фактор не выявлен. Так, идиопатическая крапивница у пациентов с ХК была зарегистрирована в 11 % случаев. Среди больных с острым течением заболевания причинно-значимый фактор не был выявлен у 30 (21,7 ± 1,99 %).

Несмотря на тот факт, что пациенты с ОК и ХК проходят обследование и лечение в стационаре по одному медицинскому экономическому стандарту, больные ХК требуют более широкого спектра

Таблица 5. Патология желудочно-кишечного тракта у больных острой (ОК) и хронической (ХК) крапивницей

Инвазия	Число пациентов, <i>n</i> (%)		<i>p</i>
	ОК, <i>n</i> = 138	ХК, <i>n</i> = 169	
Гепатомегалия	16 (11,6)	19 (11,2)	0,933
Желчнокаменная болезнь	11 (7,9)	6 (3,6)	0,151
Диффузные изменения в печени	40 (28,9)	42 (24,9)	0,493
Протоковые изменения	43 (31,2)	56 (33,1)	0,805
Диффузные изменения в предстательной железе	65 (47,1)	90 (53,3)	0,338
Гастрит	57 (41,3)	121 (71,6)	< 0,001
Эрозии в желудке и/или двенадцатиперстной кишке	10 (7,2)	17 (10,1)	0,507
Язва желудка и/или двенадцатиперстной кишки	7 (5,1)	12 (7,1)	0,620
<i>H. pylori</i>	3 (2,2)	18 (10,7)	0,006

диагностических мероприятий и, соответственно, их обследование является более дорогостоящим.

В результате проведенного экономического анализа стоимости стационарных затрат на обследование установлено, что на больных ХК в среднем затрачивается на 5000 руб. больше по сравнению с пациентами, страдающими ОК, что связано с более детальным обследованием этой категории пациентов. В частности, чаще требуется более широкое комплексное клинично-лабораторное (уровень аллергенспецифических IgE, гормонов щитовидной железы, выявление аутоантител к структурам щитовидной железы и антител к *H. pylori*) и инструментальное исследование (ультразвуковое исследование органов брюшной полости, фиброгастроудено- и ирригоскопия), а также консультации узких специалистов.

Заключение

Крапивница является полиэтиологическим заболеванием, при котором требуется комплексное обследование пациента.

Данная патология требует пристального внимания врача при выявлении причин, возможных механизмов патогенеза заболевания и определения тактики ведения больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Васильева А.А., Хакимова Р.Ф. Острая крапивница и ангиоотек в практике семейного врача. Вестник современной клинической медицины 2011;(4):54–9.
2. Powell R.J., Leech S., Till S. et al. BSACI guideline for the management of chronic urticaria and angioedema. Clin Exp Allergy 2015;45(3):547–65. doi: 10.1111/cea.12494.
3. Караулов А.В., Юцковский А.Д., Грачева Т.С. Хроническая крапивница: от понимания механизмов возникновения к консенсусу в лечении. Аллергология и иммунология 2013;(3):169–73.
4. Larenas-Linnemann D., Medina-Avalos M.A., Ortega-Martell J.A. et al. Mexican guidelines on the diagnosis and treatment of urticarial. Rev Alerg Mex 2014;61 Suppl 2:118–93.
5. Ненашева Н.М. Эффективность рупатадина при кожных аллергических заболеваниях. Эффективная фармакотерапия 2014;(4):16–22.
6. Величинская О.Г. Сравнительная оценка качества жизни пациентов с различными формами хронической крапивницы. Вестник ВГМУ 2014;(2):110–4.
7. Знаменская Л.К. Состояние микробиоценоза кишечника у пациентов с хронической рецидивирующей крапивницей. Таврический медико-биологический вестник 2014;(1):54–6.
8. Скороходкина О.В., Ключарова А.Р. Обоснование выбора антигистаминного препарата в терапии хронической крапивницы с позиции «эффективность – безопасность». Трудный пациент 2013;(10):52–6.
9. Колхир П.В. Принципы лечения крапивницы и ангиоотека. Лечащий врач 2013;(2):51–5.
10. Колхир П.В. Причины хронической крапивницы. Лечащий врач 2012;(10):80–3.
11. Дробик О.С., Воронова М.Ю. Хроническая крапивница и стресс: разные грани проблемы. Consilium Medicum 2013;(3):68–71.
12. Marzano A.V., Pigatto P.D., Cristaudo A. et al. Management of chronic spontaneous urticaria: practical parameters. G Ital Dermatol Venereol 2015;150(2):237–46.
13. Манина И.В., Рыжих А.М., Стась Л.И. и др. Динамика показателей иммунной системы у пациентов с IgE-зависимым заболеванием на фоне специфической иммунотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2012;(1):47–52.
14. Rojanapremsuk T., Kasprowicz S., Schafer E. et al. Clinicopathologic findings in (anti-fcepsilon1alpha) autoimmune related chronic urticaria. J Cutan Pathol 2015;42(5):329–32. doi: 10.1111/cup.12471.
15. Sabroe R.A., Seed P.T., Francis D.M. et al. Chronic idiopathic urticaria: comparison of the clinical features of patients with and without anti-fcepsilon1 or anti-ige autoantibodies. J Am Acad Dermatol 1999;40(3):443–50.
16. Баранова Н.И., Коженкова С.В., Ашина Л.А. Роль цитокинов в патогенезе хронической крапивницы. Цитокины и воспаление 2014;(1):11–5.
17. Некрасова Е.Е., Разваляева А.В., Малюжинская Н.В. Разработка русской версии опросника CU-QoL для изучения качества жизни у пациентов с хронической крапивницей. Саратовский научно-медицинский журнал 2010;(3):566–9.
18. Farshchian M., Ansar A., Zamanian A. et al. Drug-induced skin reactions: a 2-year study. Clin Cosmet Investig Dermatol 2015;8:53–6. doi: 10.2147/CCID.S75849.
19. Magen E., Waitman D.A., Dickstein Y. et al. Clinical-laboratory characteristics of ANA-positive chronic idiopathic urticarial. Allergy Asthma Proc 2015;36(2):138–44. doi: 10.2500/aap.2015.36.3829.
20. Ben-Shoshan M., Blinderman I., Raz A. Psychosocial factors and chronic spontaneous urticaria: a systematic review. Allergy 2013;68(2):131–41. doi: 10.1111/all.12068.
21. Ricci G., Giannetti A., Belotti T. et al. Allergy is not the main trigger of urticaria in children referred to the emergency room. J Eur Acad Dermatol Venereol 2010;24(11):1347–8. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03634.x.
22. Чебуркин А.А. Хроническая рецидивирующая крапивница: синдром или болезнь? Российский аллергологический журнал 2011;(22):1342–7.
23. Данилычева И.В. Крапивница: есть ли проблемы? Аллергология и иммунология 2012;(2):42–7.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ИНДУКТОРА ИНТЕРФЕРОНА АМИКСИНА® В ЛЕЧЕНИИ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХРОНИЧЕСКИХ РЕЦИДИВИРУЮЩИХ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

А.Е. Шульженко^{1,2}, И.Н. Зуйкова¹, А.В. Караулов³, Р.В. Щубелко⁴

¹ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²факультет последипломного образования ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473, Москва, ул. Десятская, 20, стр. 1;

³ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; Россия, 119991, Москва, ул. Большая Пироговская, 2;

⁴ПАО «Клиника К+31»; Россия, 119415, Москва, ул. Лобачевского, 42, стр. 4

Контакты: Андрей Евгеньевич Шульженко ae.shulzhenko@nrcii.ru

Введение. В формировании рецидивирующих и/или затяжных хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей помимо известных, изученных ранее факторов, немаловажную роль играют нарушение в иммунной системе человека на уровне местного (мукозального) и системного иммунитета и активация вирусов герпес-группы (вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирус герпеса 6-го типа). В терапии герпесвирусных инфекций для активации противовирусного иммунитета в отечественной медицине используют препараты индукторов интерферонов.

Цель исследования — оценить эффективность применения препарата Амиксин® у пациентов с хроническими рецидивирующими воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей.

Материалы и методы. На базе отделения аллергологии и иммунотерапии Института иммунологии ФМБА проведено исследование низкомолекулярного индуктора интерферона Амиксина® (ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия) в комплексной терапии хронических рецидивирующих воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей. В исследование были включены 40 пациентов (мужчин и женщин) в возрасте от 18 до 65 лет с наличием в анамнезе рецидивирующих хронических воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей. Клинические методы исследования включали сбор анамнеза, данные о ранее проведенном лечении, наличии сопутствующих заболеваний. Лабораторные методы обследования включали бактериологический посев на флору в материале из ротоглотки и детекцию ДНК вирусов герпес-группы в слюне. Пациентам основной группы после проведения клинического и лабораторного обследования назначалась терапия препаратом Амиксин®. Пациенты обеих групп получали симптоматическую терапию. Общая продолжительность наблюдения за каждым пациентом составила 3 мес.

Результаты. Прием препарата Амиксин® у пациентов с обострением хронических рецидивирующих воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей способствовал более быстрому купированию общих и местных симптомов. Также установлено, что Амиксин® способствует снижению показателей среднего значения вирусной нагрузки в отношении вируса Эпштейна–Барр. В течение последующих 3 мес наблюдения у 25 % пациентов основной группы отмечены обострения исследуемой патологии верхних дыхательных путей, в контрольной группе доля пациентов с повторными обострениями была больше — 60 %, что свидетельствует о профилактическом действии терапии Амиксином®.

Выводы. Применение низкомолекулярного индуктора интерферона Амиксина® (ОАО «Фармстандарт-Томскхимфарм», Россия) в комплексной терапии показало хорошую эффективность в отношении снижения концентрации хронических вирусных инфекций в ротоглотке и профилактики хронических рецидивирующих воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей.

Ключевые слова: индуктор интерферона, иммунный ответ, хронические воспалительные заболевания верхних дыхательных путей

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-66-75

EFFECTIVENESS OF THE LOW-MOLECULAR INDUCTOR OF INTERFERON
OF AMIKSIN® IN TREATMENT AND PREVENTIVE MAINTENANCE
OF THE CHRONIC RECURRENT INFLAMMATORY DISEASES
OF THE UPPER RESPIRATORY TRACT

A. E. Shulzhenko^{1,2}, I. N. Zuikova¹, A. V. Karaulov³, R. V. Shchubelko⁴

¹National Research Center – Institute of Immunology Federal Medical-Biological Agency of Russia;

24 Kashirskoye shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Moscow State University of Medicine and Dentistry;

p. 1, 20 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia;

³I. M. Sechenov First Moscow State Medical University; 2 Bolshaya Pokrovskaya St., Moscow, 119991, Russia;

⁴Public company «K+31»; build. 4, 42 Lobachevsky St., Moscow, 119415, Russia

Introduction. In the formation of recurrent and/or prolonged chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract in addition to the known, previously studied, factors that play an important role in the violation of the human immune system at the level of local (mucosal) and systemic immunity and activation of herpes virus group (Epstein Virus Barr virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus type 6). In the treatment of herpesvirus infections, activation of antiviral immunity in domestic medicine used drugs interferon inducer. **Objective.** To evaluate the efficacy of interferon inducer Amiksin® in patients with chronic recurrent inflammatory diseases of the upper respiratory tract.

Materials and methods. Based on separation of “Allergy and Immunotherapy” SSC “Institute of Immunology” FMBA studied low-molecular interferon inducer Amixin® (JSC “Pharmstandard-Tomskhimpharm”, Russia) in the treatment of chronic recurrent inflammatory diseases of the upper respiratory tract. The study included 40 patients between men and women, aged 18 to 65 years old with a history of recurrent chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract. Clinical research methods included a medical history, previous efficiency of the treatment, the presence of comorbidities. Laboratory methods include bacteriological crop on flora in the material from the oropharynx and the detection of DNA viruses of herpes group in saliva. Patients of the main group, after clinical and laboratory examination, prescribed therapy with Amixin®. Patients in both groups received symptomatic therapy. The total duration of observation of each patient was 3 months.

Results. Amiksin® receiving the drug in patients with acute exacerbation of chronic recurrent upper respiratory tract inflammatory diseases contributed to a more rapid relief of general and local symptoms. Also it found that reduces performance Amiksin® average viral load against Epstein-Barr virus. Over the next 3 months follow-up, 25 % of patients the main group marked exacerbation study pathology of the upper respiratory tract, in the control group of patients with recurrent exacerbations were more – 60 %, indicating that preventive action Amiksin® therapy.

Conclusions: The use of low-molecular interferon inducer Amiksin® (JSC “Pharmstandard-Tomskhimpharm”, Russia) in the combined therapy showed good efficacy in reducing the concentration of chronic viral infections in the oropharynx and prevention of chronic relapsing inflammatory diseases of the upper respiratory tract.

Key words: inducer of interferon, immune response, chronic inflammatory diseases of the upper respiratory tract

Введение

Воспалительные заболевания верхних дыхательных путей (ВДП) относятся к наиболее распространенной патологии органов дыхания. Несмотря на достижения современной медицины, хронические воспалительные заболевания (ХВЗ ВДП) занимают лидирующее положение в структуре заболеваемости с временной утратой трудоспособности. Одной из причин увеличения частоты и длительности случаев воспалительных заболеваний ВДП служит частая трансформация острой патологии дыхательной системы в затяжные и хронические формы, что может быть обусловлено несостоятельностью иммунной защиты и, в частности, факторов местного иммунитета слизистой оболочки ВДП, а также персистирующей бактериальной и/или вирусной инфекцией. Наличие полиморфных неспецифических жалоб и отсутствие четкого алгоритма лабораторного исследования у таких пациентов не позволяют своевременно опреде-

литься с этиологией заболевания и функциональными нарушениями в иммунной системе слизистой оболочки. Лечебные мероприятия, проводимые без учета указанных факторов, как правило, приводят к неудовлетворительным отдаленным результатам и возникновению рецидивов заболевания [1, 2].

Различные инфекционные патогены являются причинами, инициирующими воспаление слизистой оболочки, запуская последовательно различные механизмы патогенеза заболеваний ВДП. Бактериальные инфекционные агенты много лет занимали основное место среди всех возможных этиологических факторов развития воспалительных заболеваний ВДП. Однако в последние годы во многом благодаря расширению возможностей лабораторных методов исследования, а именно внедрению в общую клиническую практику метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) при анализе разнообразных биологических сред организма, определилась немаловаж-

ная роль вирусных патогенов в поддержании рецидивирующих ХВЗ ВДП. Среди всех типов вирусных патогенов особое место принадлежит вирусам герпеса человека – вирусу Эпштейна–Барр (ВЭБ), цитомегаловирусу (ЦМВ), вирусу герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), так как они широко распространены в популяции.

Герпес-вирусы не относятся к респираторным вирусам, однако особенности первичного инфицирования и последующей персистенции определяют их локализацию в лимфоидных структурах ВДП. Такое размещение и периодическая локальная их реактивация, в свою очередь, могут способствовать развитию и поддержанию воспалительного процесса в области носо- и ротоглотки. Так, в большом исследовании по обоснованию и проведению тонзиллэктомии при ХВЗ ВДП впервые было определено понятие часторецидивирующих ХВЗ ВДП (5 и больше раз в год), а также подтверждена ассоциация ВЭБ и ЦМВ в развитии тяжелых, часторецидивирующих ХВЗ ВДП [3]. Также немаловажную роль в поддержании этой патологии играет ВГЧ-6. Как уже упоминалось, все 3 типа вирусов герпес-группы (ВЭБ, ВГЧ-6 и ЦМВ) объединяет способность к пожизненной персистенции в организме после первичного инфицирования. Поскольку инфицирование происходит воздушно-капельным путем, входящими воротами инфекции является орофарингеальная слизистая оболочка. Пожизненная персистенция герпес-вирусов в организме хозяина невозможна без модуляции защитных реакций организма, направленных на ускользание от иммунного надзора [4, 5].

Мукозальная иммунная система – 1-я линия защиты организма против чужеродных антигенов, включая микробные и пищевые. Мукозальный иммунитет представлен системой лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками (Mucosa associated lymphoid tissue, MALT), является частью общей системы защиты организма и локализован, соответственно, в слизистых оболочках всего организма, включая гастроинтестинальный, орофарингеальный, респираторный и урогенитальный тракты. Несмотря на различную локализацию, мукозальная иммунная система различных органов имеет общую анатомическую организацию и схожие функции.

Орофарингеальная слизистая оболочка в силу своей анатомической расположенности объединяет морфологические и функциональные особенности слизистых оболочек гастроинтестинального и респираторного тракта, а также имеет свои отличительные черты. Структурно орофарингеальная слизистая оболочка представлена многослойным плоским эпителием, в основе которого лежит lamina propria (ЛП), состоящая из рыхлой соединительной ткани с кровеносными и лимфатическими сосудами. Таким об-

разом, орофарингеальная слизистая оболочка формирует механический барьер, более толстый и плотный, чем в гастроинтестинальном тракте. Иммунная система слизистой оболочки орофарингеальной области состоит из слюны, слизистой оболочки ротовой полости, слюнных желез и кольца Вальдейера – Пирогова (в основном это небные миндалины и аденоиды).

Некоторые исследователи предполагают, что орофарингеальный мукозальный иммунитет, по аналогии с гастроинтестинальным, состоит из индуктивной и эффекторной зон. Индуктивная зона включает миндалины и слюнные железы, лимфоидные фолликулы и лимфатические узлы. Эффекторная зона включает эпителий, ЛП и слюнные железы. Индуктивная зона содержит активированные в результате антигенной стимуляции лимфоциты, эффекторная зона – место, куда мигрируют активированные лимфоциты, обеспечивая иммунный ответ [6, 7].

Иммунные клетки, такие как интраэпителиальные лимфоциты (ИЭЛ) и лимфоциты ЛП, обеспечивают элиминацию разнообразных антигенов. Слизистая оболочка – это обогащенная цитокинами среда, где эпителиальные клетки, макрофаги, дендритные клетки и Т-лимфоциты продуцируют различные типы цитокинов, такие как TGF-альфа (Transforming growth factor alpha), интерлейкины (ИЛ) – ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-12. После активации Т-клеточного рецептора (TCR) наивные Т-лимфоциты в зависимости от количества цитокинов дифференцируются в различные субпопуляции Т-хелперов. Т-хелперы в дальнейшем либо поддерживают воспаление, либо регулируют иммунный ответ. ИЭЛ обеспечивают первую линию защиты мукозального иммунитета. Изучено 2 их основных класса: ИЭЛ $\alpha\beta$ (формируются в лимфоидной ткани) и ИЭЛ $\gamma\delta$ (происходят из тимоцитов). ИЭЛ $\gamma\delta$ мигрируют в периферические ткани, например кожные покровы, желудочно-кишечный тракт, легкие, генитальный тракт, до рождения и в neonatalном периоде. Они обеспечивают иммунную защиту сразу после рождения. В отличие от $\alpha\beta$ -Т-клеток $\gamma\delta$ -Т-клетки проявляют свои иммунные функции по типу врожденного иммунитета и отвечают за презентацию антигенов главного комплекса гистосовместимости (Main Hystocompatibility Complex, МНС), но не ограничены этими молекулами. TCR активируются после того, как $\gamma\delta$ -Т-клетки запускают МНС-подобные молекулы (CD1d), МНС-связанные молекулы (например, MR1 и CD1) и МНС-несвязанные молекулы (такие как патогенассоциированные и рискассоциированные молекулярные образы). $\gamma\delta$ -Т-клетки также экспрессируют Toll-like-рецепторы (TLR) и рецепторы естественных киллеров (NK-рецепторы), включая TLR2, TLR3, TLR4 и NKG2D. Следовательно, эти рецепторы повышают потенци-

альную чувствительность клеток к стрессу и антигенному воздействию. Также дендритные эпидермальные $\gamma\delta$ -Т-клетки способствуют заживлению. Еще 1 ключевой класс ИЭЛ – клетки CD8 $\alpha\alpha$, которые происходят из двойных негативных тимоцитов. Несмотря на то, что эти клетки считаются активированным фенотипом Т-лимфоцитов, они подавляют активацию TCR. Также они ассоциированы с кишечной антигенной толерантностью, иммунной регуляцией и антимикробными свойствами, влияют на продукцию антигенов, ассоциированных с цитотоксическими CD8⁺-Т-лимфоцитами (ЦТЛ), запрограммированную клеточную смерть и на некоторые ингибиторные NK-клеточные рецепторы.

Также в криптах небных миндалин находятся группы М-подобных клеток (по аналогии с М-клетками желудочно-кишечного тракта), которые способны поглощать антиген из просвета ротовой полости [8, 9]. Кроме того, все слизистые оболочки покрыты слизью, а в случае слизистой оболочки ротовой полости – это слюна, которая содержит иммуноглобулины, антимикробные пептиды и ферменты, продуцируемые слюнными железами (табл. 1).

Таблица 1. Антимикробные свойства слюны (*Oral Mucosal Immunology: An Overview. D.M. Walker*)

Антимикробный агент	Активность
Секреторный IgA, s-IgG, s-IgM	Агглютинация бактерий, нейтрализация вирусов
Лактоферрин	Бактериостатические свойства
Лизоцим	Эффективен против <i>S. mutans</i>
Агглютинины	Гликопротеины, муцины, фибронектин, бета-2-микроглобулин, гистатины, белки, богатые пролином
Миелопероксидазная система	Бактерицидное действие, представленное тиоцианат-галидом H ₂ O ₂
Пероксидазная система слюны	Энзим-тиоцианат H ₂ O ₂
Комплемент	С3
Лейкоциты	Более 98 % нейтрофилов

Противовирусный иммунитет начинает формироваться со стадии представления антигенпрезентирующими клетками (АПК) вирусного антигена макрофагам, дендритным клеткам, клеткам Лангерганса, Т-хелперам. Первая линия системной иммунной защиты представлена врожденными факторами (клетки моноцитарно-макрофагального ряда, естественные киллеры). Клетки макрофагально-моноцитарного ряда обеспечивают фагоцитоз и представление вирусных

антигенов, а также способствуют внешней противовирусной резистентности. Значительной вируснейтрализующей активностью обладает система компонента, который усиливает антителозависимый лизис инфицированных клеток, ускоряет мобилизацию и способствует направленному движению клеток к очагу воспаления.

Фаза позднего специфического воздействия начинается с переработки антигена и представления его АПК Т- и В-лимфоцитам с дальнейшей дифференциацией последних в плазматические антителообразующие клетки. Синтезирующиеся антитела (специфические антитела классов IgM, IgA и IgG) обеспечивают нейтрализацию внеклеточно расположенного вируса и обеспечивают иммунный лизис вирусинфицированных клеток.

Специфические CD4⁺-Т-лимфоциты распознают вирусный антиген с антигенами МНС (II класса), выделяют медиаторы, активирующие макрофаги, обладают клеточной цитотоксичностью, уничтожают инфицированные клетки в присутствии интерферона гамма (ИФН- γ), играют важную роль в поддержке В-клеток и функций CD8⁺-лимфоцитов. ЦТЛ обеспечивают HLA-зависимое прямое разрушение инфицированных клеток, продукцию цитокинов, которые способны непосредственно воздействовать на инфицированные клетки или активировать макрофаги в зоне инфекционного процесса.

Естественные киллеры относятся к важным факторам естественной врожденной резистентности, которым для реализации цитотоксической реакции не требуется распознавать специфические антигены. Регуляторами активности NK-клеток являются цитокины (ИЛ-2, ИЛ-15) и ИФН- α . Во время инфекции клетки-киллеры скапливаются в местах поражения и действуют в качестве факторов местного иммунитета.

Интерфероны играют существенную роль в противoinфекционной защите человека. Они представлены семейством белков с противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью, с равной силой действуют на любые вирусы (врожденный фактор защиты) и относятся к цитокинам (медиаторам иммунитета). Синтез ИФН клетками происходит под влиянием различных индукторов, запускающих своеобразную цепную реакцию в ответ на сигнал (вирусы или стресс). Затем ИФН секретируются в межклеточное пространство, где связываются с рецепторами соседних интактных клеток. Механизм противовирусного действия ИФН заключается в подавлении сборки вирусных белков. Действие проявляется на стадии внутриклеточной репликации вируса. С помощью ферментов и ингибиторов он вызывает специфическое торможение транскрипции вирусного генома и подавление трансляции вирус-

ной мРНК. В результате действия ИФН образуется барьер из неинфицированных клеток вокруг очага вирусной инфекции, что способствует ограничению ее распространения.

Взаимодействие между поверхностными белками вируса и рецепторами иммунокомпетентных клеток запускает первую волну продукции цитокинов. Цитокины – растворимые медиаторы активированных лимфоцитов и моноцитов/макрофагов, представляют собой белки небольшого размера, некоторые из которых состоят из 2 субъединиц, использующих специфические рецепторы на клетках мишенях для реализации своих функций. Функционально цитокины являются сильными регуляторными белками с паракринным и аутокринным действием в пиколярных концентрациях. В первые часы вирусной инфекции цитокины, продуцируемые инфицированными клетками или клетками, находившимися в контакте с вирусными продуктами, очень важны в развитии естественного иммунного ответа на инфекцию [10].

Идея использования индукторов ИФН в терапии герпесвирусных инфекций озвучена и успешно реализована в отечественной медицине давно. Главным образом это касается вирусов простого герпеса 1-го и 2-го типов с разными клиническими формами (лабиальная, кожная, генитальная). В этом случае индукторы ИФН назначаются в комплексе с прямыми противовирусными препаратами (ациклическими нуклеозидами) для усиления противовирусного ответа иммунитета. Терапия ХВЗ ВДП, вызванных герпес-вирусами, достаточно новое направление в медицине, которое требует проведения как адекватной этиотропной терапии, так и соответствующей иммунокоррекции с учетом известных нарушений в иммунной системе. В настоящее время еще не разработали четких схем по длительности и дозированию лечения ациклическими нуклеозидами других типов герпес-вирусов, которые обеспечили бы подавление репликации ВЭБ, ЦМВ, ВГЧ-6, поэтому все чаще приходится использовать альтернативные препараты как для комбинированной, так и для монотерапии ХВЗ ВДП, ассоциированных с вирусами герпес-группы. Одним из таких препаратов является низкомолекулярный индуктор ИФН – Амиксин® (тилорон), эффективность которого доказана при различных вирусных инфекциях, включая вирусы герпес-группы.

Амиксин® (тилорон) – низкомолекулярный синтетический индуктор ИФН, стимулирующий образование в организме ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ , ИФН- λ . Основными структурами, продуцирующими ИФН в ответ на введение тилорона, являются клетки эпителия кишечника, гепатоциты, Т-лимфоциты, нейтрофилы и гранулоциты. После приема препара-

та внутрь максимум продукции ИФН определяется через 4–24 ч в последовательности: кишечник, печень, кровь. По данным экспериментальных исследований, после однократного перорального введения Амиксина® в дозе, эквивалентной максимальной суточной дозе для человека, максимальная концентрация в легочной ткани ИФН- λ определяется через 24 ч, ИФН- α – через 48 ч. Индукция ИФН- λ в легочной ткани способствует повышению противовирусной защиты респираторного тракта при гриппозной и других респираторных вирусных инфекциях. В лейкоцитах человека тилорон индуцирует синтез ИФН, стимулирует стволовые клетки костного мозга, в зависимости от дозы усиливает антителообразование, уменьшает степень иммунодепрессии, восстанавливает соотношение Т-супрессоров и Т-хелперов. Эффективен при различных вирусных инфекциях (в том числе вызванных вирусами гриппа, другими возбудителями острых респираторных вирусных инфекций, вирусами гепатита, герпеса). Механизм его противовирусного действия связан с ингибированием трансляции вирусспецифических белков в инфицированных клетках, в результате чего подавляется репродукция вирусов. После приема препарата внутрь тилорон быстро абсорбируется из желудочно-кишечного тракта, биодоступность составляет около 60 %. Связывание с белками плазмы крови – около 80 %. Тилорон не подвергается биотрансформации и не кумулируется в организме. Выводится практически в неизменном виде с калом (около 70 %) и мочой (около 9 %). $T_{1/2}$ составляет 48 ч.

Цель настоящего исследования – оценить эффективность применения препарата Амиксин® у пациентов с рецидивирующими ХВЗ ВДП.

Материалы и методы

В исследование были включены 40 пациентов: 32 (80,0 %) женщины и 8 (20,0 %) мужчин, в возрасте от 18 до 65 лет. Средний возраст женщин составил $35,3 \pm 6,5$ года, средний возраст мужчин $26,3 \pm 2,6$ года. Пациенты были разделены на 2 группы методом случайных чисел: 20 пациентов основной группы и 20 пациентов контрольной группы. Критериями включения в исследование являлись наличие в анамнезе ХВЗ ВДП (фарингит, тонзиллит, риносинусит, ларингит), рецидивирующий характер заболевания с обострениями более 4 раз в год, возраст от 18 до 65 лет, согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие заболеваний печени или почек; любое другое заболевание, которое, по мнению исследователя, может повлиять на результаты исследования, беременность, лактация (для женщин детородного возраста), наличие другой иммуномодулирующей терапии в течение последних 3 мес.

Клинические методы исследования включали сбор анамнеза ХВЗ ВДП (фарингиты, тонзиллиты, ларингиты), данные о ранее проводимом лечении, наличии сопутствующих заболеваний. Оценку клинического состояния пациентов проводили по общепринятой методике, включающей объективные данные и регистрацию жалоб пациента на момент осмотра. Клинический осмотр включал оценку местных признаков воспаления (наличие и степень гиперемии слизистой оболочки задней стенки глотки, миндалин, наличие слизисто-гнойных налетов, фолликулов на задней стенке глотки и отека языка), оценку состояния лимфатических узлов (шейных, подчелюстных) и измерение температуры тела. Регистрация жалоб пациента (ощущение першения, боли, сухости в горле, общая слабость, утомляемость, головная боль) проводилась с использованием шкалы субъективной оценки по 3-балльной шкале (0 – отсутствие симптомов, 1 – слабая выраженность симптомов, 2 – умеренная выраженность симптомов, 3 – значительная выраженность симптомов). Болевые ощущения в глотке пациенты оценивали по 3-балльной шкале: 4 (20 %) пациента оценили их как сильно выраженные (3 балла), 14 (70 %) – как умеренно выраженные (2 балла), 2 (10 %) жаловались на першение и незначительную боль в глотке и оценивали болевые ощущения в 1 балл.

Лабораторные методы обследования включали исследование инфекционных агентов (бактериальных, грибковых, вирусных) в материале из ротоглотки. Забор биоматериала для микробиологического исследования проводили стерильным тупфером для забора мазков (Sarstedt, Германия) между дужками миндалин, по язычку и задней стенке глотки, не касаясь губ, щек и языка. В данном тесте оценивались условно-патогенные микроорганизмы: *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pyogenes*, *S. aureus*, реже грамотрицательные бактерии семейства энтеробактерий и грибы рода *Candida*. Диагностика вирусных инфекционных агентов (ДНК ЦМВ, ВЭБ, ВГЧ-6) проводилась в слюне методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени (Real-time ПЦР). Аллергологическое обследование пациентов включало сбор аллергологического, фармакологического, пищевого анамнеза, проведение кожных скарификационных тестов. Пациенты с наличием интермиттирующего аллергического ринита, назального полипа также не включались в исследование.

Пациентам основной группы после проведения клинического и лабораторного обследования назначали терапию препаратом Амиксин® по схеме: по 125 мг в течение первых 2 дней, затем по 125 мг через 48 ч, курсовая доза – 10 таблеток (1,25 г); продолжительность лечения составила 18 дней, общая продолжительность наблюдения за каждым пациентом – 3 мес.

Клиническое и лабораторное обследование пациентов проводили до начала лечения и через 7 дней после завершения терапии. Пациенты обеих групп также получали симптоматическую терапию: обработка ротоглотки раствором антисептика (0,05 % раствор хлоргексидина) 3–4 раза в день, при необходимости (повышение температуры тела более 38,0 °С, выраженная головная боль) парацетамол 500 мг. При выявлении клинических признаков утяжеления заболевания к терапии планировалось добавление антибактериальных препаратов. Согласно международным рекомендациям клинические критерии эмпирического назначения антибактериальной терапии при обострении ХВЗ ВДП следующие: воспаление миндалин, увеличение шейных лимфатических узлов, лихорадка, отсутствие кашля [11]. Препаратом выбора при эмпирическом назначении является феноксиметилпенициллин (или амоксициллин/клавуланат) [12, 13].

Для оценки эффективности проводимого лечения использовали следующие критерии: клинические – снижение частоты обострений ХВЗ ВДП, лабораторные – изменение вирусной нагрузки, определяемой в материале ротоглотки, методом Real-time ПЦР.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 8.0. В процессе анализа полученных данных и проверки их на нормальность распределения установлено, что данные имеют характер распределения, отличный от нормального, поэтому для их статистической обработки использовали непараметрические методы. Для сравнения двух независимых групп применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принимали равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При изучении особенностей лор-патологии установлено, что в обеих группах наиболее часто встречались хронические формы фарингита, компенсированного тонзиллита. У 70,0 % пациентов основной группы и 80,0 % пациентов контрольной группы при осмотре выявлена клиническая картина с гиперемией и утолщением слизистой оболочки стенок глотки, наличием округлых или продолговатых лимфоидных образований красного цвета от 1 до 5 мм в диаметре на задней стенке глотки. В 30,0 % случаев в основной группе и 20,0 % в контрольной группе при осмотре выявлена клиническая картина хронического тонзиллита с увеличением небных миндалин, наличием в них рубцовых изменений и «пробок» с казеозным содержимым, расширением лакун миндалин.

На основании данных собранного анамнеза и оценки тяжести клинической картины продолжи-

тельность периода течения ХВЗ ВДП определена в $2,75 \pm 0,91$ года при частоте обострений более 4 раз в год. Оценка сопутствующей патологии у обследованных пациентов показала, что наиболее часто встречались патология желудочно-кишечного тракта (хронические гастродуоденит и холецистит), рецидивирующий простой герпес – у 50 % пациентов отмечена рецидивирующая форма простого герпеса (генитальная, лабиальная локализация) с частотой обострений более 6 раз в год. Все сопутствующие заболевания на момент исследования находились в фазе ремиссии. При аллергологическом обследовании в 35,0 % случаев у пациентов выявлена аллергия в анамнезе. В 20,0 % случаев установлен аллергический риноконъюнктивит с сенсибилизацией к аллергенам пыльцы деревьев, в 15,0 % – сенсибилизация к аллергенам пыльцы злаковых и сложноцветных трав. Все пациенты включены в исследование вне сезона пыления причинно-значимых аллергенов.

Для клинической картины обострения хронического фарингита/тонзиллита у обследованных пациентов характерны дискомфорт (першение, сухость) и боли в горле при глотании (особенно при пустом глотке) в 100 % случаев. Также часто (в 95–100 % случаев) отмечены слабость, общее недомогание, реже – подъем температуры до субфебрильных цифр ($37,0–37,5$ °C). При пальпации в 80,0–85,0 % случаев отмечали болезненность и увеличение верхних шейных, подчелюстных лимфатических узлов. При фарингоскопии были видны гиперемия задней стенки глотки и небных дужек, отдельные воспаленные лимфоидные гранулы, признаки воспаления небных миндалин (табл. 2).

Таблица 2. Клиническая характеристика течения обострения воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей

Симптом	Основная группа (n = 20), %	Контрольная группа (n = 20), %
Дискомфорт, боли в горле	100,0	100,0
Повышение температуры тела:		
37,0–37,5 °C	55,0	60,0
37,6–38,0 °C	50,0	60,0
более 38,0 °C	5,0	0
Лимфаденопатия шейных/подчелюстных лимфатических узлов	80,0	85,0
Головная боль	60,0	70,0
Общая слабость	100,0	95,0

Согласно данным литературы в развитии тонзиллита основным этиологическим фактором до сих пор

является β -гемолитический стрептококк группы А (*Streptococcus pyogenes*) [14]. Реже встречаются стрептококки групп С и G, *Arcanobacterium haemolyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae*, анаэробы, микоплазмы и хламидии. В последнее время все большее значение в развитии ангины у взрослых приобретает нестрептококковая инфекция. В частности, определенная роль принадлежит вирусам (аденовирусы, риновирусы, коронавирусы, вирусы гриппа и парагриппа, ВЭБ, ЦМВ и др.) [4, 9, 15]. Исследование этиологических причин ХВЗ ВДП показало наличие смешанной бактериально-вирусной флоры у 40,0 % пациентов основной группы и 55,0 % пациентов контрольной группы. Бактериальными инфекционными агентами заболевания чаще являлись стрептококк (*Strept. pyogenes*), стафилококк (*Staph. aureus*) и другая микрофлора, обычно обнаруживаемая в ротоглотке в непатогенной форме. Однако у 60,0 % основной группы и 45,0 % контрольной группы обнаружена ДНК вирусов группы герпеса (ВЭБ, ВГЧ-6). Пусковым моментом при воспалительном поражении слизистой оболочки глотки чаще всего является смешанная бактериальная и вирусная инфекция (табл. 3). Динамика клинических симптомов у пациентов обеих групп представлена в табл. 4.

Таблица 3. Характеристика спектра бактериально-вирусной флоры в материале ротоглотки обследованных пациентов

Микроорганизм	Основная группа (n = 20), %	Контрольная группа (n = 20), %
<i>Staphylococcus aureus</i> + ВГЧ-6 + ВЭБ	10,0	15,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (гр. А) + ВГЧ-6	15,0	20,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (гр. А) + ВГЧ-6 + ВЭБ	15,0	20,0
ЦМВ	0	0
ВГЧ-6 + ВЭБ	25,0	25,0
ВГЧ-6	35,0	20,0

Дискомфорт и болевые ощущения в горле у пациентов основной группы регрессировали к 5–6-му дню, а в контрольной группе позже – на 6–7-е сут (недостаточно). Наиболее выражена разница в динамике общих симптомов: более быстрое купирование головной боли, общей слабости, нормализация температуры тела отмечены у пациентов основной группы. В контрольной группе к концу курса лечения у пациентов сохранялись незначительно выраженные (1 балл) ощущения першения в горле, не потребовавшие дополнительного назначения лекарственных

Таблица 4. Динамика общих и местных симптомов заболевания на фоне терапии

Симптом	Продолжительность проявления симптома, дни	
	Основная группа (n = 20), %	Контрольная группа (n = 20), %
Боль, дискомфорт в горле	5,6 ± 1,2	6,8 ± 1,1
Повышение температуры тела	3,5 ± 0,8*	5,5 ± 0,5
Головная боль	3,6 ± 0,6*	4,5 ± 0,4
Общая слабость	4,5 ± 1,0	6,0 ± 1,1
Дискомфорт в области шейных/подчелюстных лимфатических узлов	5,0 ± 0,8*	8,0 ± 0,9

* Достоверность различий показателей между группами при $p < 0,05$.

ных препаратов. Имелась положительная динамика купирования лимфоаденопатии шейных и подчелюстных лимфатических узлов, в контрольной группе симптомы дискомфорта лимфатических узлов были продолжительнее.

Купирование отечности и гиперемии на задней стенке и боковых валиках глотки у пациентов обеих групп происходило с разной динамикой. В основной группе регресс данного патологического признака был отмечен с 4-го дня, в контрольной группе – только с 6-го дня лечения. Нормализация фарингоскопической картины к концу лечения была отмечена у 80,0 % пациентов основной группы и только у 50,0 % пациентов контрольной группы.

Показатели вирусной нагрузки у пациентов в период обострения ХВЗ ВДП (гипертрофический фарингит, тонзиллит) до начала лечения были выше, чем клинически значимый уровень. По данным литературы определено, что вирусная нагрузка до 10^3 копий (3,0 lg) ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток в пробе соответствуют латентной инфекции, при которой вирус персистирует в клетках без репликации. Вирусная нагрузка более 10^3 копий (3,0 lg) ДНК ЦМВ/ 10^5 клеток в пробе соответствует стадии поздней первичной инфекции или стадии реактивации, сопровождающейся активной репликацией вирусных частиц, что позволяет считать вирусную нагрузку более 10^3 копий ДНК ЦМВ/ 10^5 клеток в пробе клинически значимой [16].

В ходе лечения у пациентов основной группы через 7 дней после завершения лечения отмечена тенденция к снижению значений вирусной нагрузки слюны до уровня, близкого к латентной инфекции. Репликации ЦМВ-инфекции в материале ротоглотки не было зарегистрировано до и после лечения в обеих группах пациентов. У 40,0 % пациентов основной группы концентрация вирусной нагрузки ДНК

ВЭБ была ниже клинически значимого уровня, в то время как в контрольной группе достоверной разницы в показателях не отмечено. Концентрация вирусной ДНК ВГЧ-6 незначимо менялась в процессе лечения у пациентов обеих групп (табл. 5).

Таблица 5. Динамика вирусной нагрузки на фоне терапии в обеих исследуемых группах

Микроорганизм, Ig, копий геномных эквивалентов/ 10^5 клеток	Основная группа, до/после лечения	Контрольная группа, до/после лечения
ЦМВ	0/0	0/0
ВЭБ	4,17 ± 0,12/3,37 ± 0,31	3,86 ± 0,13/3,21 ± 0,15
ВГЧ-6	3,29 ± 0,42/3,03 ± 0,22	3,73 ± 0,28/3,98 ± 0,21

Анализ отдаленных результатов лечения показал, что в основной группе пациентов частота обострений хронических заболеваний в течение 3 мес после лечения составила 25,0 % ($n = 5$), тогда как в контрольной – 60,0 % ($n = 12$). Отмечено снижение выраженности общих симптомов при обострении ХВЗ ВДП: общая слабость, утомляемость, головная боль – в основной группе. В контрольной группе обострение хронического фарингита/тонзиллита сопровождалось умеренно или значительно выраженными головной болью, слабостью, лимфоаденопатией (табл. 6).

Таблица 6. Характеристика отдаленного периода наблюдения (3 мес) за пациентами обеих групп после лечения

Показатель	Основная группа (n = 20), %	Контрольная группа (n = 20), %
Число пациентов с обострением ХВЗ ВДП после лечения, %	25,0	60,0
Средний балл местных симптомов обострения	2,21 ± 0,15	2,43 ± 0,11
Средний балл общих симптомов обострения	1,80* ± 0,13	2,50 ± 0,12

* Достоверность различий показателей между группами при $p < 0,05$.

В ходе исследования не было отмечено побочных реакций у пациентов, принимавших препарат Амиксин®. Переносимость препарата оценивалась пациентами как «хорошая» и «очень хорошая».

Результаты многих исследователей показывают, что смешанный бактериально-вирусный фактор играет важную роль в развитии обострений ХВЗ ВДП. У 40,0–55,0 % пациентов, включенных в исследование, выявлена смешанная бактериально-вирусная ассоциация, включающая стафилококковую,

стрептококковую флору, ВЭБ, ВГЧ-6. Кроме того, у 45,0–60,0 % пациентов основная флора ротоглотки характеризовалась хронической герпесвирусной инфекцией. Решающим фактором, приводящим к частым рецидивам, является угнетение механизмов местного иммунитета слизистой оболочки глотки при хроническом фарингите/тонзиллите [17]. Сказанное предполагает, что при выборе средства для лечения обострения хронического фарингита/тонзиллита следует ориентироваться не столько на широкий антимикробный спектр препарата, сколько на его комплексное, в том числе иммунонаправленное, действие [18].

В норме острое воспаление небных миндалин у больных тонзиллофарингитом сопровождается активацией интерфероновой системы на местном уровне в ротоглотке. Однако у пациентов с хроническим рецидивирующим течением ХВЗ ВДП имеются признаки недостаточности факторов первой линии защиты в виде снижения синтеза ИФН- α на местном уровне. Установлено, что развитие острого воспаления небных миндалин на фоне интерфероновой недостаточности увеличивает риск рецидивирования заболевания в 2,3 раза [19].

Включение в схему лечения таких пациентов препарата иммунонаправленного действия обосновано и клинически проявляется снижением частоты обострений заболевания [20]. Применение препарата Амиксин® у пациентов с обострением ХВЗ ВДП способствовало более быстрому купированию общих симптомов. Достоверно быстрее наступало улучшение самочувствия у пациентов основной группы с нормализацией температуры тела, купированием головной боли, общей слабости. Снижение дискомфорта и болевого синдрома в горле наблюдалось

в основной группе к 5-му дню лечения, в контрольной группе — к 6-му дня лечения.

По результатам проведенного исследования Амиксин® способствует снижению показателей среднего значения вирусной нагрузки в отношении ВЭБ, что, вероятно, обусловлено усилением ИФН-синтезирующей активности лейкоцитов слюны. В 40,0 % случаев отмечено снижение вирусной концентрации ниже клинически значимого уровня в отношении ВЭБ.

В течение последующих 3 мес наблюдения у 5 пациентов основной группы отмечены обострения ХВЗ ВДП, в контрольной группе число пациентов с повторными обострениями было больше — 12, что подтверждает профилактическое действие препарата Амиксин®.

Выводы

Включение препарата Амиксин® в комплексную терапию ХВЗ ВДП приводит к сокращению периода общей интоксикации во время обострения (головная боль, общая слабость, нормализация температуры тела).

Возможность и целесообразность применения препарата Амиксин® в комплексной терапии ХВЗ ВДП обусловлены его влиянием на бактериально-вирусную флору ротоглотки в виде снижения вирусной нагрузки, коррекции вторичного иммунодефицитного состояния при этой патологии.

Амиксин® целесообразно применять для профилактики ХВЗ ВДП с учетом снижения частоты рецидивов заболевания в отдаленном периоде наблюдения.

Амиксин® имеет широкий спектр показаний и применяется у взрослых и детей в комплексной терапии иммунодефицитных состояний, клинически проявляющихся в форме острых и хронических рецидивирующих инфекционно-воспалительных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бычкова Е.В. Клиническое значение современной диагностики в лечении латентных инфекций верхних дыхательных путей. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. СПб, 2008.
2. Смирнов В.С., Фрейдлин И.С. Иммунодефицитные состояния. СПб.: Фолиант, 2000.
3. Georgalas C.C., Tolley N.S., Narula A. Tonsillitis. *BMJ Clinical Evidence*. 2009;2009. pii: 0503. Review. PMID: 21718574.
4. Baron S. *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. ISBN-10: 0-9631172-1-1.
5. Imbrono A.V., Grande S.R., Freitas N.M. et al. Detection of Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in blood and oral samples: comparison of three sampling methods. *J Oral Sci* 2008;50(1): 25–31. PMID: 18403880.
6. Wu R.Q., Zhang D.F., Tu E. et al. The mucosal immune system in the oral cavity — an orchestra of T cell diversity. *Int J Oral Sci* 2014;6:125–32. doi: 10.1038/ijos.2014.48. PMID: 25105816.
7. Zuercher A.W., Coffin S.E., Thurnheer M.C. et al. Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses. *J Immunol* 2002;168(4):1796–803. PMID: 11823512.
8. Brandtzaeg P. Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *J Oral Microbiol* 2013;5. doi: 10.3402/jom.v5i0.20401. PMID: 23487566.
9. Williams J.E. Portal to the interior: viral pathogenesis and natural compounds that restore mucosal immunity and modulate inflammation. *Alternative Medicine Review* 2003;8(4):395–409. PMID: 14653767.
10. Шульженко А.Е. Стандартные и альтернативные подходы к диагностике и лечению герпесвирусных инфекций: Дис. ... докт. мед. наук. М., 2006.
11. Cowan D.L. Acute and chronic infection of the pharynx and tonsils. *Scott-Brown's Otolaryngology*. Edd. D.L. Cowan, J. Hiebert. 7th Ed. V.5. Chap. 4. Oxford, 1997:1–24.

12. Зубков М.Н. Алгоритм терапии острых и хронических инфекций верхних и нижних дыхательных путей. РМЖ 2009;17(2):123–31.
13. Рязанцев С.В. Этиопатогенетическая терапия острых фарингитов. Методические рекомендации. СПб., 2007.
14. Лопатин А.С. Лечение острого и хронического фарингита. РМЖ 2001; 9(16–17):58–61.
15. Медведев А.Ю., Валишин Д.А. Этиологические особенности ангины больных, инфицированных вирусом Эпштейна–Барр. Медицинский вестник Башкортостана 2011;6(3):88–90.
16. Шахгильдян В.И., Шипулина О.Ю., Сафонова А.П. и др. Клиническая интерпретация молекулярных методов в диагностике цитомегаловирусной инфекции. Доступно по: http://www.inter-labservice.ru/consulting/publications.php?id=8185&sphrase_id=71272
17. Свистушкин В.М., Мустафаев Д.М. Современные подходы к лечению и профилактике воспалительных заболеваний верхних отделов дыхательных путей. Consilium Medicum 2014;16(11):48–51.
18. Васяева А.А., Арефьева Н.А. Иммунотерапия при хронических фарингитах: показания, результаты. РМЖ 2010;18(30):1864–9.
19. Азнабаева Л.Ф., Арефьева Н.А. Иммунологические аспекты хронического тонзиллита. Вестник оториноларингологии 2013;(4):4–9.
20. Гофман В.Р., Смирнов В.С. Состояние иммунной системы при острых и хронических заболеваниях ЛОР-органов. В кн.: Иммунодефицитные состояния. Под ред. В.С. Смирнова, И.С. Фрейдлин. СПб.: Фолиант, 2000. С. 163–87.

НОВЫЙ МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТОЙ ФРАКЦИИ ИНТАКТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЯДЕР ДЛЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА НА ПРОТОЧНОМ ЦИТОФЛУОРИМЕТРЕ

С. И. Никулицкий, Е. Г. Тырсина, А. Н. Иншаков, Н. Б. Боровкова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478, Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Екатерина Григорьевна Тырсина tyrsina@yandex.ru

Введение. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), результаты которой детектируются с помощью проточной цитофлуориметрии, позволяет идентифицировать клеточные белки, находящиеся либо на поверхности клетки, либо внутри нее в случае использования пермеабиллизации. Однако этот метод не дает ответа на вопрос о распределении искомого антигена по клеточным компартментам, в частности о его ассоциации с клеточным ядром. Между тем ядерная локализация изучаемого белка во многом позволяет судить о механизмах его действия. Поэтому разработка протокола выделения интактных клеточных ядер, пригодных для анализа на проточном цитофлуориметре, способна дополнить сведения о расположении и функциональном значении многих ядерноассоциированных протеинов.

Цель исследования — разработка метода выделения чистой фракции интактных, стабилизированных клеточных ядер, пригодных для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре.

Материалы и методы. В работе изучали ядерную локализацию рецептора фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа (VEGF-R1). В качестве объекта исследования использовали линию опухолевых клеток человека A431. Интактность экстрагированных ядер оценивали путем микроскопического исследования окрашенных мазков из ядерной суспензии. Экспрессию рецептора регистрировали с помощью непрямой РИФ на проточном цитофлуориметре.

Результаты. Применение разработанного протокола позволило получить суспензию из одиночных неповрежденных клеточных ядер, что является необходимым условием постановки РИФ. На экстрагированных ядрах нам удалось выявить рецептор как на наружной мембране (интактные ядра), так и внутри ядра (пермеабиллизованные ядра). Причем внутриядерное содержание рецептора VEGF-R1 превышало таковое на ядерной поверхности в 3,8 раза ($17,9 \pm 1,04$ и $4,8 \pm 0,26$ % соответственно).

Заключение. Разработанный нами метод оказался пригодным для идентификации и установления локализации искомого ядерных белков на проточном цитофлуориметре. В сочетании с такими широко применяемыми методиками, как иммуноцитохимическое исследование, вестерн-блоттинг и др., РИФ на ядрах поможет исследователю сформировать более полное представление о свойствах ядерноассоциированных белков.

Ключевые слова: экстракция интактных ядер, проточная цитофлуориметрия, рецептор фактора роста эндотелия сосудов 1-го типа, клеточная линия A431

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-76-81

NEW METHOD OF EXTRACTION OF INTACT NUCLEI FROM CELLS FOR FLOW CYTOMETRY FLUORESCENCE IMMUNOASSAY

S.I. Nikulitskiy, E.G. Tyrsina, A.N. Inshakov, N.B. Borovkova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Background. Identification of cellular proteins can be performed by indirect immunofluorescence assay using flow cytometry. However, this method allows to detect cellular proteins that are either on the cell surface or inside the cell and cannot demonstrate a protein distribution within cellular compartments, particularly in nucleus. Meanwhile, the nuclear localization of the protein of interest in many respects gives an indication of the mechanisms of its action. Therefore, the development of the protocol of extraction of nuclei suitable for analysis on a flow cytometer is able to complement the information about the localization and functional significance of many nucleus-associated proteins.

Objective. The aim of this study was to develop a method for extraction, purification and stabilization of intact nuclei suitable for flow cytometry analysis.

Materials and methods. In this work we studied the nuclear localization of the receptor type 1 for vascular endothelial growth factor (VEGF-R1). The A431 human cancer cell line was used as an object of the study. The quality of extracted nuclei was assessed by microscopic examination of stained smears of nuclear suspension. Expression of the receptor was determined by indirect immunofluorescence assay using flow cytometry.

Results. New method was successfully applied to obtain the suspension of intact cellular nuclei that is crucial to perform further flow cytometry. Applied method revealed the presence of the receptor type 1 for vascular endothelial growth factor at the external nuclear membrane and inside of the nucleus. Interesting to note that the presence of the receptor type 1 for vascular endothelial growth factor inside of the nucleus was 3,8 times as much as its surface location ($17,9 \pm 1,04$ % and $4,8 \pm 0,26$ % respectively).

Conclusions. The new method of extraction, purification and stabilization of the nuclei is applicable for proteins identification by flow cytometry. In combination with other methods (ICC, Western blotting, etc.) flow cytometry of intact nuclei is able to complement the information about the properties of nucleus-associated proteins.

Key words: extraction of nuclei, flow cytometry, receptor type 1 for vascular endothelial growth factor, A431 cell line

Введение

Целью многих исследований в различных областях биологии является регистрация определенных клеточных белков. Многие годы эту задачу с успехом позволяет реализовать реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с использованием проточного цитофлуориметра. Несомненные достоинства этого метода заключаются в объективности, точности и высокой воспроизводимости результатов. Вместе с тем РИФ позволяет детектировать антигены либо на наружной поверхности клетки, либо внутри нее после предварительной пермеабилзации. Однако даже регистрация соответствующего белка внутри клетки не позволяет судить о его распределении по клеточным компартментам. Между тем данный вопрос неизбежно встает в ходе многих исследований, например при разработке чувствительных методов диагностики и мишеньнаправленного лечения онкологических заболеваний. Для решения вопроса о точной внутриклеточной локализации белка применяют, как правило, вестерн-блоттинг и иммуноцитохимическое (ИЦХ) исследование. Однако данные методики являются полуколичественными и лишь относительно сопоставимы с результатами РИФ. В связи с этим мы решили расширить возможности РИФ, а именно: разделить ядерные и цитоплазматические сигналы.

В доступной литературе мы не нашли работ об использовании меченных антителами ядер в проточной цитометрии. Необходимым условием постановки РИФ на ядрах является их наиболее щадящая экстракция из клеток для получения неповрежденных, одиночных и функционально активных ядер.

Получить более или менее целостные ядра удалось Г.П. Георгиеву с сотрудниками еще в 60-х гг. прошлого столетия [1]. Авторами был использован фенольный метод извлечения ядер из различных тканей млекопитающих. При этом основная задача работы заключалась в выделении ядерной РНК, а не в получении функционально активных ядер как таковых. Однако для поставки РИФ данный способ не подходит ввиду высокой токсичности фенольных соединений [2]. В частности, эти агенты приводят к денатурации белков, что изменяет антигенные детерминанты и, соответственно, искажает получаемые результаты.

В 1990 г. был описан другой метод выделения транскрипционно-активного ядерного экстракта из печени крыс [3]. Данная методика более приемлемая для сохранения целостности ядер, однако в связи с использованием лабораторных животных довольно трудоемкая и дорогостоящая. К тому же она не позволяет исследовать ядра человеческих клеток.

Для вестерн-блот-анализа также необходимо получение ядерной фракции. Объектами в данном случае служат культивируемые клетки, что дает возможность изучать в том числе различные клеточные линии опухолей человека. Вместе с тем метод нацелен исключительно на получение чистых белковых экстрактов цитоплазмы и ядра и не предполагает сохранения стабильных, функционально активных ядер в силу жестких условий выделения. Таким образом, на сегодняшний день не существует приемлемого метода «мягкой» экстракции цельных клеточных ядер, т. е. исследование белков в нативном ядре не представляется возможным. Чтобы решить эту проблему, нами был разработан метод выделения чистой фракции интактных клеточных ядер для иммунофлуоресцентного анализа на проточном цитофлуориметре.

Ранее с помощью непрямой РИФ (нРИФ) на клетках линии эпидермоидной карциномы человека А431 мы обнаружили преимущественную внутриклеточную локализацию VEGF-R1. Это подтвердилось и данными ИЦХ-окрашивания. Однако установить указанными методами, где именно внутри клетки расположен VEGF-R1, было невозможно. Например, не было понятно, связан ли рецептор с ядром.

В связи с этим целью настоящего исследования явилось выяснение вопроса об ассоциации VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Для этого прежде всего необходимо было разработать методику щадящего выделения интактных ядер. Отправной точкой работы стало рассмотрение существующих модификаций разделения цитоплазматической и ядерной фракций при вестерн-блот-анализе, которое выявило значительные различия. Они касались числа циклов центрифугирования (от 1 до 3), скорости (от 1000 до 16 000 об/мин), количества клеток на пробу, а также состава буферов для выделения фракций [4–6]. Для вестерн-блоттинга сохранность ядер не имеет принципиального значения, поскольку этот метод пред-

полагает лишь получение «чистых растворов» ядерных и цитоплазматических белков. Но поскольку целью нашей работы было установление точной локализации VEGF-R1 в интактном ядре, вышеописанные условия разделения фракций нам не подходили. В связи с этим мы предприняли попытку разработки методики щадящего выделения интактных клеточных ядер для их дальнейшего иммунофлуоресцентного анализа с применением проточной цитометрии. Важно, что полученные результаты на ядрах можно объективно сопоставлять с результатами РИФ, ранее полученными на клетках.

При разработке метода выделения интактных клеточных ядер нам необходимо было установить: минимально необходимое количество клеток для последующего выделения ядер; фазу клеточного роста, оптимальную для постановки эксперимента; наилучшие условия отделения цельных ядер от цитоплазмы (состав буфера и время инкубации в нем, режим очистки полученной суспензии, условия стабилизации ядер); оптимальное количество ядер на пробу для РИФ; наилучший пермеабилizующий реагент; концентрацию антител для мечения ядер; а также необходимо было разработать протокол для анализа проб на проточном цитофлуориметре.

Материалы и методы

Объекты исследования

Исследуемым белком являлся VEGF-R1, который, по данным литературы, представлен в клеточной линии эпидермоидной карциномы человека A431 [7]. Клетки A431 выращивали в среде ДМЕМ («Gibco», Великобритания), содержащей глутамин, 10 % телячью эмбриональную сыворотку и антибиотик гентамицин (40 мкг/мл), в пластиковой культуральной посуде («Costar», США) при температуре 37 °С и подаче влажного воздуха с 5 % CO₂. Клетки рассевали в концентрации из расчета 1,5 × 10⁵/мл каждые 3 сут. Для снятия клеток с подложки использовали 0,25 % раствор трипсина-ЭДТА.

В результате серии экспериментов мы установили, что наибольшую активность демонстрируют ядра, выделенные из клеток в логарифмической фазе роста. Определено оптимальное количество клеток, равное 1 × 10⁷ на 1,5 мл.

Экстракция ядер

Основой буфера для отделения ядер от цитозольной фракции был выбран гипоосмолярный раствор, содержащий HEPES (10 ммоль, pH 7,9), MgCl₂ (5 ммоль), EDTA (0,1 ммоль). Для ингибирования протеазной активности использовали таблетированный антипротеазный «коктейль» («Complete Mini», Roche, Швейцария) по инструкции производителя. Далее к 50 мл полученного раствора прибавляли 2,0 мл 10 % Три-

тона-X100. Непосредственно перед применением добавляли дитиотреитол (ДТТ) из расчета 1 мкл на 1 мл буфера.

Среди всех изученных протоколов ядерной экстракции как наиболее щадящий нами был выбран метод, описанный в работах [6, 8]. Согласно данной методике клетки в количестве 1 × 10⁷ отмывали от среды при 1000 об/мин в течение 5 мин. К осадку добавляли 1,0 мл холодного натрий-фосфатного буфера (PBS), ресуспендированные клетки переносили в чистую пробирку и повторно отмывали в течение 2 мин при 2000 об/мин. Супернатант полностью отбирали. Полученный осадок мягко ресуспендировали в 100 мкл приготовленного буфера с помощью дозатора с 1,0 мл наконечником с отрезанным концом и оставляли для инкубации на 30 мин при +4 °С. Все дальнейшие манипуляции проводили на льду. Чтобы разрушить набухшие клетки, полученную суспензию 10 раз пропускали через 1 мл шприц с толщиной иглы 26G, после чего отделяли цитозольную фракцию путем 2-минутного центрифугирования при 7000 об/мин при +4 °С. Супернатант (цитоплазматическая фракция) отбирали и помещали на холод (-70 °С) до использования. Полученный осадок (ядерная фракция) 2–3 раза отмывали от остатков цитоплазмы в 800 мкл буфера в течение 2 мин при 7000 об/мин на холоде. Супернатант тщательно отбирали. Для стабилизации ядер осадок ресуспендировали в 1,0 мл PBS с 5 ммоль MgCl₂ и оставляли в полученном растворе минимум на 18 ч при +4 °С.

Мечение ядер

Экспериментальным путем было подобрано оптимальное количество ядер на пробу для постановки РИФ. Суспензию стабилизированных ядер переносили в каждую из пробирок для измерений в объеме 400–500 мкл, что по расчетам соответствовало количеству ядер (4–5) × 10⁶.

Успешность процедуры выделения ядер контролировали путем окрашивания ядерной суспензии трипановым синим с последующим подсчетом количества жизнеспособных ядер. Кроме этого, под микроскопом анализировали мазки из полученной суспензии, окрашенные азур-эозином по Романовскому и гематоксилином Майера. Для получения мазков ядерную суспензию дополнительно разбавляли в 5 раз.

Одну часть стабилизированной ядерной суспензии сразу окрашивали соответствующими антителами, а другую – подвергали пермеабилзации с последующим мечением. Для пермеабилзации ядер экспериментальным путем был выбран 90 % холодный метанол как наиболее щадящий и в то же время эффективный реагент. Его добавляли в каждую из опытных проб по 1,0 мл с последующей инкубацией в течение 10 мин при комнатной температуре.

Мечение ядер проводили с использованием в качестве первичных anti-mouse VEGF-R1 #MAB321 (R&D Systems, США) в концентрации 50 мкг/мл по 50 мкл на пробу. Время инкубации составляло 30 мин при комнатной температуре. Вторичными антителами служили поликлональные goat anti-mouse IgG: FITC #STAR70 (AbD Serotec, Великобритания) в концентрации 10 мкг/мл по 30 мкл на пробу, инкубация длилась 30 мин при +4 °С. Чтобы проконтролировать отсутствие остатков цитоплазмы в ядерном экстракте, использовали первичные кроличьи антитела к бета-актину как специфичному цитоплазматическому белку, #4970L (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1: 200 по 50 мкл на пробу. Вторичными антителами служили goat anti-rabbit IgG: Alexa Fluor 488 #A-11008 (Invitrogen, США) 1: 1000 по 30 мкл.

Анализ ядер на проточном цитофлуориметре

Анализ ядер клеток A431 проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva.

Область гейтирования интактных ядер определяли на логарифмическом графике «DotPlot» FSC/SSC. Для выбора гейта интактные стабилизированные ядра окрашивали раствором пропидия йодида (Becton Dickinson, США). Ядра в количестве $(4-5) \times 10^6$ инкубировали 30 мин в 500 мкл раствора пропидия йодида в концентрации 50 мкг/мл при +4 °С.

На графике «DotPlot» FSC/SSC целые ядра располагаются отдельным «облаком» в правой верхней области (рис. 1, а), что подтверждается гистограммой клеточного цикла окрашенных пропидия йодидом ядер (рис. 1, б).

Статистическая обработка результатов

Все результаты исследований подвергали статистической обработке по t-тесту Стьюдента. Достоверными различиями считали значения при $p < 0,05$.

Результаты

Данные 4 независимых экспериментов подтвердили, что выбранный нами алгоритм экстракции, очистки и стабилизации ядер подходит для их иммунофлуоресцентного исследования на проточном цитофлуориметре.

В капле неокрашенной ядерной суспензии практически не наблюдалось поврежденных и слипшихся ядер. Дальнейший анализ мазков, окрашенных трипановым синим, показал, что ~98 % ядер жизнеспособны. Эти данные были подтверждены также результатами микроскопического исследования препаратов, окрашенных азур-эозином и гематоксилином Майера (рис. 2). На представленных снимках хорошо видно, что ядерная мембрана не нарушена, в кариоплазме различимы ядрышки. Остатки цитоплазмы не выявляются, о чем свидетельствует отсутствие розовой окраски эозином.

Чистоту ядерной фракции также контролировали методом нРИФ путем определения цитоплазматического белка бета-актина в ядерной суспензии. Было показано, что во всех экспериментах уровень данного белка не превышал 1 %.

Для оценки локализации VEGF-R1 в пределах ядра использовали интактные ядра, а также ядра после пермеабиллизации метанолом. В первом случае сигнал указывал на наличие белка исключительно на наружной ядерной мембране, а во 2-м – еще и внутри ядра (либо на внутренней ядерной мембране, либо непо-

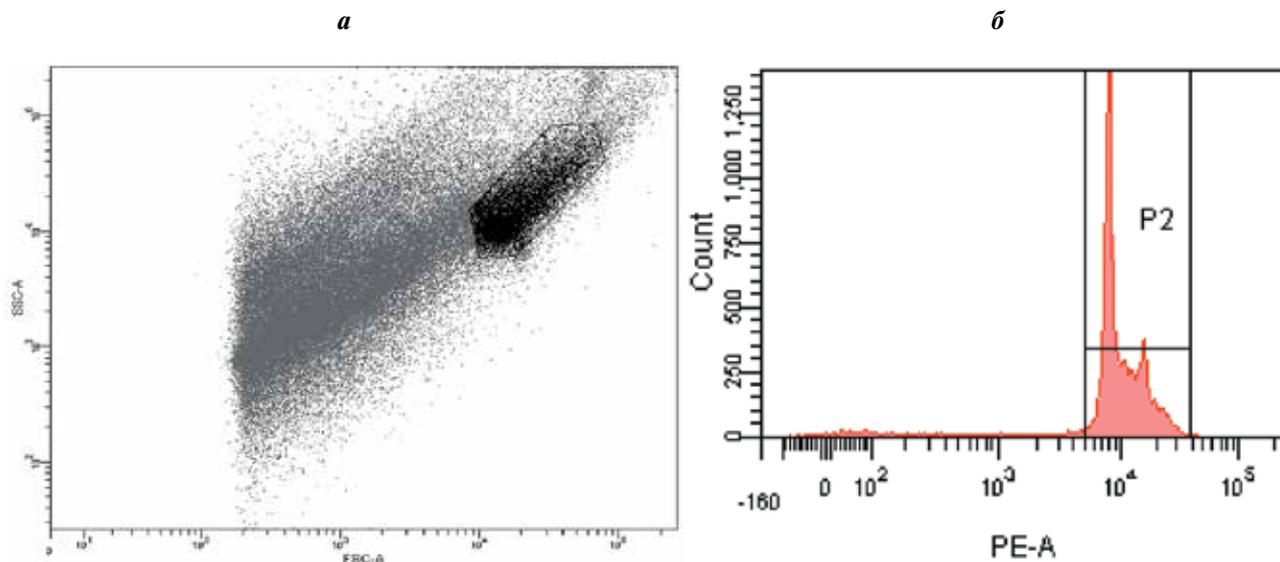


Рис. 1. Выбор гейта для интактных ядер клеток A431: а – график «DotPlot» FSC/SSC. Целые ядра расположены в верхней правой области рисунка отдельным пятном; б – гистограмма клеточного цикла (окраска пропидия йодидом) подтверждает правильность выбора гейта

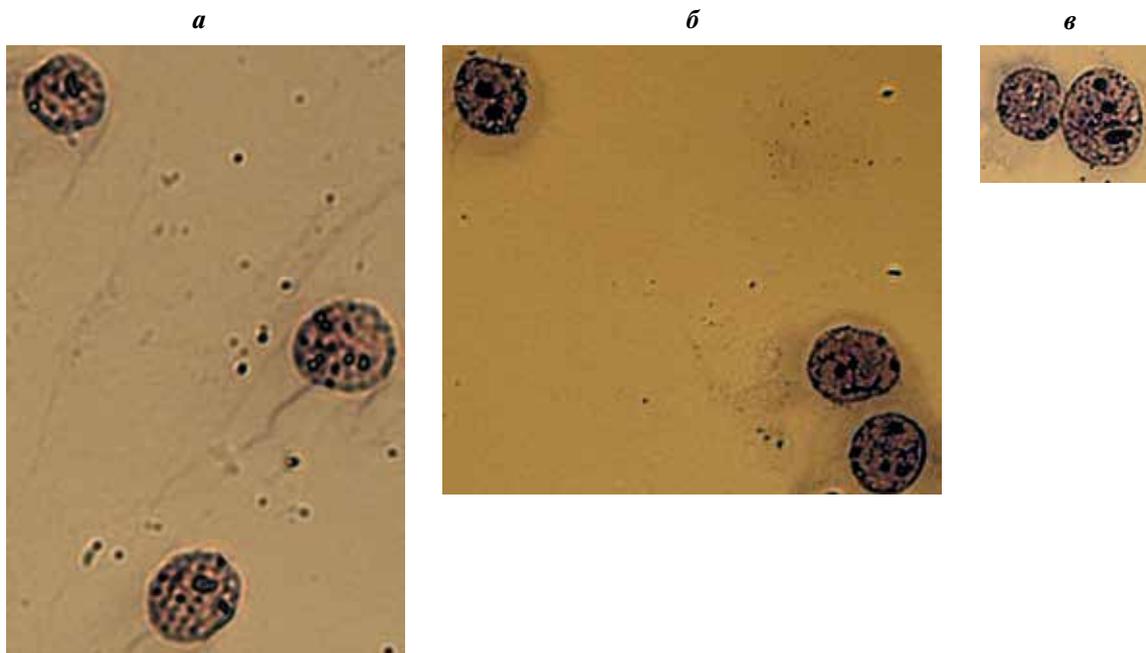


Рис. 2. Микрофотография выделенных intactных ядер клеток A431. Ув. $\times 400$: а – окраска гематоксилином Майера; б, в – окраска азур-эозином по Романовскому

средственно в кариоплазме) (рис. 3). Обнаружено, что уровень сигнала в пермеабелизованных ядрах (рис. 3, г) был выше, чем в intactных (рис. 3, б), в 3,8 раза

($17,9 \pm 1,04$ и $4,8 \pm 0,26$ % соответственно, $p = 0,003$). Это означает, что VEGF-R1 локализуется преимущественно внутри ядра. В обоих случаях доля ядер, не-

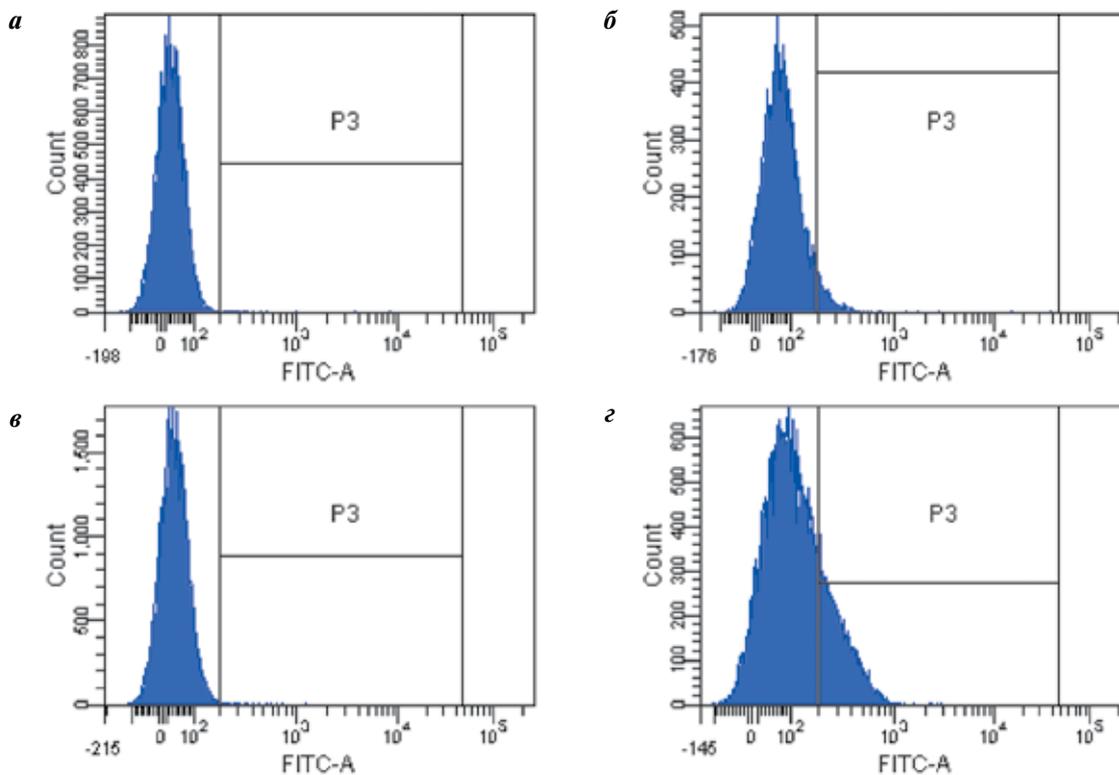


Рис. 3. Непрямая реакция иммунофлуоресценции с intactными ядрами. Уровень флуоресценции коррелирует с содержанием VEGF-R1: а – негативный контроль 1, окраска intactных ядер вторичными антимышиными антителами; б – опыт 1, intactные ядра, экспрессия VEGF-R1 на поверхности ядра; в – негативный контроль 2, окраска пермеабелизованных метанолом ядер вторичными антимышиными антителами; г – опыт 2, ядра после пермеабелизации метанолом. Видно значительное усиление экспрессии рецептора 1-го типа

специфически связавшихся со вторичными антителами, не превышала 0,5 % (рис. 3, а, в). При точном соблюдении вышеописанных условий результаты независимых экспериментов хорошо воспроизводились.

Заключение

Полученные в работе результаты наглядно свидетельствуют о том, что разработанный нами метод экстракции, очистки и стабилизации ядер пригоден для идентификации изучаемых ядерных белков на проточном цитофлуориметре. С его помощью нами была доказана ассоциация VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Причем внутри ядра содержание рецептора почти в 4 раза превышало таковое на наружной ядерной оболочке.

В доступной литературе связь рецептора 1-го типа с ядром была показана только в работе [5]. В этом исследовании ИЦХ-методом с применением конфокальной микроскопии авторы установили преимущественную ассоциацию рецептора 1-го типа с ламинами А/С. Ламины, как известно, ответственны за формирование ядерной оболочки и организацию хроматина, а их деградация приводит к апоптозу. Вероятно, VEGF-R1 каким-то образом поддерживает целостность ламин А/С, чем способствует выживанию опухолевых клеток [9].

Наши результаты не только хорошо согласуются с данными вышеприведенного исследования, но и в ка-

кой-то мере даже дополняют информацию об ассоциации VEGF-R1 с ядром опухолевой клетки. Дело в том, что ИЦХ-анализ не позволяет четко разделить окрашивание наружной и внутренней ядерных мембран, в то время как нРИФ дает такую возможность. Так, в случае интактных ядер разработанным методом определяется белок, расположенный исключительно на наружной ядерной мембране, а после ее пермеабиллизации – еще и внутриядерный. Вероятно, что обнаруженный в нашем исследовании резко возросший во 2-м случае уровень сигнала указывал, в том числе, и на VEGF-R1, связанный с ядерной ламиной. В то же время нельзя исключить возможность локализации рецептора и непосредственно в кариоплазме, например во взаимосвязи с хроматином.

Разумеется, наиболее точная информация о локализации и предполагаемых функциях любого белка будет получена лишь при сочетании различных методов исследования. Поэтому нРИФ на выделенных ядрах вместе с широко применяемыми ИЦХ-методом и вестерн-блоттингом позволит дополнить сведения о свойствах ядерноассоциированных протеинов.

Авторы выражают искреннюю благодарность за консультативную и практическую поддержку настоящего исследования сотрудникам компании ООО «ТераМАН» Д.Ю. Тырсину и С.А. Чувпило.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Георгиев Г.П., Мантьева В.Л. Выделение клеточных ядер фенольным методом и их характеристика. Биохимия 1960;25(1):143–50.
2. Mittag F., Leichtle C., Keickbusch I. et al. Cytotoxic effect and tissue penetration of phenol for adjuvant treatment of giant cell tumours. *Oncol Lett* 2013;5(5):1595–98. doi: 10.3892/ol.2013.1244. Epub 2013 Mar 11. PMID: 23760940.
3. Hattori M., Tugores A., Veloz L. et al. A simplified method for the preparation of transcriptionally active liver nuclear extracts. *DNA Cell Biol* 1990; 9(10):777–81. doi: 10.1089/dna.1990.9.777. PMID: 2264931.
4. Fan F., Wey J.S., McCarty M. F. et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogen* 2005; 24(16):2647–53. doi: 10.1038/sj.onc.1208246. PMID: 15735759.
5. Lee T.-H., Seng S., Sekine M. et al. Vascular Endothelial Growth Factor Mediates Intracrine Survival in Human Breast Carcinoma Cells through Internally Expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007;4(6):1001–16. doi:10.1371/journal.pmed.0040186.
6. Tyrsin D. Autoregulation of NFATc1 gene. [Doctorate degree in Natural Sciences]. Wurzburg: Bayerische Julius-Maximilians-Universität Wurzburg; 2007.
7. Abcam. Product Datasheet for Anti-VEGF Receptor 1 antibody ab2350.
8. Chuvpilo S., Avots A., Berberich-Siebelt F. et al. Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J Immunol* 1999;162(12):7294–301. PMID: 10358178.
9. Broers J.L. V., Ramaekers F.C. S. The role of the nuclear lamina in cancer and apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2014;773: 27–48. doi: 10.1007/978-1-4899-8032-8_2. PMID: 24563342.

МЕЛАНОЦИТАРНЫЕ НОВООБРАЗОВАНИЯ КОЖИ У ДЕТЕЙ

Г.М. Волгарева, А.В. Лебедева

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Галина Михайловна Волгарева galina.volgareva@yandex.ru

Целью работы являются анализ данных литературы об особенностях меланоцитарных новообразований кожи детей и подростков для оценки актуальности поиска диагностических молекулярных маркеров меланомы кожи у таких пациентов, а также (в случае утвердительного заключения) характеристика потенциального комплекса таких маркеров. Меланома кожи у детей и подростков представляет собою гетерогенную группу опухолей, которые по сравнению с меланомой кожи у взрослых больных имеют как некоторые черты сходства, так и существенные отличия. Дифференциальная диагностика пигментного невуса и меланомы по-прежнему вызывает у специалистов затруднения, которые можно было бы минимизировать с помощью молекулярных маркеров. В качестве возможных подходов в составе комплекса маркеров, предназначенных для дифференциальной диагностики невусов и меланомы кожи у детей, представляется целесообразным проводить детекцию в меланоцитарных новообразованиях кожи нарушений в локусе *INK4a/ARF* и иммуногистохимическое (ИГХ) исследование белка *p16^{INK4a}*, выявление амплификаций хромосомного участка *11q13* и ИГХ-детекцию циклина *D1* (белка *CCND1*) в клеточных ядрах, а также ИГХ-выявление *HLA I* класса на поверхности клеток пигментных новообразований.

Ключевые слова: меланоцит, невус, меланома кожи, маркер

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-82-89

MELANOCYTIC SKIN NEOPLASMS IN CHILDREN

G.M. Volgareva, A.V. Lebedeva

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashyrskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia

Literature data on peculiarities of melanocytic skin neoplasms in children and adolescents have been analyzed in order to evaluate topicality of research into the diagnostic markers complex for skin melanoma in these patients as well as, if the conclusion is in the affirmative, to characterize the would-be complex of such markers. Skin melanoma in children and adolescents is a heterogeneous tumor group which when compared with adult skin melanoma possesses both some features of similarity and a number of essential distinctions. Differential diagnostics between pigment nevus and melanoma remains rather intricate for professionals. These difficulties might be minimized by application of molecular markers. As a possible approach to differential diagnostics between nevi and malignant skin melanoma in children it seems worthwhile to try the following steps: to reveal *INK4a/ARF* locus lesions and to detect the protein *p16^{INK4a}* by immunohistochemistry; to check for amplifications in *11q13* chromosomal region as well as to carry out immunohistochemical detection of cyclin *D1* (protein *CCND1*) in cellular nuclei; to reveal *HLA class I* antigens on surfaces of pigment cell neoplasms in immunohistochemical test.

Key words: melanocyte, nevus, skin melanoma, marker

Введение

Меланоцитарные новообразования кожи привлекают внимание онкологов в первую очередь тем, что к их числу относится меланома кожи (МК), которая нередко развивается из доброкачественного пигментного новообразования – невуса. Так, к факторам риска развития МК у детей относят семейный синдром атипичных множественных невусов, пигментную ксеродерму, гигантский врожденный пигментный невус, множественность приобретенных пигментных невусов, атипичные невусы, наличие в семье случаев заболевания меланомой, иммуносу-

прессию [1, 2]. В частности, при исследовании степени генетической общности МК и диспластического невуса (ДН) установлена общность 90 % генов подверженности к проявлению МК и ДН [3]. При обсуждении риска развития МК повышенное внимание уделяется ДН, к которым относят эпидермальные и смешанные невусы, превышающие 0,5 см, с неравномерным распределением пигмента по поверхности и нечетким контуром. Понятие «диспластический невусный синдром» введено для случаев множественности ДН [4]. По оценкам некоторых авторов, около 30 % МК у детей возникают из гигантского

невуса, а еще 20 % — из невусов среднего и небольшого размера; вместе с тем точная частота развития МК из невусов некоторых типов до настоящего времени остается предметом дискуссий [2].

МК — злокачественная опухоль, возникающая при трансформации меланоцитов (клеток, продуцирующих меланин). МК является одной из наиболее злокачественных опухолей человека с непредсказуемым течением, она часто рецидивирует и метастазирует лимфогенным и гематогенным путем практически во все органы. Те или иные изменения в функционировании меланоцитов, вызванные внешними или внутренними причинами (в том числе генетическими), могут послужить стимулом к возникновению пигментного невуса.

Невусы — биологически стабильные нарушения, которые принято рассматривать как факультативные предшественники МК [5].

Доброкачественные и злокачественные пигментные новообразования кожи весьма разнообразны по времени возникновения в онтогенезе, морфологии, клиническим характеристикам, частоте их обнаружения у представителей разных этнических групп, а также по характерным для каждого типа новообразований генетическим нарушениям [4, 6, 7]. По данным НИИ онкологии им. проф. Н.Н. Петрова (Санкт-Петербург), наиболее частым фоном для развития МК являлись следующие типы невусов: сложный, пограничный, интрадермальный и голубой невусы; при этом 70 % всех невусов расценивались как врожденные, а 30 % — как приобретенные [8].

МК у детей и подростков — весьма редкое заболевание [2, 9, 10]. Вместе с тем, составляя в США приблизительно 1–4 % всех случаев МК, за период с 1973 по 2001 г. заболеваемость ею в этих возрастных группах в США увеличилась на 46 %, а в возрастной группе от 15 до 29 лет МК оказалась наиболее частой солидной опухолью [11].

В России МК у детей и подростков тоже является редким заболеванием. Так, в то время как заболеваемость всеми формами злокачественных опухолей за период 2008–2012 г. составила 125 на 1 млн детского населения (0–17 лет), стандартизованный показатель заболеваемости МК среди детей и подростков до 17 лет оказался равным 0,8 на 1 млн. Пик заболеваемости МК приходится на подростков 15–17 лет — 2,4 на 1 млн (по сравнению с 0,2 в возрастной группе 0–4 года, 0,6 — в группе от 5 до 9 лет, 0,7 — в группе от 10 до 14 лет). Стандартизованный показатель смертности от злокачественных новообразований в возрасте 0–17 лет составил в тот же период времени 40,0 на 1 млн детского населения, тогда как показатель смертности от МК — 0,1 (в возрастной группе 15–17 лет — 0,5) [12]. Вместе с тем, по данным этих исследователей, недоучет заболе-

ваемости детей и подростков в России составляет не менее 20 %, а уровень их смертности от злокачественных опухолей в нашей стране более чем на 50 % превышает смертность в развитых странах; среди причин высокой смертности авторы выделяют неадекватную диагностику.

Редкость МК у детей может являться причиной снижения бдительности дерматологов и онкологов при ее диагностике. Вместе с тем именно раннее обнаружение МК позволяет провести эффективное хирургическое лечение этого заболевания [8, 10]. Так, по данным В.Г. Полякова и Р.В. Шишкова, стойкое излечение после хирургического удаления первичного очага опухоли на ранних стадиях ее развития может быть достигнуто у 80–90 % больных [8].

Цель исследования — анализ данных литературы об особенностях меланоцитарных новообразований кожи у детей и подростков для оценки актуальности поиска диагностических молекулярных маркеров МК в этих возрастных группах (в отличие от МК у взрослых), а также в случае утвердительного заключения — краткая биологическая характеристика потенциального комплекса таких маркеров.

Меланома кожи у детей и подростков

Согласно систематике В.С. Bastian [6] МК у детей и подростков представляет собой гетерогенную группу новообразований, которая включает атипичные спитцоидные опухоли; МК, развивающуюся из врожденного невуса и поражающую преимущественно маленьких детей; МК, возникающую в постпубертатном периоде и не связанную с кумулятивными повреждениями, вызванными солнечными лучами. Последняя разновидность МК по своим клиническим проявлениям и прогнозу близка к МК у взрослых больных. МК препубертатного возраста может поражать и небелокожих индивидуумов, тогда как МК постпубертатного возраста в подавляющем большинстве случаев — заболевание белокожих подростков. Не все случаи МК в препубертатном периоде являются спитцоидными или возникают из врожденного невуса, что дает автору основание считать, что существуют и другие разновидности детской МК [6].

В.А. Averbook и соавт. провели обширное исследование, основанное на данных международного регистра меланомы у молодых пациентов, которые были представлены 12 медицинскими учреждениями. Оно включало 365 случаев МК, в которых возраст больных находился в пределах от 1 до 21 года и для которых имелись данные *follow-up* [11]. Оказалось, что общая 10-летняя выживаемость этих больных статистически достоверно зависела от их возраста: при среднем значении данного показателя для всех пациентов, равном 80,6 %, в группе больных не старше 10 лет он составил 100 %, в группе старше 10, но

не выше 15 лет — 69,7 %, а среди больных от 16 до 20 лет включительно — 79,5 %. Ранее аналогичную тенденцию выявили S. Paradela и соавт., проведя ретроспективный анализ 137 случаев МК, а также меланомы слизистых оболочек у пациентов в возрасте до 18 лет [13]. Эти результаты указывают на существование различий в биологии МК, возникающей у молодых пациентов, относящихся к разным возрастным группам.

Отечественные онкологи неоднократно обращались к теме меланоцитарных новообразований кожи у детей [1, 8, 14, 15]. Вместе с тем систематические эпидемиологические исследования МК у детей и подростков в России не проводились. В единственной работе, целиком посвященной данной проблеме, охватившей период с 1990 по 2009 г., было установлено, что показатель заболеваемости МК среди лиц моложе 20 лет составил 1,99 на 1 млн населения [1]. При невысокой заболеваемости уровень смертности от МК детей и подростков достаточно высок — 0,25 на 1 млн. Значительный рост заболеваемости МК в этой возрастной группе, более чем на 9 % в год, отмечен в 1990-е гг. Низким по сравнению с развитыми странами Запада является показатель эффективности онкологической помощи детскому населению России при МК: индекс смертности/заболеваемости составляет 12 %, тогда как в США, Канаде, Австралии — около 2 %. Тенденции к снижению смертности детского населения от МК, которая имеет место в последние годы в некоторых зарубежных странах, в России пока не наблюдается. Обнаружены регионы с 3–5-кратным превышением среднего по России уровня заболеваемости. В качестве ведущей причины относительно высокой смертности детского населения от МК авторы называют позднее выявление и, как следствие, запущенность опухолевого процесса.

Среди методов диагностики детской и подростковой МК принято выделять клинические, инструментальные и морфологические [8]. Разработаны и успешно используются несколько подходов к неинвазивной диагностике МК — дерматоскопия, СИА-скопия, конфокальная микроскопия [16].

Важнейшую роль при установлении диагноза МК и определении степени местного распространения процесса играет морфологическое исследование — цитологический анализ мазка в случае изъязвления новообразования, а также гистологическое исследование удаленной опухоли. Однако, как показывает опыт квалифицированных дерматопатологов, по-прежнему одной из наиболее сложных проблем в изучении МК у детей является проведение дифференциального диагноза доброкачественных и злокачественных меланоцитарных новообразований. Конкордантность заключений нескольких специалистов при анализе одного и того же новообразования часто оказывается невысокой [17]. Ряд авторов выделяют невусы Шпиц

как представляющие значительные трудности при дифференциальной диагностике [18–20]. В обзоре T. Brenn, посвященном возможным причинам гипер- и гиподиагностики МК, приведен перечень характеристик меланоцитарных новообразований, чаще свойственных МК, однако нередко отмечаемых и для невусов:

- меланоцитарная атипия,
- незрелость дермы,
- митотическая активность в дерме,
- сильная меланиновая пигментация, регрессия дермы

и ряд других. По мнению автора, при диагностике для морфолога часто представляют затруднения следующие типы невусов:

- галоневусы,
- возвратные,
- митотически активные,
- десмопластические,
- голубые.

В данной работе подчеркивается, что при возникновении морфологических неясностей необходимо сообщать о них лечащему врачу [7].

Что касается диагностики детской и подростковой МК, дополнительные затруднения возникают еще и потому, что около половины МК у пациентов этих возрастных групп могут не содержать пигмента [21].

В связи с этим представляется обоснованным и своевременно сформулированным в ряде работ мнение, согласно которому лучшее понимание молекулярно-генетических особенностей МК у детей и подростков позволит выработать маркеры для принятия более точных решений [19, 22].

Поиск молекулярных маркеров меланомы кожи у детей и подростков

Ранее мы изучили данные литературы, касающиеся возможных приемов молекулярно-генетической и биохимической диагностики МК у детей [23]. Анализ показал противоречивость ситуации, сложившейся в этой области.

С одной стороны, сотни работ посвящены биологии МК и потенциальным маркерам для диагностики заболевания, прогноза его течения, подбора индивидуальных приемов терапии МК, а также для оценки эффективности проведенного лечения. В результате исследований генома, транскриптома и метаболома МК обнаружены многочисленные различия между клетками МК и нормальными меланоцитами, многие из этих различий потенциально, вероятно, можно использовать в онкологической клинике в качестве маркеров. Характерным примером подобных исследований служит работа B.E. Gould Rotberg и D.L. Rimm, обобщивших данные около 500 статей и предложивших в итоге перечень из 100 белков, потенциально пригодных

в качестве прогностических маркеров МК, но нуждающихся, по мнению авторов, в дополнительных исследованиях для уточнения ценности последних [24]. Однако следует заметить, что остается неясным, могут ли многие из известных на сегодня молекулярных отличий клеток МК от нормальных меланоцитов служить в качестве диагностических маркеров или эти отклонения возникают в меланомной клетке на более поздних стадиях прогрессии опухоли.

С другой стороны, работы, посвященные поиску маркеров именно детской и подростковой МК, практически отсутствуют. Имеет место тенденция, понятная ввиду редкости МК в этих возрастных группах, к механическому переносу в область детской и подростковой онкологии находок, сделанных для МК взрослых больных. Рациональной основой для такого переноса является распространенное клише о том, что «меланома — она и есть меланома». Вместе с тем очевидные физиологические отличия между лицами указанных возрастных групп побуждали многих авторов высказывать сомнения в правомерности такого переноса [10, 11, 22, 25]. Приходится, однако, констатировать, что систематический поиск молекулярных маркеров МК у детей и подростков до настоящего времени не проводится. Поэтому в настоящей работе мы вынуждены в ряде случаев привлекать данные, полученные при изучении МК у взрослых больных.

Рассмотрение проблемы МК у детей и подростков осложнено также тем, что разные авторские коллективы, представляя свои результаты, ориентируются на неодинаковые возрастные рамки периодов. Так, в 14 публикациях, посвященных МК у детей, максимальный возраст пациентов, включенных в исследование, варьировал от 11 до 20 лет [26].

Известно, что МК, обнаруживаемая у ребенка или подростка, как правило, характеризуется большей толщиной, чем опухоль, выявляемая у взрослого пациента [21]. Данное обстоятельство дополнительно затрудняет сопоставление биологических параметров и клинических особенностей МК у детей с аналогичными характеристиками этой опухоли у взрослых пациентов. Устранить это затруднение попытались D. Livestro и соавт. [21]. С этой целью к каждому больному МК в возрасте до 21 года («случай») они подобрали по 2 «контроля» — по 2 взрослых пациента с МК той же толщины, что и у молодого больного. Все 73 «случая», а также все 146 «контролей» прошли лечение в одной медицинской клинике, причем «контроли» к каждому «случаю» получали лечение в тот же период времени, что и соответствующий «случай». Последнее было важным, поскольку больные МК, включенные в данное исследование, поступали в клинику на протяжении 30 лет, а тактика диагностики и лечения МК за этот период существенно

изменилась. Оказалось, что при одинаковой толщине опухоли МК у молодого больного достоверно чаще, чем МК у взрослого, метастазирует в лимфатические узлы — 17,8 и 9,6 % соответственно. Вместе с тем показатели опухолеспецифической 10-летней выживаемости «случаев» и «контролей» статистически не различались — 89,4 и 79,3 % соответственно. Авторы пришли к заключению, что у молодых и взрослых больных МК имеют как принципиальные различия, так и существенные черты сходства.

Поиск диагностических маркеров МК, а также подбор эффективных схем ее лекарственного лечения значительно осложняет тот факт, что меланома — крайне гетерогенная по клеточному составу опухоль, состоящая из субпопуляций клеток с разными молекулярными характеристиками и биологическими фенотипами. Так, M. Yankovitz и соавт. выявили гетерогенность клеток внутри одного первичного опухолевого узла МК в отношении наличия в них мутации *BRAF^{V600E}* (присутствие такой мутации в клетках МК служит основанием для назначения больному определенного таргетного лечения), причем и мутантные клетки, и клетки дикого типа оказались в равной степени способны давать метастазы [27]. С учетом этого, как указывает ряд авторов, по отношению к МК даже в большей степени, чем по отношению к другим злокачественным новообразованиям, необходим комплексный подход как при диагностике, а именно при использовании нескольких маркеров, так и при назначении таргетной терапии для ее лечения — применение комплекса химиопрепаратов, нацеленных на разные субпопуляции меланомных клеток [27, 28].

К проблеме высокой гетерогенности клеточного состава МК примыкает вопрос о стволовых клетках данной опухоли. До недавнего времени было принято считать, что на долю этих клеток, способных к самообновлению, а также к инициации гетерогенных клеточных линий, в совокупности образующих опухоль, в составе того или иного злокачественного новообразования, включая МК, приходится не более 0,1 % и что именно эта минорная субпопуляция клеток ответственна за развитие резистентности новообразования к химиотерапевтическим препаратам [29]. Крайне неожиданными поэтому оказались результаты E. Quintana и соавт., показавшие, что приблизительно каждая 4-я опухолевая клетка, полученная непосредственно из первичного опухолевого узла или из метастаза от больного МК без какого-либо предварительного отбора, способна образовывать опухоль в эксперименте при прививке мышам с сильным иммунодефицитом, т.е. является туморогенной и может рассматриваться как стволовая клетка МК. При исследовании 50 различных маркеров исследователи не выявили единого фенотипа у этих опухолеродных клеток, т.е. и сама субпопуляция

стволовых клеток МК оказалась гетерогенной [30]. В связи с этим авторы высказывают мнение, согласно которому статус стволовой клетки МК означает не столько обязательную дальнейшую судьбу этой клетки, сколько ее потенциальную способность дать новый опухолевый узел и реализация этой способности определяется дополнительными условиями и, в частности, микроокружением этой клетки.

В настоящее время продолжаются исследования стволовых клеток МК, отличий этих клеток от стволовых клеток нормальных меланоцитов, поиск специфических маркеров стволовых клеток МК, а также разработки, касающиеся использования характеристик стволовых клеток МК при лечении данной опухоли [31, 32].

В целом в литературе имеются указания как на сходство между МК у молодых пациентов и МК у взрослых больных, так и на существенные различия характеристик данной опухоли в разных возрастных группах. О сходстве сообщили D. Livestro и соавт. (2007), выявившие одинаковую выживаемость молодых и взрослых больных МК в случаях, если эти пациенты имели первичную опухоль равной толщины; и те же авторы, однако, выявили достоверно более высокую частоту метастазирования МК у детей и подростков в лимфатические узлы по сравнению с МК у взрослых больных [26]. Установлено, что общая 10-летняя выживаемость молодых больных МК достоверно колеблется в зависимости от их возраста [11, 13]. Неодинаковая метастатическая активность МК у пациентов разных возрастных групп и разная выживаемость больных МК, являясь интегральными характеристиками опухоли, по-видимому, отражают различия в молекулярном фенотипе меланомы у пациентов разных возрастных групп. Следовательно, маркеры МК взрослых больных могут оказаться недостаточно информативными или неинформативными по отношению к МК детей и подростков, и специальный поиск диагностических молекулярных маркеров для МК у лиц молодого возраста актуален.

Далее мы представим краткую биологическую характеристику возможного комплекса таких маркеров.

Характеристика потенциального комплекса молекулярных маркеров для дифференциальной диагностики пигментного невуса и меланомы кожи

Рассматривая генетическую природу МК, мы убедились, что количество генов, мутации которых в той или иной степени предрасполагают к развитию МК, весьма значительно [1]. Среди них имеются гены как с высокой, так и с низкой пенетрантностью.

Ген *CDKN2A* и его белковый продукт

Несмотря на этот факт, «главным геном» МК остается *CDKN2A*, локализованный в коротком пле-

че хромосомы 9 (9p21). Нарушения структуры данного гена обнаруживаются как в наследственной, так и в спорадической МК. По данным некоторых авторов, частота обнаружения составляет до 70 % [33]. Белковый продукт этого гена, p16^{INK4a}, является ингибитором циклинзависимых киназ CDK 4/6, осуществляющих фосфорилирование белка ретинобластомы pRb и регулирующих, таким образом, переход клетки из стадии G₁ митотического цикла в стадию репликации ДНК. Необычность структуры этого гена заключается в том, что его 2-й экзон одновременно является одним из экзонов другого гена – *ARF*, белковый продукт которого, p14^{ARF} (у мыши – p19^{ARF}), выполняет в клетке функцию стабилизации супрессора опухолевого роста p53 [34]. Вместе эти 2 белка являются стабилизаторами сразу 2 супрессоров опухолевого роста – и pRb, и p53. В результате описания структуры соответствующего хромосомного локуса, обозначаемого как *INK4a/ARF*, стало понятно, почему гомозиготные делеции этого локуса, обнаруживаемые в опухолях многих типов, включая МК, имеют фатальные последствия: в клетке в результате утраты обеих копий сразу 2 этих генов нарушаются все функции, подконтрольные и pRb, и p53, – пролиферация, апоптоз, репарация и др. На экспериментальной модели установлено, что оба белковых продукта, кодируемых этой областью хромосомы, p16^{INK4a} и p19^{ARF}, кооперируют между собой и что для возникновения МК нужна утрата функций обоих этих белков [35].

В опытах *in vivo* показано, что накопление p16^{INK4a}, имеющее место по мере старения организма в клетках различных тканей, в том числе в некоторых клетках нервной системы, снижает пролиферативные возможности, что происходит, по-видимому, за счет истощения пула стволовых клеток в них [36, 37]. Позднее была описана еще одна (pRb-независимая активность p16^{INK4a} как супрессора опухолевого роста) его способность нормализовать повышенные внутриклеточные концентрации активных форм кислорода, т.е. защищать клетку от канцерогенного внутриклеточного окислительного стресса. Оказалось, что из клеток разных типов именно меланоциты наиболее чувствительны к окислительному стрессу, подконтрольному p16^{INK4a} [38]. Таким образом, получено объяснение следующего факта: при выпадении функции p16^{INK4a} именно МК возникает чаще, чем опухоли иных типов.

В свете приведенных выше сведений о биологических функциях p16^{INK4a} можно оценить как ожидаемые результаты, полученные V. Gray-Schopfer и соавт. при иммуногистохимической (ИГХ) детекции данного белка в невусах и МК у взрослых больных. В то время как клетки обычных родинок содержали p16^{INK4a} в ядрах и цитоплазме, а в меланоцитах эпи-

теля, прилегающего к невусу, данный ингибитор пролиферации не выявлялся, во всех ДН экспрессия p16^{INK4a} оказалась крайне неоднородной: здесь он обнаруживался преимущественно в цитоплазме, но отсутствовал в ядрах (тогда как свою функцию негативного регулятора пролиферации как элемент «пути pRb» он выполняет в ядре). В большинстве клеток МК на стадии радиального роста опухоли p16^{INK4a} не выявлялся, и данная тенденция еще усиливалась в опухолях на стадии их вертикального роста [39].

В целом совокупность представленных выше данных позволяет рассматривать детекцию нарушений в локусе INK4a/ARF и ИГХ-исследование белка p16^{INK4a} в меланоцитарных новообразованиях кожи у детей как перспективные подходы для дифференциальной диагностики невусов и МК.

Ген *CCND1* и его белковый продукт

Циклин D1 (*CCND1*), так же как и p16^{INK4a}, является белком, функционирующим в так называемом регуляторном пути pRb, но в противоположность p16^{INK4a} этот белок является не ингибитором, а активатором продвижения клетки из стадии G₁ в стадию S митотического цикла. Связываясь с циклинзависимыми киназами CDK4 или CDK6, он активирует эти киназы, которые приобретают способность фосфорилировать белок ретинобластомы (pRb). Фосфорилированный pRb перестает ингибировать транскрипционные факторы семейства E2F, в результате чего в клетке начинается репликативный синтез ДНК [40]. Будучи важным участником регуляции клеточного цикла, *CCND1* может играть значительную роль в развитии злокачественных опухолей. Онкоген *CCND1* локализован в длинном плече хромосомы 11 (11q13); экспрессия белка *CCND1* в норме регулируется извне клетки с помощью разнообразных ростовых факторов. Эта регуляция осуществляется через сигнальные каскады Ras–Raf–MEK–ERK и PI3K–Akt–mTOR; в ней принимают участие различные цитокины, транскрипционные факторы, белки внеклеточного матрикса. Нарушения, которые затрагивают любую из этих молекул, могут привести к расстройству контроля клеточного цикла.

Амплификация участка хромосомы 11, в котором находится ген *CCND1*, а также повышение клеточного уровня белка *CCND1* были обнаружены во многих опухолях человека, включая МК [41–44]. По данным J. Oba и соавт., по содержанию в клетках белка *CCND1* можно дифференцировать тонкую МК от пигментного невуса [43].

Таким образом, выявление амплификаций хромосомного участка 11q13, где находится ген *CCND1*, а также ИГХ-детекция циклина D1 представляют перспективными подходами для дифференци-

альной диагностики пигментных невусов и МК у детей.

Антигены главного комплекса гистосовместимости I класса

Молекулы антигенов главного комплекса гистосовместимости I, экспрессирующиеся на поверхности клеток различных типов, принимают участие как в неспецифических, так и в специфических иммунных реакциях. Нарушения функционирования этих антигенов играют важную роль в процессе «ускользания» опухоли от иммунологического надзора при прогрессии новообразования. Особенности экспрессии HLA (human leucocyte antigens) I класса в нормальных меланоцитах, клетках пигментных невусов, а также в МК изучаются на протяжении нескольких десятилетий. Известно, что на поверхности опухолевых клеток их экспрессия нередко коррелирует с особенностями клинического течения заболеваний, такими как безрецидивный период, а также выживаемость, а в случае ДН – со степенью выраженности клеточной атипии [45–47]. Относительно роли HLA I класса в ходе возникновения и развития МК остается ряд неясных и дискуссионных моментов; очевидно, что статус этих антигенов на поверхности клеток МК не является константным, а механизмы ослабления и/или усиления их экспрессии на поверхности опухолевой клетки чрезвычайно разнообразны [45]. Вместе с тем совокупность известных на сегодня фактов позволяет считать целесообразной ИГХ-детекцию этого белка на поверхности клеток пигментного новообразования при разработке комплекса молекулярных маркеров, предназначенного для совершенствования диагностики МК у детей и подростков.

Заключение

МК у детей и подростков представляет собою гетерогенную группу высокозлокачественных новообразований, которые по сравнению с МК у взрослых имеют как некоторые черты сходства, так и существенные отличия. Несмотря на значительный прогресс в диагностике и лечении МК у лиц молодого возраста, достигнутый в последнее время, дифференциальная диагностика пигментного невуса и МК по-прежнему вызывает у специалистов затруднения. Эти трудности, по-видимому, можно было бы минимизировать с помощью комплекса молекулярных маркеров. При разработке такого комплекса представляется допустимым использовать в качестве исходных, но нуждающихся в верификации, наработки, касающиеся маркеров МК у взрослых больных.

Известные на сегодня факты позволяют предлагать в качестве возможных подходов в составе такого

комплекса, предназначенного для дифференциальной диагностики доброкачественных пигментных новообразований и МК у детей, детекцию в меланодарных новообразованиях кожи нарушений в локусе INK4a/ARF и ИГХ-исследование белка p16^{INK4a};

выявление амплификаций хромосомного участка 11q13 и ИГХ-детекцию циклина D1 (белка CCND1) в клеточных ядрах, а также ИГХ-выявление HLA I класса на поверхности клеток пигментных новообразований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Мень Т.Х., Дорошенко М.Б., Алиев М.Д. Злокачественная меланома кожи у детей и подростков в России: популяционное эпидемиологическое исследование. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2011;(2):55–60.
2. Jen M., Murphy M., Grant-Kels J.M. Childhood melanoma. Clin Dermatol 2009;27(6):529–36. doi: 10.1016/j.clindermatol.2008.09.011. PMID:19880040.
3. Харкевич Г.Ю., Казубская Т.П., Агапова Р.К. и др. Клинико-генетические аспекты меланомы кожи. II. Взаимосвязь и патогенетическая общность меланомы кожи с диспластическими невусами. Генетика 1995;31(11):1562–5.
4. Гребенникова О.П., Прилепо В.Н. В кн.: Онкология для практикующих врачей (ред. С.С. Чистяков). М.: Авторская Академия, 2009. 548–563.
5. Miller A.J., Mihm M.C. Jr. Melanoma. N Engl J Med 2006;355(1):51–65. PMID:16822996.
6. Bastian B.C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. Annu Rev Pathol 2014;9:239–71. doi: 10.1146/annurev-pathol-012513-104658. PMID:24460190.
7. Brenn Th. Pitfalls in the evaluation of melanocytic lesions. Histopathology 2012;60(5):690–705. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04042.x. Epub 2011 Dec 16. PMID:22176022.
8. Поляков В.Г., Шишков Р.В. Клинические рекомендации по диагностике и лечению меланомы у детей и подростков. Проект. Общероссийский союз общественных объединений. Ассоциация онкологов России. М., 2014.
9. Hamm H., Hoyer P.H. Skin tumors in childhood. Dtsch Arztebl Int 2011;108(20):347–53. doi: 10.3238/arztebl.2011.0347. Epub 2011 May 20. PMID:21655460.
10. Kirkwood J.M., Jukic D., Averbook B.J., Sender L.S. Melanoma in pediatric, adolescent and young adult patients. Semin Oncol 2009;36(5):419–31. doi: 10.1053/j.seminoncol.2009.07.001. PMID:19835737.
11. Averbook B.J., Lee S.J., Delman K.L. et al. Pediatric melanoma: analysis of an international registry. Cancer 2013;119(22):4012–9. doi: 10.1002/sncr.28289. Epub 2013 Sep 10. PMID:24022819.
12. Мень Т.Х., Рыков М.Ю., Поляков В.Г. Злокачественные новообразования у детей в России: основные показатели и тенденции. Российский онкологический журнал 2015;20(2):43–7.
13. Paradelo S., Fonseca E., Pita-Fernandez S. et al. Prognostic factors for melanoma in children and adolescents. Cancer 2010;116(18):4334–44. doi: 10.1002/sncr.25222. PMID:20549825.
14. Дурнов Л.А., Паршикова С.М., Чернова Н.В. Меланома кожи у детей. Педиатрия 1983;10:58–61.
15. Чернова Н.В., Дурнов Л.А., Лебедев В.И. и др. Меланома кожи у детей. Педиатрия 1999;(3):65–7.
16. Малишевская Н.П., Соколова А.В. Современные методы неинвазивной диагностики меланомы кожи. Вестник дерматологии и венерологии 2014;(4):46–53.
17. Wechsler J., Bastuji-Garin S., Spatz A. et al. Reliability of histopathologic diagnosis of malignant melanoma in children. Arch Dermatol 2002;138(5):625–8. PMID:12020223.
18. Cesinaro A.M., Schirosi L., Bettelli S. et al. Alterations of 9p21 analysed by FISH and MLPA distinguish atypical melanocytic tumours from conventional Spitz's nevi but do not predict their biological behavior. Histopathology 2010;57(4):515–27. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03653.x. Epub 2010 Sep 22. PMID:20860655.
19. Dummer R., Kerl K., Mihic D., Kamarachev J. Differential diagnosis of melanocytic lesions and molecular biology. Arch Dermatol 2011;147(2):232–3. doi: 10.1001/archdermatol.2010.438. PMID:21339451.
20. Mones J.M., Ackerman A.B. Melanoma in prurubescens children: review comprehensively, critique historically, criteria diagnostically, and course biologically. Am J Dermatopathol 2003;25(3):223–38. PMID:12775985.
21. Ferrari A., Bono A., Baldi M. et al. Does melanoma behave differently in younger children than in adults? A retrospective study of 33 cases of childhood melanoma from a single institution. Pediatrics 2005;115(3):649–54. PMID:15741367.
22. Lu C., Zhang J., Nagahawatte P. et al. The genomic landscape of childhood and adolescent melanoma. J Invest Dermatol 2015;135(3):816–23. doi: 10.1038/jid.2014.425. Epub 2014 Sep 30. PMID:25268584.
23. Волгарева Г.М., Байкова В.Н., Лебедева А.В., Алиев М.Д. Изучение молекулярных особенностей пигментных новообразований кожи как задача детской онкологии. Обзор литературы. Детская онкология 2012;(4):3–13.
24. Gould Rothberg B.E., Rimm D.L. Biomarkers: the useful and the not so useful – an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. J Invest Dermatol 2010;130(8):1971–87. doi: 10.1038/jid.2010.149. Epub 2010 Jun 17. PMID:2055347.
25. Bleyer A., Barr R., Hayes-Lattin B. et al. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. Nat Rev Cancer 2008;8(4):288–98. doi: 10.1038/nrc2349. PMID:18354417.
26. Livestro D.P., Kaine E.M., Michaelson J.S. et al. Melanoma in the young: differences and similarities with adult melanoma. A case-matched controlled analysis. Cancer 2007;110(3):614–24. PMID:17577228.
27. Yancovitz M., Litterman A., Yoon J. et al. Intra- and inter-tumor heterogeneity of BRAF(V600E) mutations in primary and metastatic melanoma. PLoS One 2012;7(1):e29336. doi: 10.1371/journal.pone.0029336. Epub 2012 Jan 3. PMID:22235286.
28. Somasundaram R., Villanueva J., Herlyn M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. Adv Pharmacol 2012;65:335–59. doi: 10.1016/B978-0-12-397927-8.00011-7. PMID:22959031.
29. Clarke M.F., Dick J.E., Dirks P.B. et al. Cancer stem cells – perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. Cancer Res 2006;66(19):9339–44. Epub 2006 Sep 21. PMID:16990346.
30. Quintana E., Shackleton M., Sabel M.S. et al. Efficient tumor formation by single human melanoma cells. Nature 2008;456(7222):593–8. doi: 10.1038/nature07567. PMID:19052619.

31. Lang D., Mascarenhas J.B., Shea C.R. Melanocytes, melanocyte stem cells and melanoma stem cells. *Clin Dermatol* 2013;31(2):166–78. doi: 10.1016/j.clindermatol.2012.08.014. PMID:23438380.
32. Schlaak M., Schmidt P., Bangard C. et al. Regression of metastatic melanoma by targeting cancer stem cells. *Oncotarget* 2012;3(1):22–30. PMID:22289880.
33. Kong Y., Kumar S.M., Xu X. Molecular pathogenesis of sporadic melanoma and melanoma-initiating cells. *Arch Pathol Lab Med* 2010;134(12):1740–9. doi: 10.1043/2009-0418-RAR.1. PMID:21128770.
34. Sharpless N.E., DePinho R.A. The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9(1):22–30. PMID:10072356.
35. Sharpless N.E., Kannan K., Xu J. et al. Both products of the mouse Ink4a/Arf locus suppress melanoma formation in vivo. *Oncogene* 2003;22(32):5055–9. PMID:12902988.
36. Krishnamurthy J., Ramsey M.R., Ligon K.L. et al. p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. *Nature* 2006;443(7110):453–7. Epub 2006 Sep 6. PMID:16957737.
37. Molofsky A.V., Slutsky S.G., Joseph N.M. et al. Increasing p16INK4a expression decreases forebrain progenitors and neurogenesis during ageing. *Nature* 2006;443(7110):448–52. Epub 2006 Sep 6. PMID:16957738.
38. Jenkins N.J., Liu T., Cassidy P. et al. The p16INK4a tumor suppressor regulates cellular oxidative stress. *Oncogene* 2011;30(3):265–74. doi: 10.1038/onc.2010.419. Epub 2010 Sep 13. PMID:20838381.
39. Gray-Schopfer V.C., Cheong S.C., Chong H. et al. Cellular senescence in naevi and immortalization in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer* 2006;95(4):496–505. Epub 2006 Aug 1. PMID:16880792.
40. Lamb J., Ramaswamy S., Ford H.L. et al. A mechanism of cyclin D1 action encoded in the pattern of gene expression in human cancer. *Cell* 2003;114(3):323–34. PMID:12914697.
41. Bastian B.C., LeBoit P.E., Hamm H. et al. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998;58(10):2170–5. PMID:9605762.
42. Gerami P., Jewell S.S., Pouryazdanparast P. et al. Copy number gains in 11q13 and 8q24 are highly linked to prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Mol Diagn* 2011;13(3):352–8. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.01.011. PMID:21497295.
43. Oba J., Nakahara T., Abe T. et al. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. *J Dermatol Sci* 2011;62(2):116–23. doi: 10.1016/j.jdermsci.2011.02.011. Epub 2011 Mar 5. PMID:21454057.
44. Vizkeleti L., Ecsedi S., Rakosy Z. et al. The role of CCND1 alterations during the progression of cutaneous malignant melanoma. *Tumour Biol* 2012;33(6):2189–99. doi: 10.1007/s13277-012-0480-6. Epub 2012 Sep 23. PMID:23001925.
45. Campoli M., Ferrone S. HLA antigen and NK cell activating ligand expression in malignant cells: a story of loss or acquisition. *Semin Immunopathol* 2011;33(4):321–34. doi: 10.1007/s00281-011-0270-z. Epub 2011 Apr 28. PMID:21523560.
46. Carretero R., Wang E., Rodriguez A.I. et al. Regression of melanoma metastases after immunotherapy is associated with activation of antigen presentation and interferon-mediated rejection genes. *Int J Cancer* 2012;131(2):387–95. doi: 10.1002/ijc.26471. Epub 2011 Nov 9. PMID:21964766.
47. Ruiter D.J., Bhan A.K., Harrist T.J. et al. Major histocompatibility antigens and mononuclear inflammatory infiltrate in benign nevocellular proliferations and malignant melanoma. *J Immunol* 1982;129(6):2808–15. PMID:6183345.

ЛИПОСОМЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

А.О. Райков¹, А. Хашем¹, М.А. Барышникова²

¹ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России; Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

²ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова ma_ba@mail.ru

Направленная доставка противоопухолевых препаратов к опухолевым клеткам-мишеням кажется весьма многообещающим способом терапии злокачественных новообразований. Исследования по применению иммунолипосом в качестве наноконтейнеров для лекарств начались еще в 90-е гг. XX в. Иммунолипосомальная лекарственная форма противоопухолевых лекарств имеет преимущества перед традиционными лекарственными формами: благодаря липидной оболочке снижается токсичность препарата, за счет селективной доставки в опухолевую ткань повышается его биодоступность. Однако, несмотря на эти преимущества, на сегодняшний день иммунолипосомальные препараты не используются в клинике.

В обзоре рассматриваются современные исследования в области разработки и изучения иммунолипосомальных противоопухолевых препаратов и мишеней для направленной доставки.

Ключевые слова: липосомы, иммунолипосомы, направленная доставка, противоопухолевая лекарственная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-90-96

LIPOSOMES AS TARGET DELIVERY OF ANTITUMOR DRUGS

A.O. Raikov¹, A. Hashem¹, M.A. Baryshnikova²

¹I. M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8/2 Trubetskaya St., Moscow, 119991, Russia;

²N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

Target delivery of antitumor drugs to cancer cells seems to be the very promising way of cancer therapy. The study on the application of immunoliposomes as nanocontainers for anticancer drugs started in the 90-ies. Immunoliposomal drug formulations of antitumor preparations have some advantages over traditional forms of drugs: lipid capsule reduces toxicity of drug due to the selective delivery to tumor and improves its bioavailability. However, despite these benefits, at present immunoliposomal drugs application is limited in the clinic.

This review discusses current research status in field of development immunoliposomes and the possible targets for anticancer immunoliposomes.

Key words: liposomes, immunoliposomes, target delivery, antitumor drug therapy

Введение

Одной из ключевых проблем лечения злокачественных новообразований является обеспечение доставки противоопухолевых лекарств непосредственно в опухолевую ткань больного для повышения терапевтической активности лекарственных препаратов и минимизации неспецифических побочных эффектов. Таргетная доставка лекарственных веществ — один из способов решения этой проблемы. С начала XX в. мировая наука размышляет о создании лекарственных средств, которые оказывали бы направленное действие на определенные мишени в организме человека. Идея «волшебной пули», предложенная Paul Ehrlich в начале XX в., заключалась в том, что одна

часть лекарства должна опознавать мишень в организме и связываться с ней, в то время как другая часть должна проявлять терапевтическую активность относительно этой мишени. С открытием антител направленная доставка и действие препарата в организме человека стали возможными.

Одновременно с развитием идеи направленной доставки лекарственных веществ происходила эволюция научного знания в сфере молекулярной структуры биологических мембран. В 1917 г. I. Langmuir описывал биологические мембраны как слой, толщиной в 1 молекулу [1]. Спустя 8 лет, в 1925 г., E. Gorter и F. Grendel в своих исследованиях сделали вывод о том, что мембраны представлены липидным би-

слоем [2], а позже J.F. Danielli и H. Davson предложили модель, в которой липидный бислой зажат между двумя слоями развернутых белков, так называемую бутербродную модель [3]. Существующая в настоящее время жидкостно-мозаичная модель была предложена S.J. Singer и G.L. Nicolson в 1972 г. [4]. Открытие липосом, сделанное A.D. Bangham в середине 60-х гг., и их сходство с клеточными мембранами предоставило клеточным биологам уникальный инструмент для исследования функций клеточных мембран [5]. Однако в то время липосомы как структура считались главным образом удобной биологической моделью, их потенциал в качестве лекарственной формы был впервые показан G. Gregoriadis и соавт. в работах по включению ферментов в липосомальные структуры для лечения болезней обмена [6–8]. В дальнейшем G. Gregoriadis подчеркнул значимость липосом для биологии и медицины [9]. С биомедицинской точки зрения липосомы обладают рядом полезных свойств: биосовместимостью, малой активностью в отношении антигенных, пирогенных, аллергических и токсических реакций, простой биodeградацией, защитой внутреннего содержимого от инактивирующих воздействий физиологических жидкостей и способностью доставки лекарственных веществ внутрь клеток.

Строение липосом

Липосомы представляют собой наноразмерные коллоидные сферы из липидного слоя, окружающего активное лекарственное вещество [10–12]. Липосомальные лекарственные формы, как правило, состоят из фосфолипидов, амфифильных по своей природе благодаря тому, что имеют гидрофильную полярную головку, обладающую сродством к молекулам воды, и неполярные углеводородные цепи, имеющие гидрофобный характер. Свойства фосфолипидных молекул позволяют им самопроизвольно образовывать в воде бислоиные липидные мембраны [10, 13]. Форма и размер образующихся в воде липосом зависят от множества факторов (кислотности среды, присутствия солей и т. д.). Липосомы не всегда принимают глобулярную форму, часто они могут иметь вид длинных и тонких трубок (тубулярные липосомы) или уплощенных дискообразных структур (дискомы) [14]. Тем не менее липосомы практически всегда содержат внутри себя полость, заполненную водой, так называемое гидрофильное ядро. Основным преимуществом липосом является способность включать в себя различные вещества, практически без каких-либо ограничений в отношении их химической природы, размеров молекул и свойств, что дает уникальный инструмент для решения многих медицинских проблем [15]. Спектр веществ, которые могут быть включены в состав липосомальных форм,

весьма широк – от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений до крупных белков и нуклеиновых кислот. Липосомы могут быть заполнены антибиотиками, гормонами, ферментами, иммуномодуляторами, цитостатиками, противовирусными и противогрибковыми препаратами, витаминами, вакцинами, веществами метаболического действия и даже генетическим материалом [16–20].

Эволюционным продолжением концепции доставки лекарственных веществ с помощью липосом стала идея модификации липосомальной мембраны: присоединения к поверхности липосом определенных лигандов с целью повышения специфичности действия и направленной доставки к тканям-мишеням. Данный подход широко распространен в настоящее время [21–23].

После введения *in vivo* обычные липосомы (ОЛ) адсорбируют на своей поверхности молекулы опсопинов в ходе процесса, называемого опсонизацией, в результате чего происходят распознавание и захват липосом клетками ретикуло-эндотелиальной системы и быстрое удаление их из кровеносного русла [24, 25]. Модификация поверхности липосом гидрофильными полимерами, например полиэтиленгликолем (ПЭГ), снижает взаимодействие с опсонинами сыворотки крови и увеличивает время циркуляции липосом в кровеносном русле [26]. Разработка таких, покрытых ПЭГ липосом, также известных как стерически стабилизированные липосомы (ССЛ), показала, что они имеют серьезный потенциал для дальнейшего использования и клинического применения [12]. ПЭГ оказался наиболее удобным полимером для защиты липосомальных частиц благодаря своим качествам: простоте изготовления, относительно низкой цене, возможности контроля молекулярной массы и способности связывания с липидами или белками, включая антитела [27].

Капиллярные аномалии и наличие прерывистого эндотелия в опухолевой ткани способствуют накоплению липосом во внутритканевом пространстве солидных опухолей. Данное явление описано в зарубежной литературе как EPR-эффект – «эффект повышенной проницаемости сосудов» [28]. Было показано, что включение противоопухолевых препаратов в ССЛ увеличивает их накопление в опухолевой ткани, где липосомальные структуры имеют возможность непрерывно высвобождать лекарственное вещество [12].

Модификация липосом для направленной доставки

Одной из стратегий повышения терапевтической эффективности противоопухолевых препаратов является «активный» или так называемый лиганд-опосредованный транспорт липосомальных препаратов [29–31]. Для обеспечения направленного транспорта липосом к клеткам-мишеням было предложено мо-

дифицировать поверхность липосом лигандами, специфически связывающимися с антигенами на поверхности клетки. Такая структура получила название иммунолипосомы.

Процесс направленной доставки препарата с помощью иммунолипосом можно разделить на 2 фазы: транспортную, во время которой липосомы от места введения перемещаются к клеткам-мишеням, и эффекторную, во время которой происходят специфическое связывание иммунолипосом с клетками-мишенями и последующая внутриклеточная доставка препарата, загруженного в липосомы [32].

Существует множество различных методов, позволяющих использовать антитела, их фрагменты, гликопротеины, углеводы и факторы роста для таргетной доставки липосом к опухолевым клеткам [33]. Широкие возможности для развития направленной доставки лекарств открыла гибридная технология, предложенная G. Kohler и C. Milstein в 1975 г. [34]. В настоящее время разработано и производится множество антител к различным мишеням, представленным на поверхности опухолевых клеток [31, 35].

Разработанные ранее иммунолипосомальные конструкции можно разделить на 3 типа:

- А: моноклональные антитела (МКА) ковалентно связаны с поверхностью ОЛ;
- В: МКА ковалентно связаны с поверхностью ССЛ;
- С: МКА связаны с цепями ПЭГ на поверхности ССЛ [29].

Самым эффективным и распространенным в настоящее время стал 3-й тип (С), ввиду того что он сочетает в себе сохранение эффективности закрепленных МКА и максимальную защиту от захвата ретикуло-эндотелиальной системой [35–38].

Существует множество методов присоединения МКА к дистальному концу ПЭГ-липидных конъюгатов [39]. Наибольшее распространение получили методы, основанные на ковалентном связывании антител с использованием 3 химических реакций: реакции между активированными карбоксильными группами, приводящей к образованию амидной связи; реакции между пиридилдитиолами и тиолами, результатом которой является образование дисульфидных связей; реакции между малеимидными производными и тиолами, с образованием тиоэфирных связей [40]. Широкое распространение получил постинсерционный метод, суть которого состоит в конъюгации векторных лигандов к пегилированным мицеллам, которые затем встраивают в предварительно полученные липосомы путем простой инкубации [41]. Плюсом данного подхода является возможность изменять условия изготовления липосом независимо от условий присоединения лигандов. Однако большинство методов, указанных выше, требуют пред-

варительной модификации антител и предполагают использование токсичных промежуточных продуктов. В связи с этим для упрощения процедуры присоединения лигандов, содержащих аминогруппы, и минимизации использования токсичных соединений было предложено использование амфифильного производного *p*-нитрофенилкарбонил-ПЭГ-ФЭА (pNP-PEG-PE) [42]. Особенностью применения данного соединения является то, что реакция между pNP-группой и лигандом протекает легко и количественно в растворе с pH 8,0, при этом свободные pNP-группы элиминируются посредством гидролиза.

Имунолипосомальные лекарственные формы сохраняют положительные качества липосомальных лекарственных форм: снижение токсичности препаратов, повышение биодоступности, биосовместимость, легкую биodeградацию и транспорт препарата в клетки. В то же время модификация липосомальных конструкций посредством антител теоретически позволяет повысить их эффективность и селективность по отношению к клеткам злокачественных новообразований.

Мишени для направленной доставки иммунолипосомальных препаратов

Лечение онкологических заболеваний с помощью традиционных лекарственных форм химиопрепаратов не всегда успешно, так как в результате не удается устранить агрессивные клоны опухолевых клеток, которые отвечают за формирование лекарственной устойчивости, рецидив опухоли и прогрессирование заболевания. Включение химиотерапевтических агентов в иммунолипосомы позволяет с помощью МКА нацеливать химиопрепараты именно на химиорезистентные опухолевые клетки. E. Fernandes и соавт. провели обзор доклинических и клинических испытаний иммунолипосомальных препаратов для лечения онкологических заболеваний органов желудочно-кишечного тракта. Анализ 47 исследований показал, что использование направляющих лигандов повышает эффективность нанопрепаратов при одновременном снижении побочных эффектов [43].

В настоящее время в качестве мишеней для направленной доставки липосомальных препаратов в опухоль рассматриваются рецепторы трансферрина, VEGF, VEGFR, EGFR, HER2 и др.

M. L. Kreiger и соавт. показали, что цисплатин, заключенный в иммунолипосомы, направленные к рецептору трансферрина, преодолевает лекарственную резистентность, индуцированную свободным цисплатином [44]. Это связано с тем, что механизм действия иммунолипосомального цисплатина отличается от свободного препарата [45]. Провели транскриптомный анализ устойчивых к цисплатину клеток после воздействия свободным и иммунолипосомальным цисплатином, в результате чего было обнаружено,

что иммунолипосомальный цисплатин индуцировал повреждение ДНК и экспрессию генов сигнальных путей внешнего апоптоза (*TNFRSF10B-DR5*, *CD70-TNFSF7*, *CD95/Fas*), тогда как свободный цисплатин индуцировал экспрессию генов митохондриального пути апоптоза (*BAX*, *BID*, *CASP9*). В последующих экспериментах с применением ингибиторов каспаз-8 и -9 показано, что иммунолипосомальный цисплатин действительно индуцировал каспаза-8-зависимый сигнальный путь внешнего апоптоза [46].

М. Gregori и соавт. в своей работе показали, что антитела к рецептору трансферрина улучшают способность наночастиц преодолевать гематоэнцефалический барьер и переносить лекарства из крови в мозг [47].

Группа исследователей [48] разработала новые иммунолипосомы, конъюгированные с антителами к VEGF, загруженные паклитакселом — химиотерапевтическим агентом с антиангиогенной активностью. Пегилированные липосомы были приготовлены с использованием метода тонкопленочной гидратации из соответствующих количеств соевого фосфатидилхолина, холестерина, mPEG2000-DSPE в молярном соотношении 90:10:5. Затем полученные липосомы конъюгировали с моноклональными антителами к VEGF в соотношении 6,65 мг анти-VEGF / 1 мкмоль Mal-PEG2000-DSPE, получив полностью стабильные анти-VEGF-иммунолипосомы. Противоопухолевую активность полученного препарата оценивали на мышинной модели BALB/c nude с ксенографтами SGC-7901. Анти-VEGF-иммунолипосомы визуализировали внутри опухоли, и также был показан их захват опухолевыми клетками. Противоопухолевый эффект анти-VEGF-иммунолипосомального паклитаксела был выше, чем у коммерческого препарата Таксол и немодифицированных антителами липосом. Иммуногистохимический анализ опухолевой ткани показал более слабые сигналы VEGF и CD31 после лечения анти-VEGF-иммунолипосомальным паклитакселом в сравнении с обычным липосомальным паклитакселом. Также были отмечены более низкая концентрация Ki67-меченых клеток и большее количество TUNEL-положительных клеток. Таким образом, анти-VEGF-иммунолипосомы эффективно доставляют лекарство в опухоль и ингибируют ее рост [48].

Цетуксимаб — МКА к рецептору эпидермального фактора роста EGFR, можно использовать для направленной доставки липосомальных препаратов к EGFR, который экспрессируется во многих видах солидных опухолей. Y.D. Limasale и соавт. разработали анти-EGFR-иммунолипосомы, нагруженные целекоксибом, селективным ингибитором COX-2 сигнального пути. Циклооксигеназа-2 высоко экспрессируется многими опухолями, и ее ингибирование является одной из стратегий терапии рака. Было показано, что липосомальные системы доставки увеличивают тера-

певтическую эффективность целекоксиба и снижают его побочные эффекты. Анти-EGFR-иммунолипосомы имели размер 120 нм, включение целекоксиба 40 %. Исследования на клеточных линиях показали, что иммунолипосомы, в отличие от обычных липосом, захватывались EGFR-положительными клетками и были гораздо более токсичными для этих клеток, однако не действовали на EGFR-отрицательные клетки. Селективная доставка целекоксиба анти-EGFR-иммунолипосомами — многообещающая стратегия лечения EGFR-положительных опухолей [49]. Однако для анти-EGFR-иммунолипосом с доксорубицином получен противоположный эффект. На клеточных линиях карциномы яичников SKOV-3 и SKOV3. ip1. показано, что иммунолипосомы связывались с клетками *in vitro*, однако различия в цитотоксичности между таргетными и нетаргетными липосомами не наблюдалось [50]. Авторы предположили, что это связано с плохим высвобождением доксорубицина из липосом. Обеспечение высвобождения препарата из наноносителей после доставки к клеткам-мишеням является важным фактором для успешной терапии.

Для подтверждения возможности использования анти-EGFR-иммунолипосом в терапии глиобластомы человека синтезировали анти-EGFR-иммунолипосомы с квантовыми точками для конвенционной доставки в опухоли мозга [51]. Захват *in vitro* измеряли с помощью проточной цитометрии, а внутриклеточную локализацию визуализировали с применением конфокальной микроскопии. В исследовании *in vivo* оценили конвенционную доставку иммунолипосом с квантовыми точками в интракраниальные ксенографты и неинвазивно мониторировали флуоресценцию в реальном времени. Показаны специфический и эффективный захват иммунолипосом *in vitro* и гораздо более высокая общая флуоресценция по сравнению с нетаргетными липосомами в интракраниальных ксенографтах опухоли мозга *in vivo*. Иммунолипосомы с квантовыми точками оказались эффективным визуализирующим агентом *in vitro* и *in vivo*; подтверждено, что анти-EGFR-иммунолипосомы можно использовать для лечения глиобластомы, так как они эффективно и специфически захватываются злокачественными клетками.

Иммунолипосомы, направленные к EGFR, являются хорошей моделью для доставки фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии опухолей. M. Broekgaarden и соавт. показали, что конъюгация однодоменных антител к EGRF с липосомами увеличивает накопление фотосенсибилизатора в опухолевой ткани, и подтвердили эффективность фотодинамической терапии [52].

D.H. Shin и соавт. изучили эффективность термочувствительных иммунолипосом с трастузумабом в качестве направляющего агента, нагруженных

гемцитабином, для лечения HER2-положительных опухолей молочной железы. В экспериментах *in vitro* показано преимущество иммунолипосомального препарата по сравнению со свободным гемцитабином и с традиционными липосомами, нагруженными данным препаратом [53].

Стволовые клетки опухоли (СКО) могут быть еще одной мишенью для действия иммунолипосомальных препаратов. В последнее время концепция СКО получает все большее признание. Известно, что опухоль гетерогенна по своей структуре и среди всех опухолевых клеток имеется небольшая популяция, формирующая более дифференцированные опухолевые клетки и способная к собственному воспроизведению. Эти клетки идентифицируют как стволовые [54, 55]. СКО рассматриваются как возможная причина устойчивости злокачественных новообразований к терапии, а также рецидивирования и метастазирования опухолей [56]. Несмотря на то что терапия, направленная на СКО, только начинает развиваться, уже опубликован ряд работ с обнадеживающими результатами [57].

H. Song и соавт. разработали иммунолипосомы, содержащие винкристин, для направленной доставки к CD20-положительным клеткам меланомы [58]. CD20 – фенотип СКО меланомы, ответственных за резистентность к терапии. Винкристин обычно используется для лечения меланомы, однако было обнаружено, что он неэффективен в отношении СКО. Анти-CD20-иммунолипосомы с винкристином имели размер частиц 163 нм, эффективность включения препарата (91,8 %) и хорошие показатели высвобождения препарата. Иммунолипосомы могли успешно связываться с 55 % CD20-положительных клеток яичника китайского хомяка, даже если CD20-положительные клетки встречались в количестве 0,1 % от популяции. После обработки сфероидов меланомы WM266-4 в течение 96 ч иммунолипосомами, липосомами и свободным винкристином было показано, что иммунолипосомы с винкристином в 1,85 раза более эффективны, чем липосомальный винкристин и свободный винкристин. Анти-CD20-иммунолипосомы с винкристином селективно убивали CD20-положительные клетки в популяции WM266-4 меланомы как *in vitro*, так и *in vivo* [58].

Одной из стратегий лечения мультиформной глиобластомы является комбинированная терапия против СКО глиобластомы и ангиогенеза, в результате чего достигаются ингибирование пролиферации клеток опухоли и снижение доставки к опухолевым клеткам питательных веществ. D.H. Shin и соавт. исследовали эффективность комбинированной терапии с использованием анти-CD133 иммунолипосом, нагруженных гемцитабином, и бевацизумаба. Было показано, что анти-CD133 иммунолипосомы

способствуют усилению цитотоксичности гемцитабина *in vitro*, а комбинированное лечение иммунолипосомальным гемцитабином и бевацизумабом значительно ингибирует миграцию и пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro*. Противоопухолевая эффективность комбинации иммунолипосомального гемцитабина и бевацизумаба на мышинной модели с ксенографтом глиобластомы человека была достоверно выше, чем при монотерапии, что, предположительно, связано с усилением прямого воздействия на СКО и на ангиогенез, индуцированный СКО. Кроме того, данная комбинированная терапия увеличила общую выживаемость мышей с ксенографтами глиобластомы человека. Таким образом, комбинированная терапия анти-CD133-иммунолипосомальным гемцитабином и бевацизумабом может быть эффективной в лечении мультиформной глиобластомы [59].

Иммунолипосомы применяются также в диагностических целях. F.L. Tansi и соавт. создали иммунолипосомы, направленные к белку активации фибробластов, содержащие флуоресцентную метку для визуализации метастазов. Метастазирование остается самой частой причиной гибели онкологических больных, оно связано с поздней диагностикой заболевания, плохим ответом на терапию или не замеченными во время хирургической операции микрометастазами. Одним из подходов к преодолению проблемы метастазирования может быть флуоресцентная визуализация метастатических клеток с помощью флуоресцентных зондов во время операции. F.L. Tansi и соавт. показали, что иммунолипосомы, направленные к белку активации фибробластов, эффективно выявляли метастазы на мышинных моделях [60].

Заключение

Предклинические и клинические исследования иммунолипосомальных препаратов проводятся на протяжении последних 20 лет, однако до сих пор ни одна иммунолипосомальная лекарственная форма не была одобрена для клинического применения. Несмотря на это, интерес к использованию иммунолипосом в лечении онкологических заболеваний не угасает, так как они позволяют повысить биодоступность препаратов, снизить их токсичность и, что очень важно, селективно доставляют препараты к опухолевым клеткам-мишеням. Сегодня интерес к иммунолипосомальным системам доставки противоопухолевых препаратов возрос, что связано с более глубоким пониманием молекулярной природы химиорезистентных видов опухолей и биологии стволовых опухолевых клеток. В недавних исследованиях, проведенных на животных, показана эффективность и безопасность новых иммунолипосомальных препаратов, однако эти данные нуждаются в подтверждении клиническими испытаниями.

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

1. Langmuir I. The constitution and structural properties of solids and liquids. II. Liquids. *J Am Chem Soc* 1917;39:1848–906.
2. Gorter E., Grendel F. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood. *J Exp Med* 1925;41:439–43.
3. Danielli J.F., Davson H. A contribution to the theory of permeability of thin films. *J Cell Comp Physiol* 1925;5:495–508.
4. Singer S.J., Nicolson G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 1972;175(4023):720–31. PMID: 4333397.
5. Bangham A.D., Standish M.M., Watkins J.C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol* 1965;13(1):238–52. PMID: 5859039.
6. Gregoriadis G. The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts). *N Engl J Med* 1976;295(14):765–70. PMID: 785256.
7. Gregoriadis G., Leathwood P.D., Ryman B.E. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 1971;14(2):95–9. PMID: 11945728.
8. Gregoriadis G., Ryman B.E. Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem J* 1971;124(5):58. PMID: 5130994.
9. Gregoriadis G. Liposome research in drug delivery: the early days. *J Drug Target.* 2008;16(7):520–4. doi: 10.1080/10611860802228350. PMID: 18686120.
10. Оборотова Н.А., Толчева Е.В. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул. *Российский биотерапевтический журнал* 2006;5(1):54–61.
11. Lichtenberg D., Barenholz Y. Liposomes: preparation, characterisation and preservation. *Methods Biochem Anal* 1988;33:337–462. PMID: 3282152.
12. Torchilin V.P. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006;58(14):1532–55. PMID: 17092599.
13. Барышникова М.А., Зангиева М.Т., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(1):11–5.
14. Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И. Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм лекарственных препаратов. *Химико-фармацевтический журнал* 1999;33(10):20–3.
15. Himanshu A., Sitasharan P., Singhai A.K. Liposomes as drug carriers. *IJPLS* 2011;2(7):945–51.
16. Ланцова А.В., Оборотова Н.А., Перетолчина Н.М. и др. Разработка и изучение стерически стабилизированной липосомальной формы лизомустина. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(4):19–23.
17. Смирнова З.С., Санарова Е.В., Борисова Л.М. и др. Противоопухолевая активность фотодинамической терапии с липосомальной лекарственной формой тиосенса на перевиваемых опухолях мышей. *Российский биотерапевтический журнал* 2011;10(2):56–60.
18. Carvalho B. Single-Dose, Extended-Release Epidural Morphine (DepoDur™) Compared to Conventional Epidural Morphine for Post-Cesarean Pain. *Anesth Analg.* 2007;105(1):176–83. PMID:17578973.
19. Cullis P.R., Chonn A. Recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;30(1–3):73–83. PMID:10837603.
20. Meissner J.M., Toporkiewicz M., Matuszewicz L., Machnicka B. Liposomes as non-viral carriers for genetic drugs. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016;70:200–9. doi: 10.5604/17322693.1197371. PMID: 27117095.
21. Барышникова М.А., Барышников А.Ю. Иммунолипосомы и мишени их действия. *Российский химический журнал. Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева* 2012; LVI(3–4): 60–6.
22. Водозова Е.Л., Алексеева А.С., Кузнецова Н.Р. и др. Взаимодействие противоопухолевых липосом, несущих углеводный лиганд селектинов, с эндотелиальными клетками сосудов крови. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):70.
23. Kuznetsova N.R., Stepanova E.V., Peretolchina N.M. et al. Targeting liposomes loaded with melphalan prodrug to tumour vasculature via the Sialyl Lewis X selectin ligand *J Drug Target* 2013 Dec 9. [Epub ahead of print] PMID: 24313904.
24. Patel H.M. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1992;9(1):39–90. PMID: 1544174.
25. Senior J.H. Fate and behaviour of liposomes *in vivo*: a review of controlling factors. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1987;3(2):123–93. PMID: 3542245.
26. Woodle M., Lasic D. Sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1992;1113(2):171–99. PMID: 1510996.
27. Kataria S., Sandhu P., Bilandi A. et al. Stealth liposomes: a review. *IJRAP* 2011;2(5):1534–8.
28. Prabhakar U., Maeda H., Jain R.K. et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. *Cancer Res* 2013;73(8):2412–7. doi: 10.1158/0008–5472. CAN-12–4561. PMID: 23423979.
29. Lammers T., Hennink W.E., Storm G. Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* 2008;99(3):392–7. doi: 10.1038/sj.bjc.6604483. PMID: 18648371.
30. Park Y.S. Tumor – directed targeting of liposomes. *Biosci Rep* 2002;22(2):267–81. PMID: 12428904.
31. Sapra P., Allen T.M. Internalizing antibodies are necessary for improved therapeutic efficacy of antibody-targeted liposomal drugs. *Cancer Res* 2002;62(24):7190–4. PMID: 12499256.
32. Mastrobattista E., Koning G.A., Strom G. Immunoliposomes for the targeted delivery of antitumor drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 1999;40(1–2):103–27. PMID: 10837783.
33. Torchilin V. Antibody-modified liposomes for cancer chemotherapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2008;5(9):1003–25. doi: 10.1517/17425247.5.9.1003. PMID: 18754750.
34. Kohler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256(5517):495–7. PMID: 1172191.
35. Зангиева М.Т., Матюшин А.А., Соколова Д.В. и др. Разработка и исследование иммунолипосомальных конструкций *in vitro*. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(2):19–27.
36. Матюшин А.А., Хугаева О.В., Барышникова М.А. и др. Получение и изучение анти-CD20 иммунолипосом митоксантрона *in vitro*. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(3): 15–24.
37. Матюшин А.А., Хугаева О.В., Барышникова М.А. и др. Получение и изучение анти-CD5 иммунолипосом митоксантрона *in vitro*. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):33–42.
38. Torchilin V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging. *AAAPS J* 2007;9(2):E128–47. PMID: 17614355.
39. Manjappa A.S., Chaudhari K.R., Venkataraju M.P. Antibody derivation and conjugation strategies: Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutic to tumor. *J Control Release* 2011;150(1):2–22. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.002. PMID: 21095210.
40. Толчева Е.В. Создание конструкции иммунолипосомы и изучение иммунопо-

- липосомальной формы противоопухолевого препарата доксорубин: Дис. ... канд. биол. наук. М., 2007.
41. Allen T.M., Sapra P., Moase E. Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes. *Cell Mol Biol Lett* 2002;7(2):217–9. PMID:12097921.
42. Torchilin V.P., Levchenko T.S., Lukyanov A.N. et al. p-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p-nitrophenylcarbonyl groups. *Biochim Biophys Acta* 2001;1511(2):397–411. PMID: 11286983.
43. Fernandes E., Ferreira J.A., Andreia P. et al. New trends in guided nanotherapies for digestive cancers: A systematic review. *J Control Release* 2015;209:288–307. doi: 10.1016/j.jconrel. 2015.05.003. PMID: 25957905.
44. Kreiger M.L., Eckstein N., Schneider V. et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro *Int J Pharm* 2010;389(1–2):10–7. doi: 10.1016/j.ijpharm. 2009.12.061. PMID: 20060458.
45. Koch M., Krieger M.L., Stolting D. et al. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol* 2013;85(8):1077–90. doi: 10.1016/j.bcp. 2013.01.028. PMID: 23396090.
46. Stölting D.P., Koch M., Wiese M. et al. Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2014;52(1):78–81. doi: 10.5414/CPXCES13EA03. PMID: 24290409.
47. Gregori M., Orlando A., Re F. et al. Novel antitransferrin receptor antibodies improve the blood-brain barrier crossing efficacy of immunoliposomes. *J Pharm Sci* 2016;105(1):276–83. doi: 10.1016/j.xphs. 2015.11.009. PMID: 26852859.
48. Shi C., Cao H., He W. et al. Novel drug delivery liposomes targeted with a fully human anti-VEGF165 monoclonal antibody show superior antitumor efficacy *in vivo*. *Biomed Pharmacother* 2015;73:48–57. doi: 10.1016/j.biopha. 2015.05.008. PMID: 26211582.
49. Limasale Y.D., Tezcaner A., Özen C. et al. Epidermal growth factor receptor-targeted immunoliposomes for delivery of celecoxib to cancer cells. *Int J Pharm* 2015;479(2):364–73. doi: 10.1016/j.ijpharm. 2015.01.016. PMID: 25595386.
50. Lehtinen J., Raki M., Bergström K.A. et al. Pre-targeting and direct immunotargeting of liposomal drug carriers to ovarian carcinoma. *PLoS One* 2012;7(7):e41410. doi: 10.1371/journal.pone. 0041410. PMID: 22844475.
51. Weng K.C., Hashizume R., Noble C.O. et al. Convection-enhanced delivery of targeted quantum dot-immunoliposome hybrid nanoparticles to intracranial brain tumor models. *Nanomedicine(Lond)* 2013;8(12):1913–25. doi: 10.2217/nmm. 12.209. PMID: 23631502.
52. Broekgaarden M., van Vught R., Oliveira S. et al. Site-specific conjugation of single domain antibodies to liposomes enhances photosensitizer uptake and photodynamic therapy efficacy. *Nanoscale* 2016;8(12):6490–4. doi: 10.1039/c6nr00014b. PMID:26954515.
53. Shin D.H., Koo M.J., Kim J.S., Kim J.S. Herceptin-conjugated temperature-sensitive immunoliposomes encapsulating gemcitabine for breast cancer. *Arch Pharm Res* 2016;39(3):350–8. doi: 10.1007/s12272-016-0707-y. PMID: 26781980.
54. Барышников К.А., Оборотова М.В., Барышников А.Ю. Экспрессия маркеров стволовой опухолевой клетки при злокачественных новообразованиях. *Вестник ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»* 2015;25:3–8.
55. Eaves C.J. Cancer stem cells: here, there, everywhere? *Nature* 2008;456(7222):581–2. doi: 10.1038/456581a. PMID:19052611.
56. Фармаковская М.Д., Хромова Н.В., Рыбко В.А., Копнин П.Б. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в регуляции свойств раковых стволовых клеток солидных опухолей. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(4):3–8.
57. Вартанян А.А., Оборотова М.В. Основные детерминанты стволовой клетки меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):7–16.
58. Song H., Su X., Yang K. et al. CD20 Antibody-conjugated immunoliposomes for targeted chemotherapy of melanoma cancer initiating cells. *J Biomed Nanotechnol* 2015;11(11):1927–46. PMID: 26554153.
59. Shin D.H., Lee S.J., Kim J.S. et al. Synergistic Effect of immunoliposomal gemcitabine and bevacizumab in glioblastoma stem cell-targeted therapy. *J Biomed Nanotechnol* 2015;11(11):1989–2002. PMID: 26554157.
60. Tansi F.L., Rüter R., Böhm C. et al. Potential of activatable FAP-targeting immunoliposomes in intraoperative imaging of spontaneous metastases. *Biomaterials* 2016;88:70–82. doi: 10.1016/j.biomaterials. 2016.02.028. PMID: 26945457.