



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

1

**Том 16
2017**

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

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, академик РАН, д-р мед. наук, проф.;

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

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

1
ТОМ 16
'17

ОСНОВАН В 2002 Г.

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

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, 7 (499) 612-81-92;
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 Т.Л. Кузьмичева
Корректор В.В. Калининна
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. 2017. Том 16. № 1. 1–88
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» — 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Буки Веди»

Тираж 1000 экз.

<http://www.ronc.ru/node/1877>
<http://rbjournal.ru/>

ОБРАЩЕНИЕ ПРЕЗИДЕНТА КОНФЕРЕНЦИИ «ИММУНОЛОГИЯ ГЕМОПОЭЗА»



Уважаемые коллеги!

В этом году Онкоцентр проводит Международную конференцию «Иммунология гемопозза» (Суздаль, 4–6 июня). Сложная и спорная область онкологии, с которой во многом связаны надежды на победу над раком. За 14 лет существования конференция зарекомендовала себя как лидирующая в области иммунологии опухолей. Бесспорным председателем конференции является увлеченный человек, заслуженный деятель науки, профессор Н.Н. Тупицын.

Приглашаю вас к сотрудничеству и плодотворным дискуссиям, которые будут опубликованы в журнале «Иммунология гемопозза» на русском и английском языках. Информация на сайте РОНЦ: www.ronc.ru.

Желаю больших успехов конференции!

Президент конференции
директор Федерального государственного бюджетного учреждения
«Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
главный онколог России,
академик РАН

М.И. Давыдов

15 февраля 2017 г.

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses)

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

Z.S. Shprakh, PhD

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

A.V. Karaulov, PhD, DSc, Professor, Academician 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, PhD, 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); I.R. Nabiev, PhD, Professor (Reims, France); 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); Yu.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

1 VOL. 16
'17

Publishing group of "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center"
24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478
E.G. Turnyanskaya, B.B. Kryukov

FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center" of the Ministry of Health of Russia, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors. Tel.: +7 (499) 324-10-65, +7 (499) 612-81-92. Fax: +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 T.L. Kuz'micheva
Proofreader V.V. Kalinina
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk*

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

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

ISSN 1726-9784
Rossiysky Bioterapevtichesky
Zhurnal. 2017. Volume 16.
No 1. 1–88

© PH "ABV-Press", 2017
Rospechat' catalogue index: 81679
Printed at Bukivedi LLC
1,000 copies

<http://www.ronc.ru/node/1877>
<http://rbjournal.ru/>

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

- Е. В. Блынская, С. В. Тишков, К. В. Алексеев*
Технологические подходы к совершенствованию процесса лиофилизации белковых и пептидных лекарственных препаратов 6
- А. А. Кескинов, М. Р. Шурин, В. М. Бухман, З. С. Шпрах*
Влияние секретлируемых опухолью веществ на дендритные клетки при раке 12

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Н. А. Фалалева*
Сравнение эффективности иммунохимиотерапии и химиотерапии при фолликулярной лимфоме 24
- Д. А. Рябчиков, И. К. Воротников, Н. А. Козлов, Н. В. Чхиквадзе, К. С. Титов, А. С. Шушарин*
Прогностическая ценность экспрессии андрогеновых рецепторов в различных молекулярных типах рака молочной железы. 32
- С. А. Полозкова, В. А. Горбунова, В. В. Делекторская, Н. Ф. Орел, Н. Н. Козлов, А. Е. Кузьминов, А. А. Маркович, А. С. Одинцова, Г. С. Емельянова*
Факторы прогноза эффективности терапии нейроэндокринных новообразований режимами на основе Аранозы. 38
- Л. П. Николаева, Д. В. Черданцев, К. С. Титов*
Характеристика стволовых клеток костного мозга пациентов с осложненным сахарным диабетом 47
- Н. В. Андропова, С. М. Ситдикова, Л. Ф. Морозова, Н. Т. Райхлин, И. А. Букаева, И. Ж. Шубина, М. В. Киселевский, Е. М. Трещалина*
Моделирование ортотопического роста рака почки человека с перевиваемым штаммом РПоч1 на иммунодефицитных мышях 51
- А. В. Савинкова, Л. Р. Тилова, О. И. Борисова, Е. М. Жидкова, К. А. Кузин, К. И. Кирсанов, Г. А. Белицкий, И. В. Будунова, М. Г. Якубовская, Е. А. Лесовая*
Противоопухолевый эффект энантиомеров *CpdA in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза 61
- Н. П. Фадеев, Р. И. Харисов, Е. Г. Кованько, Ю. И. Пустовалов, В. Л. Фадеева*
Изучение противоопухолевой активности фенилбутирата в комбинации с 5-фторурацилом на модели карциномы Эрлиха 70
- Е. В. Бочаров, Р. В. Карпова, О. А. Бочарова, В. Г. Кучеряну, З. С. Шпрах*
Воздействие мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе, улучшающее выживаемость и соматическое состояние мышей высококорактовой линии 76
- С. П. Крыжановский, Т. А. Кузнецова, Б. И. Гельцер, Т. С. Запорожец, С. П. Ермакова, Н. Н. Беседнова*
Фукоидан из бурой водоросли *Fucus evanescens*: новые перспективы в лечении атеросклероза 82

REVIEWS

- E.V. Blynskaya, S.V. Tishkov, K.V. Alekseev*
**Technological approaches to improving the process lyophilization
of protein and peptide drugs** 6
- A.A. Keskinov, M.R. Shurin, V.M. Bukhman, Z.S. Shprakh*
Impact of tumor-derived factors on dendritic cells in cancer 12

ORIGINAL REPORTS

- N.A. Falaleeva*
Comparison immunochemotherapy and chemotherapy efficacy in follicular lymphoma 24
- D.A. Ryabchikov, I.K. Vorotnikov, N.A. Kozlov, N.V. Chkhikvadze, K.S. Titov, A.S. Shusharin*
**Prognostic value of expression of androgenetic receptors
in different molecular types of breast cancer** 32
- S.A. Polozkova, V.A. Gorbunova, V.V. Delektorskaya, N.F. Orel, N.A. Kozlov,
A.E. Kuzminov, A.A. Markovich, A.S. Odintsova, G.S. Emelyanova*
**Prognostic factors of the efficacy of Aranoza-based therapy
in neuroendocrine neoplasms** 38
- L.P. Nikolaeva, D.V. Cherdantsev, K.S. Titov*
The characteristic of bone marrow stem cells of patients with the complicated diabetes 47
- N.V. Andronova, S.M. Sitdikova, L.F. Morozova, N.T. Raichlin,
I.A. Bukaeva, I.Zh. Shubina, M.V. Kiselevsky, H.M. Treshalina*
**Modeling of orthotopical growth of human kidney cancer
with subcutaneous xenografts RPoch1 on immunodeficient mice** 51
- A.V. Savinkova, L.R. Tilova, O.I. Borisova, E.M. Zhidkova, K.A. Kuzin,
K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky, I.V. Budunova, M.G. Yakubovskaya, E.A. Lesovaya*
**Anti-tumor effect of CpdA enantiomers *in vitro* in the model
of acute lymphoblastic leukemia** 61
- N.P. Fadeev, R.I. Kharisov, E.G. Kovan'ko, Yu.I. Pustovalov, V.L. Fadeeva*
**The study of antitumor activity of phenylbutyrate in combination
with 5-fluorouracil on model of ehrlich carcinoma** 70
- E.V. Bocharov, R.V. Karpova, O.A. Bocharova, V.G. Kucheryanu, Z.S. Shprakh*
**Multiphytoadaptogene administration in early postnatal ontogenesis
improve life-span and physical status of high-cancer mice** 76
- S.P. Krizshanovsky, T.A. Kuznetsova, B.I. Geltser,
T.S. Zaporozhets, S.P. Ermakova, N.N. Besednova*
**Fucoidan from brown algae *Fucus evanescens*: new perspectives in the treatment
of atherosclerosis** 82

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ПРОЦЕССА ЛИОФИЛИЗАЦИИ БЕЛКОВЫХ И ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Е. В. Блынская¹, С. В. Тишков¹, К. В. Алексеев²

¹ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова»; Россия, 125315 Москва, ул. Балтийская, 8;

²ЧОУ ВПО «Медицинский университет «РЕАВИЗ»; Россия, 107564 Москва, ул. Краснобогатырская, 2, стр. 2

Контакты: Евгения Викторовна Блынская eaureus@mail.ru

Лиофилизация противоопухолевых белковых и пептидных препаратов является перспективным методом создания стабильных и эффективных парентеральных лекарственных форм. В данном обзоре рассмотрены основные проблемы, возникающие во время лиофилизации белковых и пептидных препаратов, и описаны рекомендации для решения этих проблем. Приведены способы оптимизации и совершенствования лиофильной сушки. Предложены температурные режимы для улучшения свойств и предотвращения разрушения структуры лиофилизата.

Ключевые слова: лиофилизация, белковые и пептидные препараты, сублимационная сушка, противоопухолевые препараты

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-6-11

TECHNOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVING THE PROCESS LYOPHILIZATION OF PROTEIN AND PEPTIDE DRUGS

E. V. Blynskaya¹, S. V. Tishkov¹, K. V. Alekseev²

¹V. V. Zakusov Research Institute of Pharmacology; 8 Baltijskaya St., Moscow 125315, Russia;

²Medical University "REAVIZ"; p. 2, 2 Krasnobogatyrskaya St., Moscow 107564, Russia

Lyophilization of protein and peptide anticancer drugs is a promising method to create a stable and effective parenteral dosage forms. This article reviews the main problems encountered during lyophilization of protein and peptide drugs, and describes the best practices for solving these problems. The ways of optimization and improvement of the freeze-drying are given. Temperatures to improve the properties and prevent the destruction of the cake lyophilization are suggested.

Key words: lyophilization, protein and peptide preparations, freeze-drying, anti-tumor drugs

Введение

Систематизация основных путей совершенствования технологии лиофилизации для лекарственных средств (ЛС) белковой и пептидной структуры особенно актуальна для противоопухолевых препаратов, так как обеспечивает не только сохранение структурной стабильности ЛС данной терапевтической группы, но и высокие показатели биодоступности.

Пептидные препараты широко применяются в комплексном лечении онкологических заболеваний для усиления действия цитостатических препаратов в качестве антипролиферативных и восстанавливающих естественный противоопухолевый иммунитет. Такие вещества пептидной природы, как цитокины, например интерлейкины (ИЛ-1 β , ИЛ-2), применяются в виде лиофилизата под торговыми наименованиями «Беталейкин»[®] и «Ронколейкин»[®] соответ-

ственно [1]. Рекомбинантный интерферон гамма человека (Ингарон[®]), разработанный НПП «Фармаклон» [2] и применяемый в виде инъекционных лекарственных форм (ЛФ), также обладает противоопухолевой активностью и пептидной структурой. Для создания белковых и пептидных препаратов, как перечисленных, так и еще только проходящих исследования, наиболее рациональной ЛФ является лиофилизат, позволяющий стабилизировать структуру лекарственного препарата (ЛП) и увеличить сроки хранения, предохраняя от воздействия повреждающих факторов [3, 4].

Таким образом, разработка противоопухолевых лиофилизированных пептидных и белковых препаратов имеет много нюансов. Очевидна потребность в систематизации знаний и понимании составляющих данного процесса: заморозки и сублимационной

сушки, механизмов тепло- и массообменных процессов, происходящих на различных стадиях лиофилизации. Совокупность перечисленных факторов определяет основные пути совершенствования процесса лиофилизации ЛП данного класса:

- оптимизация технологических аспектов лиофилизационной сушки и непосредственно подбора вспомогательных веществ исходя из физико-химических параметров процесса;
- выбор рациональных подходов к решению наиболее часто встречающихся технологических проблем лиофилизации белковых и пептидных ЛП.

Особенности влияния вспомогательных веществ на процесс лиофилизации белков и пептидов

При оптимизации рецептур белковых и пептидных препаратов, применяемых в онкологии, приоритетным направлением является поддержание биологической активности и стабильности во время производства, хранения и транспортировки. Это обеспечивает баланс компонентов рецептуры (рН, буферный агент, стабилизатор(ы), и/или модификаторы изотоничности), а также применяемых технологических методик.

В большинстве случаев рецептура (состав) лиофилизированного пептидного и белкового ЛП может содержать наполнитель, буфер, модификатор изотоничности, криопротекторы и лиопротекторы. В отличие от существующей классификации по химическому строению (Государственная фармакопея XIII), представляется рациональным распределить вспомогательные вещества по их функциональному предназначению (рис. 1). Вспомогательные вещества существенно влияют на процесс лиофилизации.

Основные направления оптимизации процесса лиофилизации белков и пептидов

Заслуживают внимания технологические параметры лиофильной сушки и совершенствование про-

цесса за счет их правильного подбора [5–7]. В процессе лиофилизации выделены основные стадии:

- замораживание: непосредственно само замораживание продукта и создание прочной матрицы, подходящей для сушки;
- первичная сушка: лед удаляют путем сублимации при одновременном снижении давления окружающей среды продукта и повышением температуры; иногда перед сушкой проводится дополнительный этап – отжиг, или термоциклирование;
- вторичная сушка: связанная вода удаляется, пока не будет достигнут целевой уровень остаточного содержания влаги, обеспечивающий целостность полученного лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (таблетки лиофилизата (ТЛ)) [8–10].

Оптимизация процесса лиофилизации требует решения наиболее частых технологических проблем, рационализации подходов к совершенствованию каждого этапа (замораживания, первичной и вторичной сушки) цикла лиофилизации.

Оптимизация этапа замораживания

На этапе замораживания ключевыми параметрами являются минимальная температура замерзания и скорость замораживания. Метод замораживания существенно влияет на размер и форму кристаллов льда и, следовательно, морфологию окончательной структуры лиофилизата белкового и пептидного препарата и эффективность сублимации. Температура, обуславливающая ядрообразование, влияет на рост кристаллов и формирование матрицы в целом. Температура зарождения ядра определяется температурной обработкой образцов, которая начинается после того, как они помещаются на полку лиофилизатора. Для замораживания образцы либо медленно охлаждаются при температуре окружающей среды в сочетании с постепенным снижением температуры полки, либо быстро охлаждаются на предварительно охлажденной

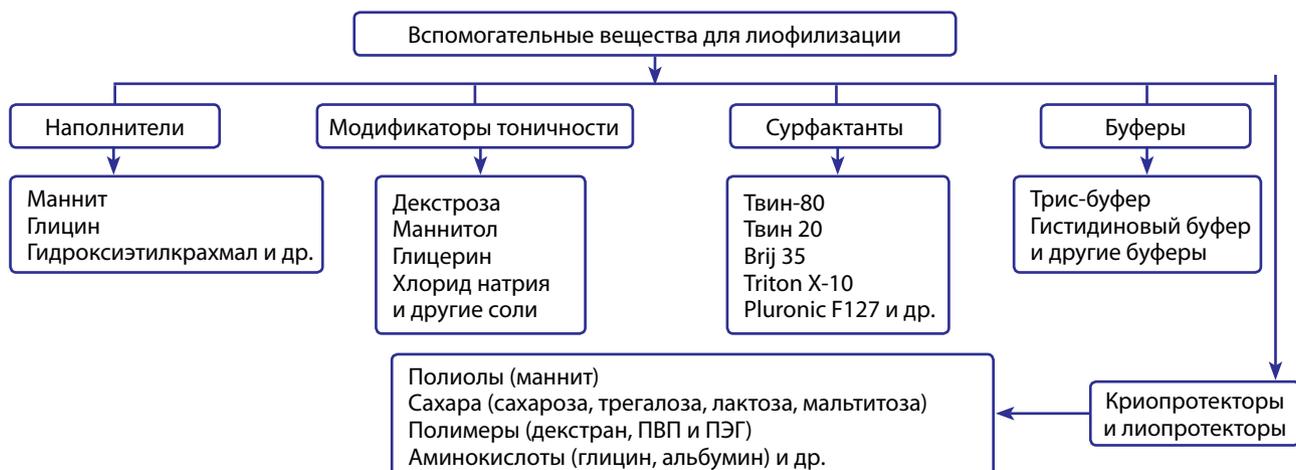


Рис. 1. Классификация вспомогательных веществ, применяемых в процессе лиофилизации, по функциональному классу

полке. Состояние переохлаждения характерно для каждого метода заморозки, однако быстрое снижение температуры приводит к формированию кристаллов льда с высокой степенью однородности. Различия в морфологии кристаллов льда, полученных быстрым и медленным охлаждением, показывает растровая электронная микроскопия (рис. 2). Образец, замороженный медленным охлаждением, имеет относительно однородные кристаллы льда; образец, подвергнутый быстрой заморозке с помощью жидкого азота, содержит неоднородные по форме кристаллы с большими по площади поверхностями.

Таким образом, температура замерзания должна быть достаточно низкой, чтобы инициировать зарождение ядра кристаллизации наполнителя, а скорость замерзания — достаточно большой, чтобы форма и размеры кристаллов были оптимальны для последующей сушки. Для определения соответствующих значений лиофильные сушки проводят в малом масштабе и как опытно-промышленные.

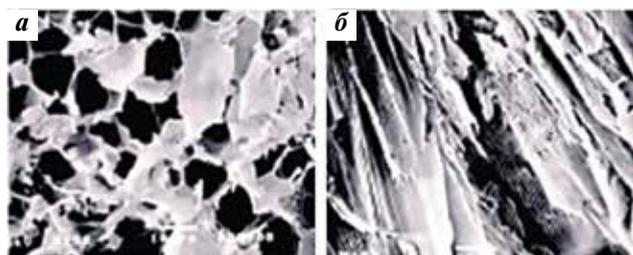


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия образцов декстрана, лиофилизированных при медленной (а) и быстрой (б) заморозке

Отжиг и его преимущества

После завершения заморозки продукт может быть термически обработан, чтобы произошла кристаллизация метастабильных наполнителей (отжиг), например маннита и глицина, которые находятся в частично аморфном состоянии, и/или для увеличения размера кристаллов льда. Этот дополнительный шаг может значительно увеличить начальную скорость просушивания и улучшить однородность и внешний вид конечного продукта. Завершение кристаллизации вспомогательных веществ при заморозке может дополнительно увеличить срок хранения за счет меньшего высвобождения влаги в результате перекристаллизации остаточной аморфной или гидратированной формы.

Ключевым параметром данного процесса является температура отжига. Ее выбирают с учетом температуры эвтектики, которая определяется дифференциальной сканирующей калориметрией. Выбранная температура должна быть выше температуры эвтектики примерно на 10 °С. Высокая температура отжига обеспечивает увеличение степени кристалличности и более быстрое достижение кристаллич-

ности. Однако важно не допустить такого повышения температуры отжига, чтобы происходило эвтектическое плавление. После отжига температура полки приводится к желаемой рабочей температуре для первичной сушки [11].

Отжиг также может быть применен для увеличения размера кристаллов льда, так как при повышении температуры полки мелкие кристаллы льда активно расплавляются, не затрагивая структурную целостность крупных образований. Использование температуры, при которой скорость роста кристаллов льда превышает скорость ядрообразования, и последующее охлаждение полки позволяют аморфной воде кристаллизоваться на существующих более крупных кристаллах льда (рис. 3).

Процесс отжига зачастую рекомендуется с целью оптимизировать процесс лиофильной сушки. Он дает следующие преимущества: более стабильную структуру лиофилизата, предназначенного для приготовления раствора для инъекций, и повышение скорости сушки за счет расширения температурных пределов процесса.

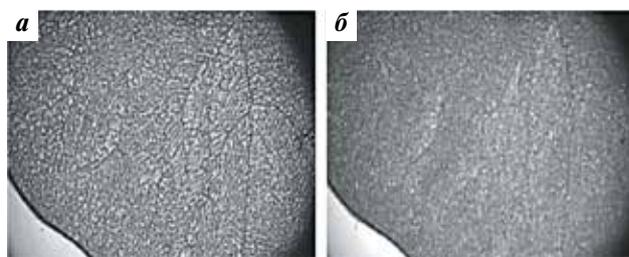


Рис. 2. Сублимационная микроскопия кристаллов льда, полученных при -40 °С с отжигом (а) и без него (б)

Оптимизация этапа первичной сушки

Во время первичной сушки из продукта удаляется большая часть воды и одновременно инициируется введение вакуума в камере. Этап требует временных и энергетических затрат, а значит, удорожает весь процесс. Оптимизация цикла лиофилизации, как правило, нацелена на минимизацию времени сушки. Данный показатель регулируется двумя основными параметрами: температурой полки и давлением в камере. На основной процесс сушки значительно влияют параметры, которые не требуют процессного управления, но явно заслуживают внимания: контейнер, состав, заполняемый объем, затвор, полная загрузка продукта, емкость конденсатора, температура конденсатора, расположение конденсатора, изменчивость температуры внутри и вне полки. Наиболее эффективная сушка требует соблюдения следующих рекомендаций:

- температуру полки следует установить и поддерживать на верхних пределах стабильности системы и продукта;

- давление должно оставаться в пределах эффективного взаимодействия процессов сублимации и сохранения температурного режима для предотвращения перегрузки конденсатора.

Таким образом, следует задать температуру на несколько градусов ниже температуры распада эвтектической смеси. При условии что достигнута заданная температура продукта, существует несколько комбинаций температуры полки и давления в камере, приводящих к повышению эффективности данного этапа. Как правило, сочетание высокой температуры полки и низкого давления в камере оптимально, потому что происходит более выраженное увеличение скорости сублимации, чем в случае сочетания низкой температуры полки с повышенным давлением в камере. Рекомендуется установить в камере давление на уровне около 10–30 % от давления пара льда при заданной температуре продукта (табл. 1).

Таблица 1. Давление насыщенного пара льда при отрицательных температурах

Температура, °С	Давление пара, мм рт. ст.				
	0	–2	–4	–6	–8
0	4579	3880	3280	2765	2326
–10	1950	1632	1361	1132	939
–20	776	640	526	437	351
–30	286	232	187	151	121
–40	96,6	76,8	60,9	48,1	37,8
–50	29,6	23,0	17,8	13,8	10,6
–60	8,08	6,14	4,64	3,49	2,61
–70	1,94	1,43	1,05	0,77	0,56

Ключевым параметром завершающей стадии первичной сушки является подбор оптимальной скорости нагрева лиофилизата. При низких показателях скорости нагрева и сублимации увеличиваются энергозатраты, при высоких – повышается вероятность разрушения структуры лиофилизата остаточной влагой. Следовательно, для перехода к этапу вторичной сушки необходимо постепенное медленное повышение температуры, коррелирующее с изменением скорости испарения остаточной влаги [12–14].

Коллапс структуры лиофилизата

Рассмотренный выше главный этап процесса лиофильной сушки позволяет понять особенности рецептуры и технологии данного метода и создать соответствующий алгоритм. Сложность и многофакторность физико-химических взаимодействий компонентов и систем в процессе сублимационной сушки обуславливают высокую частоту потенциальных нежелательных явлений в ходе ее осуществления. Соответственно, для оптимизации процесса в целом необходимо рассмотреть подходы к таким явлениям, как разрушение первичной структуры лиофилизата (коллапс)

и возникновение обратного плавления, эти технологические проблемы встречаются чаще всего.

Коллапс определяется как процесс, при котором структуры, созданные в ходе сублимационной сушки, разрушаются при прохождении границы сублимационного раздела фаз. Это может привести не только к изменению функциональных свойств лиофилизата белковых и пептидных препаратов, но и к уменьшению эффективности сублимационной сушки по причине перекрытия путей испарения, в результате влага удерживается и распределяется неравномерно. Зачастую разрушение лиофилизированной пористой массы, уплотненной в «таблетку», может стать причиной нарушения структуры белка.

Для предотвращения коллапса необходимо сохранить структурное соотношение кристаллической и аморфной фаз, достигнутое к моменту первичной сушки. Данный этап определяется оптимизацией температурного режима с учетом температуры стеклования аморфного компонента. Для поддержания структуры ТЛ температура во время первичной сушки должна быть ниже температуры стеклования аморфного компонента (рис. 3). При подборе температурного режима необходимо выбирать стандартные температуры стеклования и разрушения вспомогательных веществ, используемых в лиофилизации (табл. 2).

Другой подход к предотвращению коллапса ТЛ состоит в подборе вспомогательных веществ с высокой температурой стеклования аморфного компонента, так как для проведения лиофилизации белковых и пептидных препаратов рекомендуется среднее значение температуры продукта, что не всегда достижимо при низких значениях температуры стеклования в некоторых лиофилизаторах.

Если рассмотренные выше технологические приемы оказались недостаточно эффективны, можно включить в состав рецептуры вспомогательные вещества, которые кристаллизуются и придают ТЛ жесткую макроскопическую структуру. Предотвратить распад аморфной фракции не удастся, однако деструкция будет проявляться только на границе между аморфной и кристаллической фракциями. Эта методика рекомендуется в тех случаях, когда все другие варианты

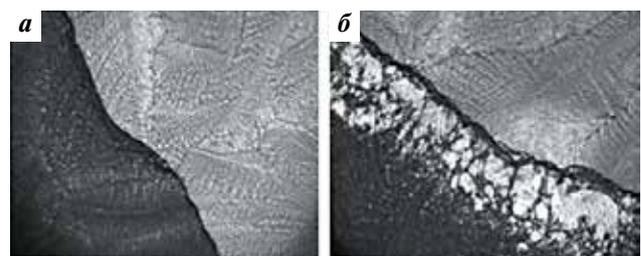


Рис. 3. Сублимационная микроскопия 2 % раствора сахарозы: сушка ниже (а) и выше (б) температуры стеклования

не приносят желаемых результатов, потому что даже микроскопический распад может привести к неблагоприятным последствиям, указанным выше.

Таблица 2. Температуры стеклования и разрушения основных вспомогательных веществ, используемых в лиофилизации

Класс вещества	Компонент состава	Температура, °С	
		стеклования	разрушения
Сахара	Сахароза	-32	-31
	Трегалоза	-29	-28,5
	Лактоза	-28	-30,5
	Мальтоза	-30	-
Аминокислоты	Глицин	-62	--
	β-аланин	-65	-
	Гистидин	-33	-
Полиолы	Глицерол	-65	--
	Сорбитол	-46	-54
	Маннитол	-35	-
Полимеры	Полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000)	--	-13
	Декстран	-	-11
	Поливинилпирролидон	-20,5	-24
Буферные компоненты и соли	Натрия ацетат	-64	--
	Натрия цитрат	-41	-
	KH_2PO_4	-55	-
	K_2HPO_4	-65	-
	Трис*HCl	-65	-
	$\text{NaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-60	-
	CaCl_2	-95	-
ZnCl_2	-88	-	

Оптимизация вторичной сушки

Вторичная сушка, как правило, осуществляется при температурных режимах, одновременно обеспечивающих эффективное удаление влаги и сохранение стабильности пептидов и белков. Выбор данного режима и продолжительность его применения определяется ключевым параметром данного этапа – остаточной влажностью лиофилизата.

Допустимый уровень остаточной влажности определяется, прежде всего, на основе данных о стабильности лиофилизата. При дальнейшей оптимизации процесса рекомендуется учитывать обратную зависимость остаточной влажности от температурных показателей и давления. Как правило, определяющей является температура полки, поскольку принято считать, что во время вторичной сушки ЛС на основе белков и пептидов скорость сушки достигает оптимальных значений при давлении меньше

200 мм рт. ст., температуру полки рекомендуется устанавливать около 25–30 °С [15].

Одним из самых сложных моментов в цикле лиофилизации является переход от первичной к вторичной сушке, так как нерационально подобранные условия данного этапа могут привести к обратному плавлению.

Обратное плавление

Обратное плавление – плавление льда в лиофилизате при повышении температуры полки выше температуры плавления эвтектики. Это может произойти во время перехода ко вторичной сушке, если температура будет подниматься слишком быстро и лиофилизат недостаточно высушен при первичной сушке, в результате возможна деградация белковой или пептидной структуры ЛС. Поэтому переход ко вторичной сушке требует медленного повышения температуры лиофилизата, в котором полностью завершился процесс первичной сушки.

Рассмотренные подходы к оптимизации технологических этапов лиофилизации позволяют с достаточной высокой вероятностью получить продукт, имеющий заданные характеристики.

Заключение

Лиофилизация противоопухолевых пептидных и белковых ЛС является перспективным методом увеличения стабильности, особенно в случае жидких парентеральных ЛФ.

Для предотвращения структурных изменений и агрегации белковых и пептидных ЛС необходимо подбирать и оптимизировать условия замораживания, первичной и вторичной сушки путем изменения температурного и временного режима каждого этапа с одновременным подбором оптимального диапазона давления в камере.

Наиболее часто встречаются такие нежелательные явления, как коллапс лиофилизата и обратное плавление. Для их предотвращения необходимо придерживаться температурного режима ниже точки стеклования и эвтектического плавления, избегать преждевременного повышения температуры в не до конца высушенном лиофилизате во время первичной сушки.

Использование отжига позволяет повысить температуру стеклования аморфного компонента, увеличить размер образующихся кристаллов и скорость первичной сушки.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Барышников А.Ю., Демидов Л.В., Кадагидзе З.Г. и др. Современные проблемы биотерапии злокачественных опухолей. Вестник Московского онкологического общества 2008;1:6–10.
2. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Деева Э.Г. Интерферон гамма: новый цитокин в клинической практике. Ингарон. М.: Димитрейд График Групп, 2007. 348 с.
3. Banga A.K. Therapeutic peptides and proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems. 3rd ed. Atlanta: CRC Press, 2015:139–67.
4. Аршинова О.Ю., Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Вспомогательные вещества в технологии лиофилизации лекарственных препаратов. Разработка и регистрация лекарственных средств 2013;2(2):20–5.
5. Mazzobre M.F., Longinotti M.P., Corti H.R., Buera M.P. Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems, in relation to biomaterial stabilization.
 1. Water sorption behavior and ice crystallization/melting. Cryobiology 2001;43(3):199–210. DOI: 10.1006/cryo.2001.2345. PMID: 11888214.
6. Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J., Nail S.L. Effects of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. Journal of pharmaceutical sciences 1999;88(12):1354–61. PMID: 10585234.
7. Tang X.C., Pikal M.J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharmaceutical research 2004;21(2):191–200. PMID: 15032301.
8. Carpenter J.F., Chang B.S., Garzon-Rodriguez W., Randolph T.W. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. Rational design of stable protein formulations. Pharm Biotechnol 2002;109–33. PMID: 11987749.
9. Chang L.L., Shepherd D., Sun J. et al. Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? J Pharm Sci 2005; 94(7):1427–44. DOI: 10.1002/jps.20364. PMID: 15920775.
10. Hottot A., Vessot S., Andrieu J. Freeze drying of pharmaceuticals in vials: Influence of freezing protocol and sample configuration on ice morphology and freeze-dried cake texture. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification 2007;46(7):666–74.
11. Searles J.A., Carpenter J.F., Randolph T.W. Annealing to optimize the primary drying rate, reduce freezing-induced drying rate heterogeneity, and determine T(g)' in pharmaceutical lyophilization. J Pharm Sci 2001;90(7):872–87. PMID: 11458336.
12. Chang B.S., Patro S.Y. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals. In: Lyophilization of Biopharmaceuticals. Eds.H.R. Costantino, M.J. Pikal. Arlington: AAPS Press, 2004:113–38.
13. Overcashier D.E., Patapoff T.W., Hsu C.C. Lyophilization of protein formulations in vials: investigation of the relationship between resistance to vapor flow during primary drying and small-scale product collapse. J Pharm Sci 1999;88(7):688–95. DOI: 10/1021/jps980445+. PMID: 10393566.
14. Searles J.A. Freezing and Annealing Phenomena in Lyophilization. In: Freeze-drying/lyophilization of pharmaceutical and biological products. Eds.L. Rey, J.C. May. New York: Informa Healthcare 2016:52–81.
15. Liu J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development. Pharm Dev Technol 2006;11(1):3–28. DOI: 10/1080/10837450500463729. PMID: 16544906.

ВЛИЯНИЕ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ОПУХОЛЮ ВЕЩЕСТВ НА ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ ПРИ РАКЕ

А.А. Кескинов^{1,2}, М.Р. Щурин², В.М. Бухман¹, З.С. Шпрах¹

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

²Департамент патологии Университета г. Питтсбург; США, Питтсбург 15213, Террас стрит, 3550

Контакты: Антон Артурович Кескинов a.keskinov@yahoo.com

Дендритные клетки играют уникальную и разнообразную роль в процессе онкогенеза и развития иммунного ответа на присутствие в организме опухолевых клеток. Дендритные клетки способны активно захватывать опухолевые антигены и представлять их Т-клеткам, вызывая тем самым опухолеспецифический Т-клеточный ответ. Кроме того, взаимодействие дендритных клеток с различными типами эффекторных клеток иммунной системы может усиливать клеточный и гуморальный ответ против рака. С другой стороны, ряд выделяемых опухолью факторов способен привлекать дендритные клетки в очаг неоплазии, нарушать их созревание, дифференцировку и функциональную активность, тем самым приводя к дефициту противоопухолевого иммунного ответа или опосредованной дендритными клетками толерантности организма к опухоли. Выявление факторов, которые в условиях опухолевого микроокружения оказывают стимулирующее либо подавляющее влияние на дендритные клетки, является важным этапом работы по улучшению методов биотерапии с использованием дендритных клеток; восстановление нормальных функций дендритных клеток у пациентов с раком является одной из основных задач иммунотерапии рака. В настоящем обзоре рассмотрены основные факторы, выделяемые опухолью, и их влияние на дендритные клетки в организме больных раком.

Ключевые слова: иммуносупрессия, дендритные клетки, опухолевое микроокружение, регуляторные дендритные клетки, цитокины

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-12-23

IMPACT OF TUMOR-DERIVED FACTORS ON DENDRITIC CELLS IN CANCER

A.A. Keskinov^{1,2}, M.R. Shurin², V.M. Bukhman¹, Z.S. Shprakh¹

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

²Department of Pathology, University of Pittsburgh; 3550 Terrace Street, Pittsburgh, 15213, USA

Dendritic cells play key role during tumorigenesis and immune response to it. They are able to uptake and present antigens to T cells, resulting in specific T cell mediated immune response. Furthermore, interaction between dendritic cells and other types of immune cells may boost cell-mediated and humoral immune response to cancer. Contrary to that, numerous tumor-derived factors may attract dendritic cells to neoplastic sites, causing impairment of their maturation, differentiation, and functional activity, resulting in deficiency of anti-tumor immune response or dendritic cell-mediated tolerance. Various factors within tumor microenvironment may either stimulate or inhibit dendritic cells and therefore need to be determined for improving efficacy of biotherapy utilizing dendritic cells. Meanwhile, recovery of dendritic cells functions in cancer patients remains one of primary aims for cancer immunotherapy. This review outlines main types of tumor-derived factors and their impact on dendritic cells in cancer.

Key words: immunosuppression, dendritic cells, tumor microenvironment, regulatory dendritic cells, cytokines

Введение

Секретируемые опухолью факторы можно разделить на активирующие иммунный ответ «сигналы опасности» и супрессорные «поляризующие» молекулы, подавляющие функции иммунокомпетентных клеток и способные стимулировать рост опухоли. Несмотря на то что большинство выделяемых опухолью факторов выявлены и охарактеризованы, не существует универсального эффективного метода повли-

ять на их экспрессию в опухолевом микроокружении с целью усилить иммуногенность опухоли в рамках клинической терапии.

Будучи основными антигенпредставляющими клетками, дендритные клетки (ДК) играют ключевую роль в иницировании и поддержании противоопухолевого иммунитета, при этом объединяя усилия врожденного и приобретенного звеньев иммунной системы.

С учетом особого вклада ДК в борьбу иммунной системы с опухолью разработаны и используются препараты на основе ДК для терапии разных видов рака. Однако лечение этими биопрепаратами приносит скромный клинический результат [1]. Дальнейшее изучение физиологии ДК убедительно продемонстрировало, что при раке функции ДК могут угнетаться, что снижает сопротивляемость организма неопластическому процессу [2]. Данные исследований показали, что поляризованные в опухолевом микроокружении ДК становятся иммуносупрессорными и толерогенными, тем самым они способствуют прогрессии опухоли [3]. При раке можно выделить несколько подвидов ДК: функционально полноценные «иммуностимуляторные» ДК, функционально дефектные ДК, погибающие ДК и поляризованные иммуносупрессорные «регуляторные» ДК [4]. Выявление опухолевых факторов, которые целенаправленно воздействуют на ДК, и изучение механизмов их действия способствуют поиску новых методов для нивелирования негативного влияния рака на ДК и увеличению эффективности терапии опухолей препаратами на основе ДК [5].

Активирующие ДК опухолевые факторы

ДК играют ключевую роль в противоопухолевой защите организма. После того как ДК захватывают злокачественные антигены, местные опухолевые и стромальные стимулы вызывают созревание ДК и их эмиграцию из опухоли в регионарные лимфатические узлы, где они представляют опухолевые антигены специфическим Т-клеткам. Сигналы от гибнущих опухолевых клеток способны стимулировать захват антигенов, их обработку и последующую презентацию ДК. При этом злокачественные клетки могут гибнуть по различным причинам, в том числе из-за гипоксии, недостатка питательных веществ и воздействия врожденного звена иммунной системы, которое привлекается выбросом молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (damage associated molecular pattern, DAMP), – аларминов, или сигналов опасности. Данный тип апоптотической и некроптотической клеточной гибели характеризуется индукцией эндоплазматического ретикулума и аутофагией, высвобождением кальрегулина на поверхности клеток, секрецией аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и выбросом амфотерина (chromatin-binding protein high-mobility group box 1, HMGB1) [6]. Среди DAMP-ассоциированных пептидов выделяют такие эндогенные молекулы, как HMGB1, белки теплового шока, гистоны, белки семейства S100, амилоид сыворотки А; в свою очередь, небелковые DAMP включают сульфат гепарина, мочевую кислоту, АТФ, геномную и митохондриальную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую кислоту (РНК) [7].

Важной функцией HMGB1 является защита клетки от повреждения в нормальных условиях, однако при воспалении, раке, сепсисе, травме и аутоиммунных процессах он способен играть роль DAMP. Рецепторами к HMGB1 служат toll-like-подобные рецепторы (TLR) 2, 4, 9, рецептор к конечным продуктам гликозилирования (receptor for advanced glycation end products, RAGE), CD24, α -синуклеиновые филаменты, протеогликаны, Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муциновый домен-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain-3, TIM-3), рецептор к *N*-метил-*d*-аспартату (*N*-methyl-*d*-aspartate receptor, NMDAR) и рецептор-триггер, экспрессируемый на миелоидных клетках-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1, TREM1) [8].

HMGB1 индуцирует созревание ДК через домен *B box*, что проявляется увеличением экспрессии CD83, CD54, CD80, CD40, CD58 и молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса, которое сочетается со снижением экспрессии CD206 [9]. Домен *B box* также усиливает секрецию провоспалительных цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) 12, 6, 1 α , 8, фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α), регулируемого при активации, экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками фактора (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted, RANTES). R. Saenz и соавт. сообщают, что пептид Hp91, чей сиквенс соответствует области домена *B box*, активирует ДК и выступает как адъювант *in vivo*. Активация ДК происходит через сигнальные пути MyD88 и TLR4 с участием митоген-активированной протеинкиназы (p38 mitogen-activated protein kinases p38, p38 MAPK) и транскрипционного фактора (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B) [10]. Поэтому выделяемый погибающими опухолевыми клетками HMGB1 может быть сигналом повреждения клеток и тканей, который индуцирует реакцию иммунной системы через активацию ДК. Было показано, что секреция HMGB1 во время канцерогенеза при раке шейки матки может приводить к толерогенной активности плазматоидных ДК [11].

Другие данные демонстрируют особую роль структурно гомологичных кальмодулину белков семейства S100. Эти белки способны выступать в роли молекул DAMP, тем самым играя такую же роль в регуляции процесса воспаления, как и HMGB1 [12]. Большинство внутриклеточных белков семейства S100 участвуют в регуляции внутриклеточных процессов клеточного цикла, пролиферации, дифференцировки и миграции, деградации белков, организации цитоскелета, фосфорилирования белков и активности транскрипционных факторов [13]. Было показано, что выброс различными клетками белков семейства S100 может служить достоверным

маркером активности заболевания при астме, хронической обструктивной болезни легких, колите, ревматоидном артрите, болезни Альцгеймера и раке [14]. Более того, сообщалось о регуляторной роли белков S100A8 и S100A9 в процессе роста опухоли [15]. Также известно о значительных изменениях экспрессии белков S100B, S100A2, S100A4, S100A6, S100A8/A9 и S100P при различных видах рака [16]. Например, наличие высоких уровней белка S100B в сыворотке способно служить биологическим маркером злокачественной меланомы, а изменение количества белков S100A2 и S100A6 может использоваться как биологический маркер немелкоклеточного рака легких [17]. Белки S100A8 и S100A9 способны регулировать дифференцировку и функции ДК и прочих миелоидных клеток [18]. Ряд исследований свидетельствуют о влиянии выделяемых опухолью белков S100 на активность ДК. Например, белок S100A4 необходим ДК для активации Т-клеток [19].

Белки теплового шока (БТШ) – хорошо изученные молекулы DAMP при раке. С БТШ связывают процессы активации и интеграции врожденного и приобретенного звеньев иммунной системы. Изучение молекулярного веса и филогенеза позволило выделить 5 основных семейств, однако только белки HSP96, HSP90, HSP70, HSP110 и HSP170 достоверно вызывают иммунный ответ в качестве мембрансвязанных и внеклеточных компонентов [20]. Стимуляция кросс-презентации антигена достигается путем связывания БТШ с поверхностными рецепторами определенной клетки, после чего происходят интернализация антигена, его процессинг и презентация. Например, БТШ CD91, связываясь с иммунными клетками, способствует созреванию ДК, секреции цитокинов и праймированию Т-клеток [21]. HSP70 связывается с незрелыми ДК и индуцирует их созревание, подтверждением чему служит увеличение экспрессии CD40, CD86 и CD83, а также усиление способности презентовать антигенспецифическим цитотоксическим лимфоцитам [22]. Опухолевые комплексы пептидов и БТШ, поступающие из некротизированных клеток или секретирующиеся в ответ на клеточный стресс, также могут участвовать в активации иммунной системы путем кросс-презентации этих пептидов ДК [23].

Подавляющие ДК опухолевые факторы

Наряду с цитотоксическими Т-клетками, макрофагами, клетками – естественными киллерами (Natural killer, NK), $\gamma\delta$ -Т-клетками и В-клетками ДК играют важную роль в иммунологическом контроле возникновения и развития онкологических заболеваний благодаря способности узнавать и уничтожать вновь возникающие злокачественные клетки. Однако возникновение и развитие рака связаны с дефектами

защитных иммунологических механизмов, когда новые раковые клетки получают способность ускользать от контроля иммунной системы, тем самым обеспечивая себе выживание и приводя к прогрессии опухолевого процесса. При взаимодействии иммунокомпетентных и опухолевых клеток различные растворимые факторы, которые секретируются раковыми клетками и клетками опухолевой стромы, способны играть одну из важнейших ролей.

Выделяемые опухолью супрессорные факторы: ростовые факторы, цитокины, хемокины

Фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor, VEGF) секретируется большинством опухолей и отвечает за процесс неоваскуляризации опухоли. При раке увеличение уровня VEGF в сыворотке пациентов коррелирует с негативным прогнозом [24]. VEGF был одним из первых секретируемых опухолью факторов, влияние которого на ДК было продемонстрировано. Воздействие через рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2 приводило к ингибированию дифференцировки и созревания ДК [25]. VEGF оказывает тормозящее действие на развитие и созревание ДК *in vitro* и *in vivo*, блокируя активацию NF- κ B в гематопоетических клетках-предшественниках [26]. Отмечается обратная корреляция между уровнем VEGF в сыворотке пациентов и количеством ДК, кроме того, в ДК определяются увеличение частоты апоптотических изменений фенотипа и усиление экспрессии рецептора к хемокину 4 (CXCR4) [27]. VEGF регулирует миграцию ДК путем мобилизации незрелых миелоидных клеток и незрелых ДК из костного мозга к опухоли [28].

Перспективным направлением является терапия с использованием препаратов – «ловушек» VEGF (афлиберцепт), направленная на ингибирование сигнального пути VEGF и повышение количества зрелых ДК у пациентов с рефрактерными солидными опухолями [29]. В свою очередь, исследования *in vitro* продемонстрировали, что ингибирование экспрессии VEGF с помощью коротких интерферирующих РНК в клетках рака молочной железы эффективно восстанавливает процесс дифференцировки и созревания ДК, что увеличивает способность ДК индуцировать опухолеспецифический цитотоксический Т-клеточный ответ [30].

Известно, что члены семейства трансформирующего ростового фактора бета (transforming growth factor beta, TGF- β) также способны регулировать активность и дифференцировку ДК [31]. ДК экспрессируют рецепторы к TGF- β 1-го типа, включая рецептор к активину 1 (activin receptor 1, ACVR1), ACVR1B, рецепторы к костным морфогенетическим белкам (bone morphogenetic protein receptor, BMPR) 1A, BMPR1B,

рецептор TGF- β (TGFBR) 1, а также рецепторы к TGF- β 2-го типа – TGFBR2, BMPR2, ACVR2A, ACVR2B.

Однако роль многих членов семейства TGF- β в регуляции жизнедеятельности ДК в опухолевом микроокружении изучена недостаточно. Повышенная экспрессия TGF- β в опухолевом микроокружении часто сочетается с замедленным созреванием и ограничением функциональной активности ДК, что нарушает опухолеспецифический иммунный ответ [32]. Секретируемый опухолью TGF- β снижает экспрессию маркеров созревания ДК: CD83, CD80, CD86 и молекул ГКГС II класса [33]. Кроме того, отмечается нарушение экспрессии усиливающих созревание ДК провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1, ИЛ-12 и интерферона- α , в то же время происходит увеличение секреции регуляторных цитокинов, в том числе TGF- β [34]. Лиганды семейства TGF- β также влияют на миграцию ДК посредством регуляции экспрессии хемокинов и рецепторов к ним [31]. Кроме того, TGF- β способен напрямую индуцировать апоптоз в ДК [35].

Данные, подтверждающие снижение созревания ДК под влиянием TGF- β , позволяют сделать вывод, что выделяемый опухолью TGF- β может значительно подавлять функции ДК и их способность инициировать противоопухолевый ответ. TGF- β также способен поляризовать ДК в иммуносупрессорный фенотип. Такие регуляторные ДК обладают способностью подавлять пролиферацию эффекторных Т-клеток и индуцируют дифференцировку Т-клеток в регуляторный фенотип (regulatory T cell (s), Treg) [3, 4]. Например, TGF- β дозо- и времязависимо увеличивает экспрессию лиганда 1 программированной смерти клеток (programmed death-ligand 1, PD-L1), сигнального белка и активатора транскрипции 3 (signal transducers and activators of transcription 3, STAT3) в ДК [36].

Кроме того, сообщалось об экспрессии опухолевыми клетками лигандов семейства активина, которые способны менять фенотип и функциональную активность ДК. Например, секретируемый различными опухолями белок Nodal способен поляризовать ДК в регуляторный фенотип, усиливая экспрессию циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2).

Другой член семейства TGF- β – фактор роста и дифференцировки 15 (growth differentiation factor-15, GDF-15) находят в тканях и сыворотке крови пациентов с глиобластомой, раком желудка, ободочной и прямой кишки, простаты, яичников. GDF-15 ингибирует экспрессию CD83, CD86 и рецепторов ГКГС II класса на ДК, снижает уровень ИЛ-12 и увеличивает продукцию TGF- β 1. Также повышается фагоцитарная активность ДК, но отмечается ограничение способности стимулировать Т-клетки *in vitro* и *in vivo* [37].

ИЛ-10 является противовоспалительным цитокином, который секретируется преимущественно моноцитами и лимфоцитами. Однако о секреции ИЛ-10 раковыми клетками сообщалось при меланоме, множественной миеломе и раке легкого [38, 39]. Секретируемый опухолью ИЛ-10 оказывает ингибирующий эффект на созревание ДК и их способность стимулировать Т-клеточный иммунный ответ [40]. При гепатоцеллюлярной карциноме увеличение уровня ИЛ-10 в сыворотке коррелирует со значительным количественным дефицитом и незрелым фенотипом циркулирующих популяций ДК, что указывает на важную роль этого цитокина в патогенезе дисфункции ДК при раке [41].

Ранее сообщалось об ингибирующем влиянии ИЛ-10 на экспрессию костимуляторных молекул и молекул ГКГС на ДК [42]. Например, выделяемый опухолью ИЛ-10 ингибирует экспрессию CD40, подавляет CD40-зависимую продукцию ИЛ-12, снижает экспрессию рецепторов к хемокинам, блокирует презентацию антигенов и индуцирует экспрессию PD-L1 на ДК [43].

ИЛ-6 также оказывает широкий спектр биологических эффектов на рост клеток, дифференцировку, жизнеспособность и миграцию при иммунном ответе, гематопоезе и воспалении [44]. Повышенную секрецию ИЛ-6 у онкологических пациентов связывают с нарушениями функций ДК. Например, сообщалось об увеличении уровней ИЛ-8 и ИЛ-6 в плазме пациентов с эпителиальным раком яичников, при этом сообщалось о повышенной секреции *in vitro* этих цитокинов клетками линии эпителиального рака яичников [45]. Любопытно, что иммуносупрессия ДК при их совместной инкубации с супернатантом от клеток рака яичника регрессировала после блокировки продукции ИЛ-8 и ИЛ-6. Более того, выделяемый опухолью ИЛ-6 влияет на дифференцировку гематопозитических клеток-предшественников и моноцитов, включая макрофаги и ДК *in vitro*, и может быть причиной образования толерогенного фенотипа ДК [46]. При применении ингибитора JAK2/STAT3 препарата AG490 отмечается нормализация иммуносупрессии в ДК, возникающей под воздействием ИЛ-6 [47]. Поскольку STAT3 играет важную роль при влиянии ИЛ-6 на дифференцировку и созревание ДК, фосфорилированный STAT3 в ДК может быть одной из целей иммунотерапии рака [46].

Макрофагальный колониестимулирующий фактор (М-КСФ) является одним из основных регуляторов жизнедеятельности для мононуклеарных клеток. М-КСФ экспрессируется в клетках рака молочной железы и почечной карциномы, что является неблагоприятным прогностическим фактором [48]. М-КСФ не только регулирует опухолевую прогрессию и метастазирование за счет воздействия

на макрофаги, но также подавляет дифференцировку ДК [49]. Выделяемый опухолью М-КСФ способен ингибировать образование ДК из CD34⁺ гематопоэтических предшественников и индуцировать дифференцировку моноцитов в толерогенные ДК.

Секретируемый опухолью белок RANKL, член семейства факторов некроза опухоли, также способен влиять на ДК, снижая экспрессию ИЛ-12 и повышая продукцию ИЛ-10, приводя к поляризации ДК в регуляторные ДК, которые увеличивают образование FoxP3⁺ Т-регуляторных клеток [50].

Известно, что несколько выделяемых опухолью хемокинов могут воздействовать на ДК, меняя их способность к миграции и созреванию. Любопытно, что незрелые ДК могут более активно привлекаться в опухоль секретируемыми факторами – лигандами к хемокину chemokine (C–C motif) ligand): CCL2, CCL20, CCL25, CCL5, CXCL12, CXCL1 и CXCL5, в то время как зрелые ДК менее восприимчивы к этим сигналам [51]. Следовательно, секретируемые злокачественными клетками и стромой хемокины играют важную роль в локализации и миграции ДК, инфильтрирующих опухоль, равно как и в поддержании незрелого статуса ДК. Например, клетки эпителиального рака яичников человека экспрессируют высокие уровни хемокина CXCL12, который связывается с рецептором к хемокину CXCR4 на предшественниках ДК и индуцирует их хемотаксис, трансмиграцию и адгезию [52]. Также известно, что выделяемые меланомой факторы могут изменять степень созревания и активации резидентных ДК, причем степень этих изменений коррелирует с агрессивностью роста меланомы *in vivo* [53].

Выделяемые опухолью супрессорные факторы

Опухолевые антигены

Простатический специфический антиген (ПСА) – это сериновая протеаза, являющаяся органоспецифическим маркером, экспрессия которой повышена в большинстве случаев рака простаты. Данный антиген был одним из первых опухолевых антигенов, негативное влияние которого на созревание, жизнеспособность и функции ДК было показано в ряде исследований [54]. Добавление активного ПСА к культурам ДК приводит к выраженному замедлению дифференцировки и созревания ДК, что проявляется низким уровнем экспрессии молекул CD83, CD80, CD86 и ГКГС II класса. Кроме того, при обработке ДК ПСА отмечалось торможение способности ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток. В другом исследовании было выявлено, что эндогенные факторы в сыворотке пациентов с раком простаты ингибировали образование функционально активных ДК из CD14⁺ моноцитов *in vitro*. Этот процесс положительно коррелировал с уровнем свободного ПСА в крови

больных раком простаты [55]. Данное наблюдение позволяет предположить, что ПСА может негативно влиять на резидентные ДК при раке простаты.

Во многих раковых клетках повышена экспрессия гликопротеина муцин 1 (mucin 1, MUC1). В нормальных клетках MUC1 формирует защитный слой, который противостоит воздействию микробов и токсичных веществ, однако гиперсекреция MUC1 приводит к усилению способности раковых клеток к инвазии, метастазированию и резистентности к иммунному ответу [56]. MUC1 может привлекать незрелые ДК к опухоли и нарушать их полноценное созревание, тем самым снижая функции ДК. При культивировании с MUC1 ДК демонстрируют повышение экспрессии CD83, CD80, CD86, CD40 и молекул ГКГС II класса; однако эти ДК также секретируют значительные количества ИЛ-6, ФНО- α и ИЛ-10 и не вырабатывают ИЛ-12. Когда эти ДК кокультивируют с CD4⁺ Т-клетками, они индуцируют выработку ИЛ-13 и ИЛ-5, однако снижается уровень ИЛ-2, таким образом, они оказываются неспособны вызвать ответ Th1-типа [57]. Выделяемый опухолью MUC1 влияет на секрецию цитокинов в ДК и превращает их в регуляторные ДК, которые секретируют больше ИЛ-10 и меньше ИЛ-12 [58]. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что выделяемый опухолью MUC1 способен нарушать созревание и функциональную активность при определенных типах рака, что ставит MUC1 в один ряд с прочими факторами, которые способствуют ускользанию опухоли от иммунного ответа, а также объясняет присутствие толерогенных ДК при MUC1-положительном раке.

Важный маркер при хорионкарциноме и раке яичка – человеческий хорионический гонадотропин – увеличивает экспрессию индоламин-2,3-диоксигеназы (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO) в ДК [59]. Фермент IDO участвует в деградации триптофана, основной аминокислоты, которая необходима для пролиферации клеток. Данный механизм лежит в основе опосредованной IDO супрессии Т-клеток дендритными клетками [60].

Другие молекулы

В норме ганглиозиды обнаруживаются преимущественно в нервной системе, однако их экспрессия повышается и при опухолях нейроэктодермального происхождения. Ганглиозиды участвуют в межклеточных взаимодействиях, регулируя подвижность клетки и клеточный цикл [61]. Выделяемые нейробластомой ганглиозиды участвуют в формировании резистентности опухоли к иммунному ответу путем снижения образования ДК, а также ограничения их жизнеспособности и функциональной активности [62]. Например, секретируемые меланомой ганглиозиды нарушают дифференцировку ДК и индуцируют их апоптоз [63, 64].

Простаноиды (простагландины, простациклины и тромбоксаны) являются медиаторами воспаления, анафилактических реакций и вазоконстрикции. Уровни простаноидов увеличены при многих опухолях, при этом часто наблюдается снижение иммунных функций. Например, у пациентов с раком колоно-ректальной области отмечается повышение уровня простагландина E_2 (prostaglandin E_2 , PGE_2) и активности ЦОГ-2, что коррелирует с размером опухоли и выживаемостью пациентов [65]. Под воздействием простагландина E_2 снижается дифференцировка $CD34^+$ предшественников в зрелые ДК [66]. Кроме того, PGE_2 вызывает усиление экспрессии IDO1 в ДК, что приводит к ингибированию опосредованной ДК антигенспецифической стимуляции Т-клеток и их дифференцировке в Т-регуляторные клетки [67].

Сообщалось о повышении количества полиаминов (путресцина, спермидина, спермина) при раке простаты, молочной железы и ободочной кишки [68, 69]. Спермин индуцирует нарушения созревания и функций ДК *in vitro*. Кроме того, у пациенток с раком молочной железы отмечается обратная зависимость между уровнем спермина и количеством ДК, экспрессирующих ИЛ-12 [70].

Другим выделяемым опухолью фактором является молочная кислота – конечный продукт гликолиза, который достоверно влияет на раковые клетки, окружающую их строму и клетки эндотелия в опухолевом микроокружении, что приводит к воспалительному процессу в опухоли и стимуляции образования патологических сосудов [71]. Одновременно молочная кислота оказывает прямое воздействие на ДК, приводя к ингибированию производства ИЛ-12 и презентации опухолевых антигенов, препятствуя обнаружению опухоли иммунной системой [72]. Высокие концентрации молочной кислоты нарушают дифференцировку ДК, приводя к сокращению числа иммунокомпетентных ДК и стимулируя продукцию ИЛ-10 [73].

Еще один механизм ингибирования противоопухолевого ответа – это накопление аденозина. Любопытно, что в нормальной ткани концентрация аденозина находится в пределах 10–100 нМ, в то время как в опухолях она достигает 50–100 мкМ [74]. После выхода в межклеточное пространство аденозин оказывает множество иммуномодулирующих эффектов, которые реализуются через аденозиновые рецепторы на разных иммунных клетках, включая ДК. Например, у мышей аденозин может нарушать дифференцировку ДК предшественников в $CD11c^+Gr-1^+$ [75]. Дифференцированные под воздействием аденозина ДК экспрессируют ряд ангиогенных провоспалительных и иммуносупрессорных молекул, включая TGF- β , ИЛ-10, VEGF, ИЛ-6, ИЛ-8, ЦОГ-2 и IDO, кроме того, они могут стимулировать рост злокачественного

новообразования при внутриопухолевом введении в экспериментальной модели [76].

Новые данные подтверждают особую роль липидов и их накопления в физиологии ДК. Например, триглицериды способны снижать жизнеспособность и функциональную активность ДК при раке. По мере развития ДК превращаются в клетки ворсинчатого вида благодаря большому числу липидных включений липидов, поскольку производство липидов и их потребление играют важнейшую роль в биологии ДК [77].

У больных с раком молочной железы и раком ободочной кишки отмечается повышение уровня липидов, в особенности триглицеридов, у значительной части ДК [78]. Накопление липидов в ДК происходит за счет усиленного захвата липидов из внеклеточного пространства, индуцированного увеличением экспрессии фагоцитарного рецептора А, при этом перегруженные липидами ДК демонстрируют ограниченную способность к обработке антигенов. Также сообщалось о том, что мезотелиома усиливает захват липидов дендритными клетками, что сопровождается снижением обработки антигенов вместе с повышением экспрессии костимуляторных молекул и производства ИЛ-10 [79].

При индуцированном радиационным облучением раке одним из объяснений механизма аккумуляции липидов в ДК может служить повышение экспрессии липопротеинлипазы и связывающего жирные кислоты белка 4 (fatty acid binding protein, FABP4) вкупе с повышением уровня триацилглицерола [80]. Под воздействием опухоли в ДК отмечается активация ответа неструктурированных белков, что проявляется высоким уровнем стрессового фактора – связывающего X-box белка (X-box binding protein 1, XBP1). В свою очередь, XBP1 связан с образованием активных форм кислорода в опухоли, что усиливает окисление липидов, стимулирует в ДК программу биосинтеза триглицеридов и приводит к аномальному накоплению липидов с последующей супрессией способности ДК к стимуляции противоопухолевого Т-клеточного ответа [81]. XBP1 является не только важным компонентом ответа неструктурированных белков, но и незаменимым нуклеарным транскрипционным фактором. Белки, которые кодируют многие целевые гены XBP1, являются ферментами, участвующими в синтезе жирных кислот. Усиленное производство жирных кислот приводит к формированию липидных включений в цитоплазме и расширению эндоплазматического ретикула [82].

Известно, что многие опухоли секретируют различные нейропептиды [83]. Некоторые из этих пептидов также способны влиять на функции ДК и, как следствие, на развитие противоопухолевого иммунного ответа. Например, субстанция Р индуцирует пролиферацию

опухолевых клеток, а также их миграцию, инвазию, внутриопухолевый ангиогенез и развитие метастазов [84]. Более того, субстанция Р подавляет фагоцитарную активность ДК [85]. При раке нейропептид Y также может выступать как регулятор роста и ангиогенеза в опухоли; а его экспрессия коррелирует со степенью прогрессии и инвазивности меланомы кожи [86]. Сообщалось об индукции поляризации ДК по 2-му типу, благодаря усилению секреции ИЛ-6 и ИЛ-10 под влиянием нейропептида Y [87].

Секретируемые опухолью бомбезин, нейромедин В и гастрин-релизинг пептид также способны угнетать созревание ДК, что проявляется в снижении экспрессии CD40, CD80 и CD86, сокращении продукции ИЛ-12 и ограничении способности стимулировать пролиферацию Т-клеток [88].

Член семейства факторов некроза опухоли рецептор гибели 6 (death receptor 6, DR6), повышенная экспрессия которого отмечается на поверхности многих видов опухолевых клеток, способен влиять на созревание и функциональную активность ДК. При отщеплении с поверхности опухолевых клеток матриксной металлопротеиназой 14 (MMP-14) DR6 способен индуцировать апоптоз более чем у 50 % моноцитов, дифференцирующихся в ДК, изменяя уровень экспрессии цитокинов в получающихся незрелых ДК [89].

Выделяемые опухолью микровезикулы представляют собой еще одну гетерогенную группу связанных с мембраной частиц, которые выбрасываются опухолью в межклеточное пространство. В состав этих везикул могут входить белки, липиды, гликопротеины,

Секретируемые опухолью ингибирующие ДК факторы

Фактор	Эффект на ДК	Сигнальный путь	Ссылка
Аденозин	Нарушение дифференцировки и функциональной активности, а также привлечения Т-клеток	Еrac1-Rap1-зависимые сигнальные пути	[74, 76, 93]
Ганглиозиды	Ингибирование образования ДК, снижение их жизнеспособности и функций	IRAK-M	[62, 63]
ИЛ-6	Влияние на жизнеспособность, дифференцировку, миграцию	MAPK, STAT3, NF-kB	[44, 46]
ИЛ-8	Нарушение миграции	PI3K, AKT, PKC, MAPK	[94]
ИЛ-10	Нарушение созревания и дифференцировки, индукция толерогенного фенотипа	p38 MAPK, STAT3	[47, 95, 96]
М-КСФ	Подавление дифференцировки	PI3K	[97]
Молочная кислота	Ингибирование дифференцировки	NF-kB	[72, 73]
Муцин 1	Регулирование хемотаксиса. Индукция неполноценного созревания		[57]
Нейропептиды	Регуляция образования, жизнеспособности и функциональной активности ДК	Множество сигнальных путей	[3, 88]
Простагландины	Регуляция дифференцировки	RAS-MAPK, PI3K/AKT, PKA	[98]
ПСА	Ингибирование созревания, жизнеспособности и функциональной активности	MAPK, STAT3, NF-kB	[54]
Человеческий хорионический гонадотропин	Индукция толерогенного фенотипа		[59]
Экзосомы	Нарушение дифференцировки	Множество сигнальных путей	[90, 91]
GDF-15	Ингибирование экспрессии костимуляторных молекул, производства ИЛ-12, стимуляции Т-клеток, увеличение экспрессии TGF-β		[37]
CCL2 MIP3a SDF-1	Регулирование миграции и созревания	PI3K NF-kB, MAPK, JAK/STAT	[99] [52] [100]
TGF-β	Подавление созревания и функциональной активности	SMAD, STAT3	[35]
VEGF	Ингибирование дифференцировки, созревания, миграции, индукция апоптоза	NF-kB	[25]
RANKL	Поляризация в толерогенный фенотип		[50]

гликолипиды, пептиды, РНК, микроРНК, ДНК, что позволяет предположить участие различных механизмов регуляции межклеточного взаимодействия в опухолевом микроокружении по мере развития опухолевого процесса. Выделяемые опухолью микро-везикулы или экзосомы способны нарушать функции миелоидных клеток в опухолевом микроокружении посредством нарушения дифференцировки моноцитов в ДК и усиления образования иммуносупрессорных клеток миелоидного типа [90]. Полученные при биопсии рака легкого экзосомы содержат рецептор эпидермального фактора роста и индуцируют образование толерогенных ДК, что приводит к появлению опухолеспецифичных Т-регуляторных клеток, способных подавлять иммунный ответ опухолеспецифичных CD8⁺ Т-клеток [91]. Более того, при раке поджелудочной железы микроРНК из экзосом ингибируют экспрессию мРНК в ДК, что приводит к снижению экспрессии молекул ГКГС и усилению иммунной толерантности к раку [92]. Секретируемые опухолью ингибирующие ДК факторы обобщенно представлены в таблице.

Заключение

ДК являются наиболее активными и значимыми антигенпредставляющими клетками. Взаимодействуя с НК, НКТ, Т- и В-лимфоцитами, макрофагами, нейтрофилами, тучными клетками, а также неиммунными клетками, ДК играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа, поддерживая стабильность иммунного гомеостаза. Поскольку ДК являются критическим связующим звеном между врожденным иммунитетом и приобретенным иммунитетом, они

часто являются мишенью различных опухолевых клеток, которые стремятся ускользнуть от иммунного ответа и последующего уничтожения. Новые сведения, полученные в результате двух последних декад исследований биологии ДК, свидетельствуют об особой роли ДК в процессе формирования иммуносупрессорного и толерогенного микроокружения опухоли, которое может способствовать росту опухоли, блокируя иммунный ответ. Несмотря на данные о множестве биологически активных веществ, воздействующих на ДК, остаются без ответа главные вопросы: почему различные опухоли используют идентичные механизмы воздействия на ДК и по какой причине опухоли одного типа могут использовать разные сигнальные пути?

Существует интересное наблюдение: некоторые факторы, выделяемые опухолью, могут оказывать противоположный эффект в зависимости от фазы опухолевого процесса, их концентрации и присутствия других факторов и/или клеток. Среди наиболее показательных в этом плане секретируемых опухолью факторов можно отметить простагландины и ФНО- α .

Взаимный баланс между стимулирующими и подавляющими ДК факторами в микроокружении опухоли в каждый отдельный момент времени представляет собой уникальный параметр, который характеризует иммунологическую активность в опухолевом микроокружении. Углубленное понимание внутриклеточных механизмов, которые формируют иммуногенные и толерогенные фенотипы ДК, способно обеспечить необходимые практические знания для разработки новых эффективных методов терапии с использованием ДК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Zhong H., Shurin M.R., Han B. Optimizing dendritic cell-based immunotherapy for cancer. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(3):333–45. DOI: 10.1586/14760584.6.3.333. PMID: 17542749.
- Ma Y., Shurin G.V., Gutkin D.W. et al. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Seminars in cancer biology* 2012;22(4):298–306. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.02.010. PMID: 22414911. PMCID: PMC3373995.
- Shurin G.V., Ma Y., Shurin M.R. Immunosuppressive mechanisms of regulatory dendritic cells in cancer. *Cancer microenvironment: official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 2013;6(2):159–67. DOI: 10.1007/s12307-013-0133-3. PMID: 23749739. PMCID: PMC3717058.
- Ma Y., Shurin G.V., Peiyuan Z. et al. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J Cancer* 2013;4(1):36–44. DOI: 10.7150/jca.5046. PMID: 23386903. PMCID: PMC3564245.
- Shurin M.R., Naiditch H., Zhong H. et al. Regulatory dendritic cells: new targets for cancer immunotherapy. *Cancer Biol & Ther* 2011; 11(11):988–92. PMID: 21474998.
- Garg A.D., Dudek-Peric A.M., Romano E. et al. Immunogenic cell death. *Int J Dev Biol* 2015;59(1–3):131–40. DOI: 10.1387/ijdb.150061pa. PMID: 26374534.
- Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):1–5. DOI: 10.1189/jlb.0306164. PMID: 17032697.
- Sims G.P., Rowe D.C., Rietdijk S.T. et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 2010;28:367–88. DOI: 10.1146/annurev.immunol.021908.132603. PMID: 20192808.
- Saenz R., Futralan D., Leutenetz L. et al. TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J Transl Med* 2014;12:211. DOI: 10.1186/1479-5876-12-211. PMID: 25123824. PMCID: PMC4261565.
- Saenz R., Messmer B., Futralan D. et al. Activity of the HMGB1-derived

- immunostimulatory peptide Hp91 resides in the helical C-terminal portion and is enhanced by dimerization. *Mol Immunol* 2014;57(2):191–9. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.09.007. PMID: 24172222. PMCID: PMC4520421.
11. Demoulin S., Herfs M., Somja J. et al. HMGB1 secretion during cervical carcinogenesis promotes the acquisition of a tolerogenic functionality by plasmacytoid dendritic cells. *Int J Cancer* 2015;137(2):345–58. DOI: 10.1002/ijc.29389. PMID: 25492101.
 12. Chen B., Miller A.L., Rebelatto M. et al. S100A9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns(DAMP) receptors in vitro and in vivo. *PLoS One* 2015;10(2):e0115828. DOI: 10.1371/journal.pone.0115828. PMID: 25706559. PMCID: PMC4338059.
 13. Donato R., Cannon B.R., Sorci G. et al. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013;13(1):24–57. PMID: 22834835. PMCID: PMC3707951.
 14. Lee T.H., Jang A.S., Park J.S. et al. Elevation of S100 calcium binding protein A9 in sputum of neutrophilic inflammation in severe uncontrolled asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2013;111(4):268–75 e1. DOI: 10.1016/j.anai.2013.06.028. PMID: 24054362.
 15. Srikrishna G. S100A8 and S100A9: new insights into their roles in malignancy. *J Innate Immun* 2012;4(1):31–40. DOI: 10.1159/000330095. PMID: 21912088. PMCID: PMC3250655.
 16. Zhu L., Kohda F., Nakahara T. et al. Aberrant expression of S100A6 and matrix metalloproteinase 9, but not S100A2, S100A4, and S100A7, is associated with epidermal carcinogenesis. *J Dermatol Sci* 2013;72(3):311–9. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2013.07.005. PMID: 23993025.
 17. Wang T., Liang Y., Thakur A. et al. Diagnostic significance of S100A2 and S100A6 levels in sera of patients with non-small cell lung cancer. *Tumour Biol* 2015. DOI: 10.1007/s13277-015-4057-z. PMID: 26361956.
 18. Averill M.M., Barnhart S., Becker L. et al. S100A9 differentially modifies phenotypic states of neutrophils, macrophages, and dendritic cells: implications for atherosclerosis and adipose tissue inflammation. *Circulation* 2011;123(11):1216–26. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.985523. PMID: 21382888. PMCID: PMC3072335.
 19. Bruhn S., Fang Y., Barrenas F. et al. A generally applicable translational strategy identifies S100A4 as a candidate gene in allergy. *Sci Transl Med* 2014;6(218):218ra4. DOI: 10.1126/scitranslmed.3007410. PMID: 24401939. PMCID: PMC4539009.
 20. Ampie L., Choy W., Lamano J.B. et al. Heat shock protein vaccines against glioblastoma: from bench to bedside. *J Neurooncol* 2015;123(3):441–8. DOI: 10.1007/s11060-015-1837-7. PMID: 26093618. PMCID: PMC4520407.
 21. Pawaria S., Binder R.J. CD91-dependent programming of T-helper cell responses following heat shock protein immunization. *Nat Commun* 2011;2:521. DOI: 10.1038/ncomms1524. PMID: 22045000. PMCID: PMC3356570.
 22. Kuppner M.C., Gastpar R., Gelwer S. et al. The role of heat shock protein (hsp70) in dendritic cell maturation: hsp70 induces the maturation of immature dendritic cells but reduces DC differentiation from monocyte precursors. *Eur J Immunol* 2001;31(5):1602–9. DOI: 10.1002/1521-4141(200105)31:5<1602::AID-IMMU1602>3.0.CO;2-W. PMID: 11465118.
 23. Binder R.J., Srivastava P.K. Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 2005;6(6):593–9. DOI: 10.1038/ni1201. PMID: 15864309.
 24. Toi M., Matsumoto T., Bando H. Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Lancet Oncol* 2001;2(11):667–73. DOI: 10.1016/S1470-2045(01)00556-3. PMID: 11902537.
 25. Gabrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R. et al. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 1996;2(10):1096–103. PMID: 8837607.
 26. Shi Y., Yu P., Zeng D. et al. Suppression of vascular endothelial growth factor abrogates the immunosuppressive capability of murine gastric cancer cells and elicits antitumor immunity. *FEBS J* 2014;281(17):3882–93. DOI: 10.1111/febs.12923. PMID: 25041128.
 27. Della Porta M., Danova M., Rigolin G.M. et al. Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* 2005;68(2–3):276–84. DOI: 10.1159/000086784. PMID: 16015045.
 28. Kim R., Emi M., Tanabe K. et al. Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. *Cancer Res* 2006;66(11):5527–36. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4128. PMID: 16740684.
 29. Fricke I., Mirza N., Dupont J. et al. Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin Cancer Res* 2007;13(16):4840–8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0409. PMID: 17699863.
 30. Wang H., Zhang L., Zhang S. et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor by small interfering RNA upregulates differentiation, maturation and function of dendritic cells. *Exp Ther Med* 2015;9(1):120–4. DOI: 10.3892/etm.2014.2059. PMID: 25452786. PMCID: 4247311.
 31. Seeger P., Musso T., Sozzani S. The TGF-beta superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015;26(6):647–57. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.06.002. PMID: 26115564.
 32. Brown R.D., Pope B., Murray A. et al. Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80(B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood* 2001;98(10):2992–8. PMID: 11698282.
 33. Kel J.M., Girard-Madoux M.J., Reizis B. et al. TGF-beta is required to maintain the pool of immature Langerhans cells in the epidermis. *J Immunol* 2010;185(6):3248–55. DOI: 10.4049/jimmunol.1000981. PMID: 20713882.
 34. Lievens D., Habets K.L., Robertson A.K. et al. Abrogated transforming growth factor beta receptor II (TGFbetaRII) signalling in dendritic cells promotes immune reactivity of T cells resulting in enhanced atherosclerosis. *Eur Heart*

- J 2013;34(48):3717–27.
DOI: 10.1093/eurheartj/ehs106.
PMID: 22613345. PMCID: 3869966.
35. Ito M., Minamiya Y., Kawai H. et al. Tumor-derived TGFbeta-1 induces dendritic cell apoptosis in the sentinel lymph node. *J Immunol* 2006; 176(9):5637–43. PMID: 16622033.
 36. Song S., Yuan P., Wu H. et al. Dendritic cells with an increased PD–L1 by TGF-beta induce T cell anergy for the cytotoxicity of hepatocellular carcinoma cells. *Int Immunopharmacol* 2014;20(1):117–23.
DOI: 10.1016/j.intimp.2014.02.027. PMID: 24606770.
 37. Zhou Z., Li W., Song Y. et al. Growth differentiation factor-15 suppresses maturation and function of dendritic cells and inhibits tumor-specific immune response. *PLoS One* 2013;8(11):e78618.
DOI: 10.1371/journal.pone.0078618. PMID: 24236027. PMCID: PMC3827235.
 38. Smith D.R., Kunkel S.L., Burdick M.D. et al. Production of interleukin-10 by human bronchogenic carcinoma. *Am J Pathol* 1994;145(1):18–25.
PMID: 8030748. PMCID: 1887307.
 39. Gu Z.J., Costes V., Lu Z.Y. et al. Interleukin-10 is a growth factor for human myeloma cells by induction of an oncostatin M autocrine loop. *Blood* 1996;88(10):3972–86.
PMID: 8916964.
 40. Kim K.D., Lim H.Y., Lee H.G. et al. Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;338(2):1126–36.
DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.10.065. PMID: 16259956.
 41. Beckebaum S., Zhang X., Chen X. et al. Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res* 2004;10(21):7260–9.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0872. PMID: 15534100.
 42. Williams L.M., Ricchetti G., Sarma U. et al. Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation—a continuing puzzle. *Immunology* 2004;113(3):281–92.
DOI: 10.1111/j.1365-2567.2004.01988.x. PMID: 15500614. PMCID: 1782589.
 43. Shurin M.R., Shurin G.V., Lokshin A. et al. Intratumoral cytokines/chemokines/growth factors and tumor infiltrating dendritic cells: friends or enemies? *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(3):333–56.
PMID: 17029028.
 44. Hirano T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int Rev Immunol*. 1998;16(3–4):249–84.
DOI: 10.3109/08830189809042997. PMID: 9505191.
 45. Nishio H., Yaguchi T., Sugiyama J. et al. Immunosuppression through constitutively activated NF-kappaB signalling in human ovarian cancer and its reversal by an NF-kappaB inhibitor. *Br J Cancer* 2014;110(12):2965–74.
DOI: 10.1038/bjc.2014.251. PMID: 24867687. PMCID: PMC4056060.
 46. Alshamsan A. Induction of tolerogenic dendritic cells by IL-6-secreting CT26 colon carcinoma. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2012;34(3):465–9.
DOI: 10.3109/08923973.2011.625034. PMID: 21999714.
 47. Oosterhoff D., Lougheed S., van de Ven R. et al. Tumor-mediated inhibition of human dendritic cell differentiation and function is consistently counteracted by combined p38 MAPK and STAT3 inhibition. *Oncoimmunology* 2012;1(5):649–58.
DOI: 10.4161/onci.20365. PMID: 22934257. PMCID: PMC3429569.
 48. Yang L., Wu Q., Xu L. et al. Increased expression of colony stimulating factor-1 is a predictor of poor prognosis in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 2015;15:67.
DOI: 10.1186/s12885-015-1076-5. PMID: 25886010. PMCID: PMC4339479.
 49. Lin E.Y., Gouon-Evans V., Nguyen A.V. et al. The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2002;7(2):147–62.
PMID: 12465600.
 50. Demoulin S.A., Somija J., Duray A. et al. Cervical(pre) neoplastic microenvironment promotes the emergence of tolerogenic dendritic cells via RANKL secretion. *Oncoimmunology* 2015;4(6):e1008334.
DOI: 10.1080/2162402X.2015.1008334. PMID: 26155412. PMCID: PMC4485731.
 51. Perrot I., Blanchard D., Freymond N. et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 2007;178(5):2763–9.
PMID: 17312119.
 52. Zou W., Machelon V., Coulomb-L'Hermin A. et al. Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med* 2001;7(12):1339–46.
PMID: 11726975.
 53. Hargadon K.M., Bishop J.D., Brandt J.P. et al. Melanoma-derived factors alter the maturation and activation of differentiated tissue-resident dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2016;94(1):24–38.
DOI: 10.1038/icb.2015.58. PMID: 26010746.
 54. Aalamian M., Tourkova I.L., Chatta G.S. et al. Inhibition of dendropoiesis by tumor derived and purified prostate specific antigen. *J Urol* 2003;170(5):2026–30.
PMID: 14532846.
 55. Aalamian-Matheis M., Chatta G.S., Shurin M.R. et al. Inhibition of dendritic cell generation and function by serum from prostate cancer patients: correlation with serum-free PSA. *Adv Exp Med Biol* 2007;601:173–82.
PMID: 17713004.
 56. Pillai K., Pourgholami M.H., Chua T.C. et al. MUC1 as a potential target in anticancer therapies. *Am J Clin Oncol* 2015;38(1):108–18.
DOI: 10.1097/COC.0b013e31828f5a07. PMID: 23608828.
 57. Carlos C.A., Dong H.F., Howard O.M. et al. Human tumor antigen MUC1 is chemotactic for immature dendritic cells and elicits maturation but does not promote Th1 type immunity. *J Immunol* 2005;175(3):1628–35. PMID: 16034102.
 58. Rughetti A., Pellicciotta I., Biffoni M. et al. Recombinant tumor-associated MUC1 glycoprotein impairs the differentiation and function of dendritic cells. *J Immunol* 2005;174(12):7764–72.
PMID: 15944279.
 59. Ueno A., Cho S., Cheng L. et al. Transient upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by human chorionic gonadotropin downregulates autoimmune diabetes. *Diabetes* 2007;56(6):1686–93.
DOI: 10.2337/db06-1727. PMID: 17360980.
 60. Hwu P., Du M.X., Lapointe R. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000;164(7):3596–9.
DOI: j_i_v164n7p3596[pil]. PMID: 10725715.
 61. Palmano K., Rowan A., Guillermo R. et al. The role of gangliosides in neurodevelopment. *Nutrients* 2015;7(5):3891–913.
DOI: 10.3390/nu7053891. PMID: 26007338. PMCID: PMC4446785.
 62. Shurin G.V., Shurin M.R., Bykovskaia S. et al. Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res* 2001;61(1):363–9. PMID: 11196188.

63. Peguet-Navarro J., Sportouch M., Popa I. et al. Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol* 2003;170(7):3488–94. PMID: 12646609.
64. Bennaceur K., Popa I., Chapman J.A. et al. Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology* 2009;19(6):576–82. DOI: 10.1093/glycob/cwp015. PMID: 19240275. PMID: PMC2682607.
65. Pugh S., Thomas G.A. Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994;35(5):675–8. PMID: 8200564. PMID: PMC1374755.
66. Sombroek C.C., Stam A.G., Masterson A.J. et al. Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol* 2002;168(9):4333–43. PMID: 11970975.
67. TrabANELLI S., Lecciso M., Salvestrini V. et al. PGE2-induced IDO1 inhibits the capacity of fully mature DCs to elicit an in vitro antileukemic immune response. *J Immunol Res* 2015;2015:253191. DOI: 10.1155/2015/253191. PMID: 25815345. PMID: PMC4357138.
68. Schipper R.G., Romijn J.C., Cuijpers V.M. et al. Polyamines and prostatic cancer. *Biochem Soc Trans* 2003;31(2):375–80. DOI: 10.1042/bst0310375. PMID: 12653642.
69. Erbas H., Bal O., Cakir E. Effect of rosuvastatin on arginase enzyme activity and polyamine production in experimental breast cancer. *Balkan Med J* 2015;32(1):89–95. DOI: 10.5152/balkanmedj. 2015.15611. PMID: 25759778. PMID: PMC4342145.
70. Della Bella S., Gennaro M., Vaccari M. et al. Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* 2003;89(8):1463–72. PMID: 14562018.
71. Doherty J.R., Cleveland J.L. Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *J Clin Invest* 2013;123(9):3685–92. DOI: 10.1172/JCI69741. PMID: 23999443. PMID: PMC3754272.
72. Gottfried E., Kunz-Schughart L.A., Ebner S. et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 2006;107(5):2013–21. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1795. PMID: 16278308.
73. Nasi A., Fekete T., Krishnamurthy A. et al. Dendritic cell reprogramming by endogenously produced lactic acid. *J Immunol* 2013;191(6):3090–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1300772. PMID: 23956421.
74. Vaupel P., Mayer A. Hypoxia-Driven Adenosine Accumulation: A Crucial Microenvironmental Factor Promoting Tumor Progression. *Adv Exp Med Biol* 2016;876:177–83. DOI: 10.1007/978-1-4939-3023-4_22. PMID: 26782210.
75. Liang D., Zuo A., Shao H. et al. A2B adenosine receptor activation switches differentiation of bone marrow cells to a CD11c(+) Gr-1(+) dendritic cell subset that promotes the Th17 response. *Immun Inflamm Dis* 2015;3(4):360–73. DOI: 10.1002/iid3.74. PMID: 26734458. PMID: PMC4693722.
76. Novitskiy S.V., Ryzhov S., Zaynagetdinov R. et al. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* 2008;112(5):1822–31. DOI: 10.1182/blood-2008-02-136325. PMID: 18559975. PMID: PMC2518889.
77. Dong H., Bullock T.N. Metabolic influences that regulate dendritic cell function in tumors. *Front Immunol* 2014;5:24. DOI: 10.3389/fimmu. 2014.00024. PMID: 24523723. PMID: PMC3906600.
78. Herber D.L., Cao W., Nefedova Y. et al. Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat Med* 2010;16(8):880–6. DOI: 10.1038/nm. 2172. PMID: 20622859. PMID: PMC2917488.
79. Gardner J.K., Mamotte C.D., Patel P. et al. Mesothelioma tumor cells modulate dendritic cell lipid content, phenotype and function. *PLoS One* 2015;10(4):e0123563. DOI: 10.1371/journal.pone.0123563. PMID: 25886502. PMID: PMC4401725.
80. Gao F., Liu C., Guo J. et al. Radiation-driven lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Sci Rep* 2015;5:9613. DOI: 10.1038/srep09613. PMID: 25923834. PMID: PMC4413852.
81. Cubillos-Ruiz J.R., Silberman P.C., Rutkowski M.R. et al. ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell* 2015;161(7):1527–38. DOI: 10.1016/j. cell. 2015.05.025. PMID: 26073941. PMID: PMC4580135.
82. Wu R., Zhang Q.H., Lu Y.J. et al. Involvement of the IRE1alpha-XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA Cell Biol* 2015;34(1):6–18. DOI: 10.1089/dna.2014.2552. PMID: 25216212. PMID: PMC4281841.
83. Scanlon C.S., Banerjee R., Inglehart R.C. et al. Galanin modulates the neural niche to favour perineural invasion in head and neck cancer. *Nat Commun* 2015;6:6885. DOI: 10.1038/ncomms7885. PMID: 25917569. PMID: PMC4476386.
84. Coveñas R., Muñoz M. Cancer progression and substance P. *Histol Histopathol* 2014;29(7):881–90. PMID: 24535838.
85. Voedisch S., Rochlitz S., Veres T.Z. et al. Neuropeptides control the dynamic behavior of airway mucosal dendritic cells. *PLoS One* 2012;7(9):e45951. DOI: 10.1371/journal. pone. 0045951. PMID: 23049899. PMID: PMC3458805.
86. Gilaberte Y., Roca M.J., Garcia-Prats M.D. et al. Neuropeptide Y expression in cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2012;66(6):e201–8. DOI: 10.1016/j. jaad. 2011.02.015. PMID: 21620518.
87. Buttari B., Profumo E., Domenici G. et al. Neuropeptide Y induces potent migration of human immature dendritic cells and promotes a Th2 polarization. *FASEB J* 2014;28(7):3038–49. DOI: 10.1096/fj. 13–243485. PMID: 24699455.
88. Makarenkova V.P., Shurin G.V., Tourkova I.L. et al. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells. *J Neuroimmunol* 2003;145(1–2):55–67. PMID: 14644031.
89. DeRosa D.C., Ryan P.J., Okragly A. et al. Tumor-derived death receptor 6 modulates dendritic cell development. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(6):777–87. DOI: 10.1007/s00262-007-0413-1. PMID: 17962943.
90. Valenti R., Huber V., Filipazzi P. et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res*

- 2006;66(18):9290–8.
DOI:10.1158/0008–5472.CAN-06–1819. PMID: 16982774.
91. Huang S.H., Li Y., Zhang J. et al. Epidermal growth factor receptor-containing exosomes induce tumor-specific regulatory T cells. *Cancer Invest* 2013;31(5):330–5.
DOI: 10.3109/07357907.2013.789905. PMID: 23614656.
92. Ding G., Zhou L., Qian Y. et al. Pancreatic cancer-derived exosomes transfer miRNAs to dendritic cells and inhibit RFXAP expression via miR-212-3p. *Oncotarget* 2015;6(30):29877–88.
DOI: 10.18632/oncotarget.4924. PMID: 26337469.
93. Ring S., Pushkarevskaya A., Schild H. et al. Regulatory T cell-derived adenosine induces dendritic cell migration through the Epac-Rap1 pathway. *J Immunol* 2015;194(8):3735–44.
DOI: 10.4049/jimmunol.1401434. PMID: 25780038.
94. Feijoo E., Alfaro C., Mazzolini G. et al. Dendritic cells delivered inside human carcinomas are sequestered by interleukin-8. *Int J Cancer* 2005;116(2):275–81.
DOI: 10.1002/ijc.21046. PMID: 15800914.
95. Shurin M.R., Yurkovetsky Z.R., Tourkova I.L. et al. Inhibition of CD40 expression and CD40-mediated dendritic cell function by tumor-derived IL-10. *Int J Cancer* 2002;101(1):61–8.
DOI: 10.1002/ijc.10576. PMID: 12209589.
96. Schwarz A.M., Banning-Eichenseer U., Seidel K. et al. Impact of interleukin-10 on phenotype and gene expression during early monocyte differentiation into dendritic cells. *Anticancer Res* 2013;33(11):4791–8.
PMID: 24222115.
97. Lo A.S., Gorak-Stolinska P., Bachy V. et al. Modulation of dendritic cell differentiation by colony-stimulating factor-1: role of phosphatidylinositol 3'-kinase and delayed caspase activation. *J Leukoc Biol* 2007;82(6):1446–54.
DOI: 10.1189/jlb.0307142. PMID: 17855501.
98. Yang L., Yamagata N., Yadav R. et al. Cancer-associated immunodeficiency and dendritic cell abnormalities mediated by the prostaglandin EP2 receptor. *J Clin Invest* 2003;111(5):727–35.
DOI: 10.1172/JCI16492. PMID: 12618527. PMCID: PMC151895.
99. Stoitzner P., Green L.K., Jung J.Y. et al. Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2008;57(11):1665–73.
DOI: 10.1007/s00262-008-0487-4. PMID: 18311487.
100. Teicher B.A., Fricker S.P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16(11):2927–31.
DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-09–2329. PMID: 20484021.

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОХИМИОТЕРАПИИ И ХИМИОТЕРАПИИ ПРИ ФОЛЛИКУЛЯРНОЙ ЛИМФОМЕ

Н.А. Фалалеева

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

Контакты: Наталья Александровна Фалалеева falaleeva-n@mail.ru

Введение. Иммунохимиотерапия (ИХТ) занимает все более прочные позиции в лечении фолликулярной лимфомы (ФЛ). Наиболее хорошо изученным и длительно применяемым иммунотерапевтическим препаратом является ритуксимаб, моноклональное антитело к антигену CD20. В отделении химиотерапии гемобластозов накоплен большой опыт лечения больных ФЛ с использованием ритуксимаба. В статье охарактеризованы исходы ФЛ в зависимости от выбранного в дебюте заболевания метода лечения – полихимиотерапии (ПХТ) или ИХТ.

Цель исследования – изучение эффективности добавления ритуксимаба к стандартным режимам ПХТ.

Материалы и методы. В анализ включены 286 больных ФЛ. У 125 (44 %) из них в качестве первой линии лекарственной терапии проводилась ПХТ. У 161 (56 %) пациента к комбинации цитостатических химиопрепаратов добавляли ритуксимаб. Статистический анализ общей выживаемости (ОВ) и выживаемости без прогрессирования (ВБП) больных проводился по методике Каплана–Майера. Анализ непосредственных и отдаленных результатов терапии проведен с учетом международных стандартизованных критериев ответа на лечение при неходжкинских лимфомах. Статистическая обработка результатов исследования проводилась с использованием программы SPSS 22.0 for Windows.

Результаты. Непосредственные результаты лечения оказались достоверно лучшими в группе ИХТ, $p = 0,002$. При проведении однофакторного анализа получены данные о достоверном положительном влиянии добавления ритуксимаба как на ОВ, так и на ВБП. Однако анализируемые группы оказались несопоставимы по ряду признаков. При проведении многофакторного анализа отмечены достоверные преимущества добавления ритуксимаба к ПХТ в виде улучшения ВБП, $p = 0,000$; достоверного влияния на сроки жизни больных ФЛ не отмечено ($p = 0,44$). Добавление ритуксимаба не оказывало существенного положительного влияния на сроки жизни и ВБП у больных ($n = 88$; 31 %) с нетипичным течением ФЛ (отсутствие ответа на терапию первой линии и развитие ранних рецидивов). Указанные клинические ситуации нуждаются в дальнейшем изучении.

Выводы. Добавление ритуксимаба к схемам ПХТ у больных ФЛ существенно улучшает результаты лечения. Как показал многофакторный анализ, именно ИХТ явилась решающим фактором благоприятного прогноза, улучшающим ВБП у больных ФЛ. Ритуксимаб не влиял на ОВ больных, на показатели выживаемости у больных с рефрактерным течением ФЛ, а также у больных с ранними рецидивами ФЛ.

Ключевые слова: ритуксимаб, фолликулярная лимфома, полихимиотерапия, иммунохимиотерапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-24-31

COMPARISON IMMUNOCHEMOTHERAPY AND CHEMOTHERAPY EFFICACY IN FOLLICULAR LYMPHOMA

N.A. Falaleeva

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

Introduction. Immunotherapy is an obligate component in treatment of follicular lymphoma (FL). Monoclonal antibodies to CD20 antigen is the most well studied and frequently used drug. Chemotherapy department of Russian Cancer Research Center has a very good experience in FL treatment using rituximab. In the article we characterize and compare two methods of treatment of FL – polychemotherapy vs chemotherapy.

Materials and methods. 286 patients with FL were included into analysis. In 125 (44 %) from 286 patients polychemotherapy was used as a first line of FL treatment. In 161 (56 %) patients rituximab was added to chemotherapy regimens. Analysis of survival and disease-free survival was done according to Kaplan–Meier. Analysis of treatment results has been done according to international criteria of treatment response in non-Hodgkin's lymphomas. In statistical calculations SPSS program for Windows was used.

Results. Responses to treatment were significantly better in immunotherapy group of patients, $p = 0,002$. In unifactorial analysis rituximab significantly improved both overall and disease-free survival. Taking in mind that groups of patients receiving chemotherapy and immunotherapy were not completely identical we performed multifactorial analysis, Cox regression analysis. In that case (Cox regression analysis) significant advantages of immunotherapy were noted in improving disease-free survival in FL patients

($p = 0,000$); significant influence on overall survival was not noted ($p = 0,44$). Addition of rituximab did not improved overall and disease-free survival in a group ($n = 88$; 31 %) of refractory and early relapsing FL.

Conclusion. Addition of rituximab to polychemotherapy in FL patients significantly improved treatment results. In multifactorial analysis immunochemotherapy was the most important prognostic factors of favourable prognosis of disease-free survival. In that analysis rituximab did not influenced on overall survival and on survival in refractory and early relapsing FL.

Key words: rituximab, follicular lymphoma, polychemotherapy, immunochemotherapy

Введение

Ритуксимаб – химерное анти-CD20-моноклональное антитело (МКА) – один из самых хорошо изученных иммунотерапевтических препаратов, применяемых при фолликулярной лимфоме (ФЛ). Механизмы действия ритуксимаба включают запуск антителозависимой клеточной цитотоксичности, комплементзависимой цитотоксичности, а также замедление опухолевого роста, повреждение клеточного цикла и апоптоз вследствие прямого связывания с антигеном CD20 [1]. Кроме того, при исследовании *in vitro* показано, что ритуксимаб повышает чувствительность опухолевых клеток к воздействию некоторых цитостатиков, а именно: циклофосфана, винкристина, доксорубина и преднизолона [2].

Ритуксимаб стал первым моноклональным антителом, одобренным для применения в онкологии в 1997 г. Эффективность доказана более чем в 300 исследованиях III фазы. Так, общий ответ на монотерапию препаратом ритуксимаб в качестве индукционного лечения ФЛ составляет 50 % [3–6]. Медиана выживаемости без прогрессирования (ВБП) и продолжительности ответа у ответивших на лечение больных составила 13 и 12 мес соответственно.

В начале 2000-х годов было проведено 4 крупных рандомизированных исследования [7–10], которые

показали преимущество добавления ритуксимаба к стандартной химиотерапии у первичных больных ФЛ. Это преимущество сохранялось при оценке отдаленных результатов лечения, независимо от метода полихимиотерапии (ПХТ). При этом добавление ритуксимаба позволило увеличить 4-летнюю общую выживаемость (ОВ) больных ФЛ на 10 %, в первую очередь больных с высоким индексом FLIPI (Follicular lymphoma international prognostic index) (табл. 1).

На основании многолетнего опыта нашей клиники нами проведено собственное исследование. Ниже изложены результаты анализа лечения 286 больных ФЛ.

Материалы и методы

Работа выполнена в НИИ клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России. Охарактеризованы исходы ФЛ в зависимости от выбранного в дебюте заболевания метода лечения 286 больных, которые проходили обследование и лечение в отделении химиотерапии гемобластозов НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в период с января 1989 г. по январь 2016 г.

Анализ показателей ОВ и ВБП проведен у 239 больных.

Таблица 1. Результаты наиболее крупных рандомизированных исследований эффективности добавления ритуксимаба к стандартным режимам ПХТ

Исследование	Режим лечения		Значение p
	СНОР ($n = 205$)	R-СНОР ($n = 223$)	
Хиддемманн (Hiddemann), 2005 Эффективность лечения Время до признания неэффективности лечения Общая выживаемость (2 года)	90 % 31 мес 90 %	96 % Не достигнуто 95 %	$p = 0,011$ $p < 0,0001$ $p = 0,016$
Маркус (Marcus), 2007 Эффективность лечения Время до признания неэффективности лечения Общая выживаемость (4 года)	CVP ($n = 159$) 57 % 7 мес 71 %	R-CVP ($n = 162$) 81 % 34 мес 81 %	$p < 0,0001$ $p < 0,0001$ $p = 0,029$
Херольд (Herold), 2007 Эффективность лечения Время до признания неэффективности лечения Общая выживаемость (4 года)	MCP ($n = 96$) 75 % 19 мес 74 %	R-MCP ($n = 105$) 92 % Не достигнуто 87 %	$p < 0,001$ $p < 0,0001$ $p = 0,016$
Саллес (Salles), 2008 Эффективность лечения Время до признания неэффективности лечения Общая выживаемость (4 года)	CHVP/IFN- α ($n = 183$) 85 % Не достигнуто 79 %	R-CHVP/IFN- α ($n = 175$) 94 % Не достигнуто 84 %	$p < 0,0001$ $p < 0,0001$ Высокий риск по FLIPI (!)

Диагноз ФЛ во всех случаях был верифицирован с помощью иммуногистохимического анализа биопсийного материала первичной опухоли. Морфологическая и иммуногистохимическая диагностика ФЛ проводилась в отделе патологической анатомии опухолей человека по результатам гистологического исследования опухолевой ткани с обязательным исследованием экспрессии CD20 в соответствии с критериями классификации опухолей кроветворной и лимфоидной тканей Всемирной организации здравоохранения 2008 г. [11].

Всем больным проведено общеклиническое обследование, включающее все современные общепринятые методы диагностики онкогематологических заболеваний. Для установления степени распространения опухолевого процесса использовали классификацию, принятую в Ann-Arbor (1971).

Статистический ОВ и ВБП больных был сделан по методике Каплана–Майера (1956).

Анализ непосредственных и отдаленных результатов терапии выполнен с учетом международных стандартизованных критериев ответа на лечение при неходжкинских лимфомах [12].

Для статистической обработки результатов исследования использовалась программа SPSS 22.0 for Windows.

Результаты и обсуждение

У 125 (44 %) из 286 больных ФЛ в качестве первой линии лекарственной терапии проводилась ПХТ: 75 (26,2 %) пациентов получали цикловую ПХТ COP/CVP (циклофосфан, винкристин, преднизолон), 28 (9,8 %) пациентов – СНОР (циклофосфан, винкристин, доксорубин, преднизолон), 4 (1,4 %) – режимы, содержащие флударабин (FC – флударабин, циклофосфан, FMC – флударабин, циклофосфан, митоксантрон), 18 (6,3 %) – LVPP и/или CIP (хлорамбуцил, винбластин, преднизолон, прокарбазин / хлорамбуцил, преднизолон).

У 161 (56 %) пациента к комбинации цитостатических химиопрепаратов добавляли ритуксимаб (иммунохимиотерапия, ИХТ) в стандартной дозе 375 мг/м² в 1-й день каждого цикла лечения либо накануне: 100 (35 %) больных получили ИХТ в режиме RCOP/RCVP, 51 (17,8 %) больной – RСНОР, 9 (3,1 %) – RB (ритуксимаб, бендамустин), 1 (0,3 %) – RMOVР (ритуксимаб, мелфалан, блеомицин, винкристин, преднизолон).

Характеристики больных в зависимости от метода лечения представлены в табл. 2.

Таблица 2. Распределение больных в зависимости от метода лечения

Метод	CVP/COP ± R, n (%)	СНОР ± R, n (%)	Другие, n (%)
ПХТ, n = 125	75 (60)	28 (22,5)	22 (17,5)
ИХТ, n = 161	100 (62)	51 (31,6)	10 (6,4)

За время наблюдения, которое составляло от 4 до 216 мес (медиана 48 мес), больным проведено от 1 до 10 курсов лечения (в среднем 5,7 курса).

Следствием применения ИХТ стало достижение 58,7 % полных и 21,7 % частичных ремиссий. У 7,2 % исходом первой линии терапии стала стабилизация проявлений ФЛ, у 12,3 % опухоль прогрессировала во время лечения или сразу после его окончания. Достоверно худшими оказались непосредственные результаты лечения у больных, получивших ПХТ, $p = 0,002$; достигнуто 34,6 % полных, 29,9 % частичных ремиссий, у 16,8 % больных отмечена стабилизация, у 18,7 % – прогрессирование ФЛ (табл. 3).

Таблица 3. Непосредственные результаты лечения

Терапия	Непосредственный эффект, n (%)			
	Полная ремиссия	Частичная ремиссия	Стабилизация	Прогрессирование
ПХТ	37 (34,6)	32 (29,9)	18 (16,8)	20 (18,7)
ИХТ	81 (58,7)	30 (21,7)	10 (7,2)	17 (12,3)
Всего	118 (48,2)	62 (25,3)	28 (11,4)	37 (15,1)

С начала эры ритуксимаба проведено множество исследований, посвященных сравнению отдаленных результатов применения ПХТ у больных ФЛ с добавлением ритуксимаба или без него. Мы провели собственное изучение.

При построении кривых ОВ достоверно больше оказались сроки жизни больных ФЛ, в лечении которых применяли ИХТ, различие статистически достоверно, $p = 0,039$ (рис. 1).

Драматически различались исходы лечения при анализе показателей ВБП (рис. 2). Медиана ВБП у больных ФЛ, которые в качестве первой линии лечения получили ПХТ, составила всего 20 мес (см. рис. 2). Различие статистически высокодостоверно, $p = 0,000$.

С целью определить сопоставимость 2 групп больных (в 1-й – в качестве терапии первой линии получали ПХТ, во 2-й – ИХТ) по клиническим, биохимическим и иммуноморфологическим признакам мы провели сравнительный анализ основных характеристик ФЛ и ее проявлений (табл. 4).

Возраст больных 1-й группы (ПХТ) варьировал от 23 до 82 лет, медиана 57 лет, во 2-й группе (ИХТ) медиана возраста равнялась 58 годам (от 26 до 85 лет). Число пациентов старше 60 лет в исследуемых группах достоверно не различалось – 43,5 и 33,3 % соответственно ($p = 0,077$). Соотношение мужчин и женщин также было сопоставимым с некоторым преобладанием женщин в обеих группах – 57,2 и 68,5 % соответственно ($p = 0,066$).

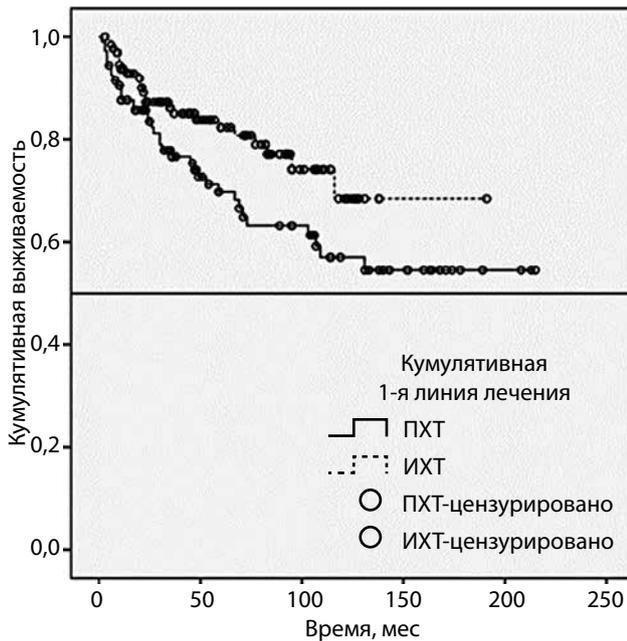


Рис. 1. ОВ больных ФЛ: ПХТ ($n = 106$) в сравнении с ИХТ ($n = 133$)

При анализе иммуноморфологических характеристик первичной экстрамедуллярной опухолевой ткани в обеих группах все 3 цитологических типа встречались приблизительно с одинаковой частотой: I цитологический тип – 36,8 и 28,1 % соответственно; II цитологический тип – 50,4 и 55,6 % соответственно; III – 15 и 16,3 % соответственно ($p = 0,296$). Не выявлено различий при анализе уровня пролиферативной активности опухоли – Ki67. Количество случаев с высоким ($> 30\%$) уровнем этого маркера достоверно не различалось ($p = 0,763$). При анализе иммунологических параметров опухолевых клеток в анализируемых группах частота экспрессии CD10 была выше в группе больных, которым в качестве терапии первой линии проводилась ИХТ, – 75,4 % против 49,5 % ($p = 0,000$). Экспрессия активационного антигена CD23 на опухолевых клетках определялась с одинаковой частотой – 39,6 и 33,1 % соответственно ($p = 0,312$).

В полученных ранее данных нашего исследования установлена высокодостоверная прогностическая роль присутствия в опухолевой ткани фолликулярных дендритных CD23-позитивных клеток (CD23⁺-ФДК). В данном случае получена достоверная разница в частоте экспрессии в опухолевой ткани CD23⁺-ФДК между изучаемыми группами: достоверно ниже CD23⁺-ФДК определялся в группе больных ФЛ, которым после постановки диагноза проводилась ПХТ: 78,2 % против 92,9 %, $p = 0,002$.

В соответствии с критериями FLIPI 3 и более факторов неблагоприятного прогноза определялись у 42,7 % ($n = 53$) больных 1-й группы и у 41 % ($n = 66$) 2-й группы. Равное соотношение обнаруживалось и в группе

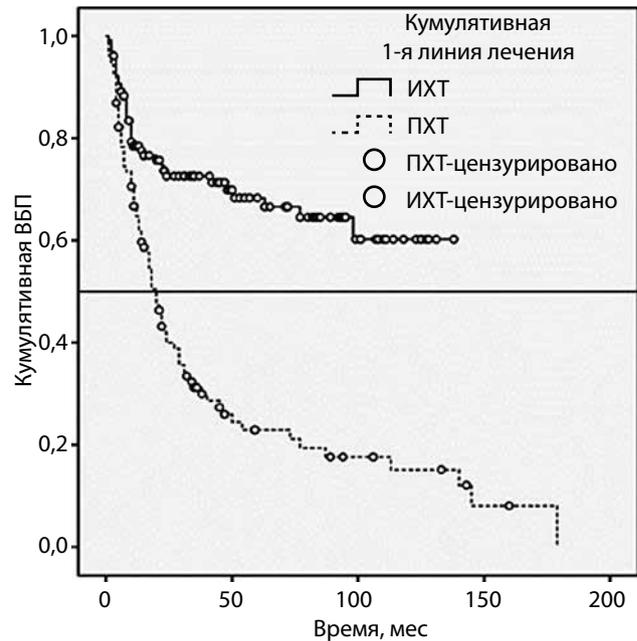


Рис. 2. ВБП больных ФЛ: ПХТ ($n = 106$) в сравнении с ИХТ ($n = 133$)

благоприятного прогноза по FLIPI: наличие 0–1 фактора наблюдалось с частотой 25 и 29,8 % соответственно ($p = 0,653$).

Распределение больных по стадиям в 2 группах также достоверно не различалось. У большинства больных ФЛ диагностировались распространенные (III и IV) стадии заболевания – 74,2 % против 77,2 % ($p = 0,561$).

При анализе общего состояния пациентов на момент определения тактики лечения по шкале ECOG PS 42,7 % больных 1-й группы и 32,1 % 2-й группы имели значительные соматические нарушения. Кажущееся различие недостоверно ($p = 0,064$).

Нами проанализирован ряд лабораторных параметров у больных ФЛ обеих групп. Уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ) оказался повышенным в дебюте заболевания у 37,1 % пациентов, составляющих 1-ю группу, во 2-й группе число больных, у которых уровень ЛДГ был более 450 Ед/л, оказалось меньшим – 25,5 %. Однако различие статистически достоверно ($p = 0,035$). Не отмечено достоверной разницы в частоте случаев снижения уровня общего белка в дебюте ФЛ – 16,7 и 12,7 % соответственно ($p = 0,357$).

При анализе гемограмм больных не выявлено различий в частоте случаев снижения уровня гемоглобина менее 120 г/л в 2 группах больных ($p = 0,163$). При этом поражение костного мозга, по данным морфологического исследования трепанобиоптатов подвздошных костей, устанавливалось с сопоставимой частотой – 40,3 и 39,5 % соответственно ($p = 0,889$).

Процент больных ФЛ, у которых при обследовании в дебюте лимфомы обнаруживалось опухолевое поражение лимфатических узлов в 4 и более зонах,

Таблица 4. Клинические характеристики больных анализируемых групп

Признак	Группа ПХТ (n = 125)	Группа ИХТ (n = 161)	Значение p
Возраст (диапазон), лет Медиана, лет > 60 лет, n (%)	23–82 56,1 54 (43,2)	26–85 56,2 54 (33,5)	0,077
Пол, n (%): мужской женский	54 (43,2) 71 (56,8)	51 (31,5) 110 (68,5)	0,066
Цитологический тип ФЛ, n (%): I II III	43 (36,8)* 59 (50,4)* 15 (12,8)*	43 (28,1)* 85 (55,6)* 25 (16,3)*	0,296
Характер роста, n (%): преобладание нодулярного преобладание диффузного	54 (52,9)* 48 (47,1)*	112 (77,2) 33 (22,8)	0,000
Частота экспрессии CD10, n (%)	46 (49,5)*	104 (75,4) *	0,000
Частота экспрессии CD23, n (%)	40 (39,6)*	40 (33,1) *	0,312
Частота экспрессии CD23-ФДК, n (%)	68 (78,2)*	105 (92,9) *	0,002
Ki-67 ≥ 30, n (%)	8 (40,0)*	48 (43,6) *	0,763
Риск по FLIP1, n (%): низкий промежуточный высокий	32 (25,6) 40 (32,0) 53 (42,4)	48 (29,8) * 47 (29,2) * 66 (41,0) *	0,653
Стадия, n (%): I–II III–IV	32 (25,6) 93 (74,4)	37 (23,0) 124 (77,0)	0,561
Оценка по шкале ECOG, n (%): 0–1 2–4	72 (57,6) 53 (42,4)	109 (67,7) 52 (32,3)	0,064
Повышение уровня ЛДГ, n (%)	46 (36,8)	41 (25,5)	0,035
Гемоглобин < 120 г/л, n (%)	42 (33,6)	42 (26,0)	0,163
Снижение уровня общего белка < 66 г/л, n (%)	20 (16,7)*	20 (12,7) *	0,357
Поражение костного мозга, n (%)	50 (40,0)	64 (39,7)	0,889
Число зон нодального поражения ≥ 4, n (%)	70 (56,0)	91 (56,5)	0,901
Поражение лимфатических узлов, n (%): выше диафрагмы по обе стороны диафрагмы	97 (77,6) 64 (51,2)	116 (72,0) 72 (44,7)	0,203 0,229
Опухолевые образования размерами > 6,0 см, n (%)	56 (44,8)	86 (53,4)	0,184
Количество зон экстрано- дального поражения > 1, n (%)	54 (43,2)	53 (32,9)	0,061
Поражение селезенки, n (%)	43 (34,4)	45 (27,9)	0,210
Поражение печени, n (%)	21 (16,8)	17 (10,6)	0,112
Поражение плевры, n (%)	12 (9,8) *	12 (7,5) *	0,499

*Процент среди обследованных.

был также сопоставим – 56,9 и 56,2 % соответственно ($p = 0,901$). Не отмечено достоверной разницы в частоте поражения лимфатических узлов различных локализаций (периферические, средостенные, забрюшинные, внутрибрюшинные), также равномерно часто обнаруживались опухолевые конгломераты размерами более 6 см – 45,2 и 53,1 % соответственно ($p = 0,184$).

Был проанализирован другой параметр, отражающий распространенность опухолевого процесса, когда диагностировалось поражение 2 и более экстранодальных органов. Такие клинические ситуации наблюдались сопоставимо часто в обеих группах: в 1-й группе больных – 43,5 %, во 2-й – 32,7 % ($p = 0,061$). Не выявлено различий в частоте поражения отдельных экстранодальных органов, по нашим данным, влияющих на прогноз ФЛ: селезенки ($p = 0,210$), печени ($p = 0,112$), плевры ($p = 0,499$).

Таким образом, при сопоставлении результатов первой линии системного противоопухолевого лечения больных ФЛ с применением цикловой ПХТ ± ритуксимаб были получены данные, аналогичные опубликованным ранее данным многочисленных исследований и подтвердившие достоверное преимущество ИХТ перед ПХТ. Однако в нашем случае группы случайно отобранных больных ФЛ не были сопоставимы по частоте повышения уровня ЛДГ, кроме того, выявлены достоверные различия при анализе частоты встречаемости прогностически значимых иммуноморфологических характеристик первичной опухоли: характера роста опухолевых клеток в экстрамедуллярном образце, уровня CD23⁺-ФДК

При проведении регрессионного анализа Кокса для определения влияния в этой выборке больных указанных параметров на показатели ОВ независимыми факторами оказались уровень ЛДГ ($p = 0,044$) и экспрессия CD23⁺-ФДК ($p = 0,02$); выбор терапии – ИХТ/ПХТ не оказался в этом числе, $p = 0,44$ (табл. 5).

Таблица 5. Многофакторный анализ (регрессия Кокса) и ОВ

Параметр	Значение p	Exp (В)
Лактатдегидрогеназа	0,044	1,430
Нодулярный/Диффузный	0,359	0,659
ИХТ/ПХТ	0,440	0,783
CD10	0,440	1,387
CD23 ⁺ -ФДК	0,022	3,087

Причем, если провести анализ функции выживания, исключив случаи повышения ЛДГ, различия между кривыми, отражающими сроки жизни больных ФЛ, получавших ПХТ или ИХТ, становятся

недостовверными ($p = 0,134$), что позволяет заключить: применение ИХТ в качестве первого лечения у большого ФЛ не оказывало достоверного влияния на сроки жизни больных.

Совершенно другая картина наблюдается при многофакторном анализе влияния этих параметров на показатели ВБП. Здесь независимыми факторами прогноза оказались: выбор метода лечения – ПХТ или ИХТ, с высоким уровнем достоверности $p = 0,000$, и экспрессия антигена CD23⁺-ФДК, $p = 0,024$ (табл. 6).

Таблица 6. Многофакторный анализ (регрессия Кокса) и ВБП

Параметр	Значение p	Exp (В)
ЛДГ	0,157	0,673
Нодулярный/Диффузный	0,832	0,938
ИХТ/ПХТ	0,000	3,363
CD10	0,651	0,882
CD23 ⁺ -ФДК	0,024	2,484

В нашем исследовании у 88 (31 %) больных не получено оптимального ответа на противоопухолевую терапию первой линии – ПХТ ($n = 59$) либо ИХТ ($n = 29$). У 41 больного течение лимфомы характеризовалось как агрессивное, все больные погибли от прогрессирования ФЛ в сроки менее чем 3 года от момента начала первой линии лечения. У 9 больных противоопухолевый ответ был получен после смены режима лечения. Ранее развитие рецидивов ФЛ наблюдалось у 38 больных, показатели ВБП составили менее чем 24 мес.

Интересен факт, что при построении кривых ОВ для данной группы показатели оказались худшими у больных, которым проводилась ИХТ в качестве терапии первой линии, по сравнению с больными, не получившими в составе лечения ритуксимаб, медианы 35 и 67 мес, полученные различия недостоверны, $p = 0,08$ (рис. 3).

При построении графика ВБП кривые, отражающие показатели, полностью совпадают (медианы 11 и 9 мес, $p = 0,9$).

ФЛ является 2-м по частоте иммуноморфологическим вариантом неходжкинской лимфомы. Обычно характеризуется длительным (десятилетиями), индолентным течением, и, несмотря на значительный прогресс в лечении, болезнь до сих пор считается неизлечимой [13–15]. Появление анти-CD20-моноклонального антитела и его широкое применение существенно изменило судьбы больных ФЛ, главным образом за счет увеличения периода клинического благополучия – ВБП. Преимущество добавления ритуксимаба к комбинированной химиотерапии до-

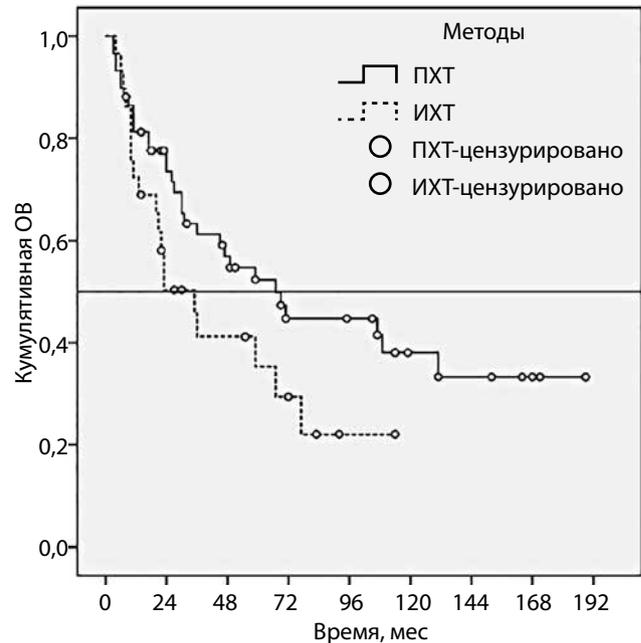


Рис. 3. ОВ больных ФЛ с нетипичным течением в зависимости от метода лечения (ПХТ, $n = 59$; ИХТ, $n = 29$)

казано в многочисленных рандомизированных исследованиях, в которых продемонстрировано улучшение частоты ответа, ВБП [7–10, 16]. В некоторых из них показано достоверное увеличение сроков жизни больных [6–8, 16, 17].

По данным анализа 30-летнего клинического опыта НИИ КО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», применение ИХТ у больных ФЛ имеет достоверные преимущества перед ПХТ, и различие касается в первую очередь влияния на показатели ВБП ($p = 0,000$ при многофакторном анализе – регрессии Кокса). При этом использование ИХТ в качестве первого лечения не оказывает достоверного влияния на сроки жизни больных ($p = 0,44$ при многофакторном анализе).

Как до «эры ритуксимаба», так и в настоящее время у 10–15 % первичных больных ФЛ протекает нетипично – наблюдается быстрое прогрессирование, отсутствие ответа на противоопухолевое лечение первой линии, а в ряде случаев – рефрактерность, больные в сроки 1,5–2 года после установления диагноза умирают [18]. Еще приблизительно у 20 % больных лимфома рецидивирует в сроки менее чем через 2 года после начала терапии первой линии [19–21]. Причем половина из них имеют риск погибнуть в течение 5 лет с момента подтверждения диагноза ФЛ [22]. Таким образом, у приблизительно 35 % больных ФЛ наблюдается «неиндолентное» течение заболевания.

По нашим данным, такие клинические ситуации отмечались в 31 % наблюдений. Есть основания полагать, что добавление к режимам ПХТ ритуксимаба в этих случаях не оказывает существенного положительного

влияния ни на сроки жизни больных, ни на ВБП. Эта терапевтическая проблема не решена до настоящего времени. Полагаем, что выход за пределы ограничительных рамок международных прогностических конструкций ФЛ сможет приблизить клиницистов к решению сложной задачи индивидуализации (персонализации) противоопухолевого лечения.

Заключение

Проведен сравнительный анализ результатов лечения у 286 больных ФЛ – методом ПХТ ($n = 125$) и ИХТ ($n = 161$). При проведении ИХТ к комбинации цитостатических химиопрепаратов добавлялся ритуксимаб.

Непосредственные результаты лечения оказались достоверно лучшими в группе ИХТ: частота достижения полных ремиссий была достоверно выше в группе ИХТ, стабилизация опухоли и прогрессирование во время лечения или сразу после его окончания достоверно чаще встречались в группе ПХТ, $p = 0,002$.

При проведении однофакторного анализа получены данные о достоверном положительном влиянии

добавления ритуксимаба как на ОВ, так и на безрецидивную выживаемость. При этом отмечено, что по ряду признаков группы не были сопоставимы. Это послужило основанием для проведения многофакторного анализа, регрессионного анализа Кокса. При многофакторном анализе наиболее информативными признаками, влияющими на ОВ больных ФЛ, явились наличие в опухолевой ткани ФДК ($p = 0,02$) и повышение уровней лактатдегидрогеназы ($p = 0,044$). Метод лечения (ПХТ в сравнении с ИХТ) не имел существенного влияния на ОВ больных ($p = 0,44$).

Вместе с тем при проведении многофакторного анализа выявлены достоверные преимущества добавления ритуксимаба к ПХТ в виде улучшения ВБП, $p = 0,000$.

Добавление ритуксимаба не оказывало существенного положительного влияния на сроки жизни больных и ВБП у больных с нетипичным течением ФЛ (отсутствие ответа на терапию первой линии и развитие ранних рецидивов). Описанные клинические ситуации нуждаются в дальнейшем изучении.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Singh V., Gupta D., Almasan A. Development of Novel Anti-Cd20 Monoclonal Antibodies and Modulation in Cd20 Levels on Cell Surface: Looking to Improve Immunotherapy Response. *J Cancer Sci Ther* 2015;7(11):347–58. DOI: 10.4172/1948–5956.1000373. PMID: 27413424. PMCID: PMC4939752.
- Pfreundschuh M., Trumper L., Osterborg A. et al. MabThera International Trial, CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MInT) Group. *The Lancet. Oncology* 2006;7(5):379–91. DOI: 10.1016/S1470–2045(06)70664–7. PMID: 16648042.
- McLaughlin P., Grillo Lopez A.J., Link B.K. et al. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 1998;16(8):2825–33. DOI: 10.1200/jco.1998.16.8.2825. PMID: 9704735.
- Davis T.A., White C.A., Grillo-López A.J. et al. Single-agent monoclonal antibody efficacy in bulky non-Hodgkin's lymphoma: results of a phase II trial of rituximab. *J Clin Oncol* 1999;17(6):1851–7. DOI: 10.1200/jco.1999.17.6.1851. PMID: 10561225.
- Foran J.M., Gupta R.K., Cunningham D. et al. A UK multicentre phase II study of rituximab (chimaeric anti-CD20 monoclonal antibody) in patients with follicular lymphoma, with PCR monitoring of molecular response. *Br J Haematol* 2000;109(1):81–8. PMID: 10848785.
- Hainsworth J.D., Litchy S., Shaffer D.W. et al. Maximizing therapeutic benefit of rituximab: maintenance therapy versus re-treatment at progression in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma a randomized phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* 2005;23(6):1088–95. DOI: 10.1200/JCO.2005.12.191. PMID: 15657401.
- Hiddemann W., Kneba M., Dreyling M. et al. Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2005;106(12):3725–32. DOI: 10.1182/blood-2005-01-0016. PMID: 16123223.
- Herold M., Haas A., Srock S. et al. Rituximab added to first-line mitoxantrone, chlorambucil, and prednisolone chemotherapy followed by interferon maintenance prolongs survival in patients with advanced follicular lymphoma: an East German Study Group Hematology and Oncology Study. *J Clin Oncol* 2007;25(15):1986–92. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.4618. PMID: 17420513.
- Marcus R., Imrie K., Solal-Celigny P. et al. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2008;26(28):4579–86. DOI: 10.1200/JCO.2007.13.5376. PMID: 18662969.
- Salles G., Mounier N., De Guibert S. et al. Rituximab combined with chemotherapy and interferon in follicular lymphoma patients: results of the GELA-GOELAMS FL2000 study. *Blood* 2008;112(13):4824–31. DOI: 10.1182/blood-2008-04-153189. PMID: 18799723.
- Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L. et al. (Eds.) WHO classification

- of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Press, 2008.
12. Cheson B.D., Horning S.J., Coiffier B. et al. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. *J Clin Oncol* 1999;17(4):1244. DOI: 10.1200/jco.1999.17.4.1244. PMID: 10561185.
 13. Armitage J.O., Weisenburger D.D. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol* 1998;16:2780–95. DOI: 10.1200/jco.1998.16.8.2780. PMID: 9704731.
 14. Horning S.J., Rosenberg S.A. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas. *N Engl J Med* 1984;311(23):1471–75. DOI: 10.1056/NEJM198412063112303. PMID: 6548796.
 15. Friedberg J.W., Taylor M.D., Cerhan J.R. et al. Follicular lymphoma in the United States: first report of the national LymphoCare study. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1202–08. DOI: 10.1200/JCO.2008.18.1495. PMID: 19204203. PMCID: PMC2738614.
 16. Marcus R., Imrie K., Belch A. et al. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 2005;105(4):1417–23. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3175. PMID: 15494430.
 17. Forstpointner R., Dreyling M., Repp R. et al. The addition of rituximab to a combination of fludarabine, cyclophosphamide, mitoxantrone [FCM] significantly increases the response rate and prolongs survival as compared with FCM alone in patients with relapsed and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 2004;104(10):3064–71. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1323. PMID: 15284112.
 18. Murakami S., Kato H., Higuchi Y. et al. Prediction of high risk for death in patients with follicular lymphoma receiving rituximab plus cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisolone in first-line chemotherapy. *J Ann Hematol* 2016; 95(8):1259–69. DOI: 10.1007/s00277-016-2690-2. PMID: 27220639.
 19. Rummel M.J., Niederle N., Maschmeyer G. et al. Bendamustine plus rituximab versus CHOP plus rituximab as first-line treatment for patients with indolent and mantle-cell lymphomas: An open-label, multicentre, randomised, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet* 2013;381(9873):1203–10. DOI: 10.1016/S0140-6736(12)61763-2. PMID: 23433739.
 20. Salles G., Seymour J.F., Offner F. et al. Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet* 2011;377(9759):42–51. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62175-7. PMID: 21176949.
 21. Fisher R.I., LeBlanc M., Press O.W. et al. New treatment options have changed the survival of patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2005;23(33):8447–52. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.1674. PMID: 16230674.
 22. Dave S.S., Wright G., Tan B. et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med* 2004;351:2159–69. DOI: 10.1056/NEJMoa041869. PMID: 15548776.

ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ЭКСПРЕССИИ АНДРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В РАЗЛИЧНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ТИПАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.А. Рябчиков¹, И.К. Воротников¹, Н.А. Козлов¹, Н.В. Чхиквадзе¹, К.С. Титов², А.С. Шушарин¹

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

²ГБУЗ Московский клинический научный центр ДЗМ; Россия, 111123 Москва, ш. Энтузиастов, 86

Контакты: Денис Анатольевич Рябчиков dr.denisr@mail.ru

Введение. В настоящее время данные литературы не отражают единого мнения о связи уровня андрогенов и их метаболитов в различных биологических жидкостях и тканях с развитием рака молочной железы (РМЖ). Как полагают многие исследователи, определение уровня андрогеновых рецепторов (АР) в опухоли у больных РМЖ способно открыть ряд перспективных направлений в изучении прогноза заболевания и поиске новых подходов в эндокринной терапии различных молекулярных подтипов РМЖ.

Цель исследования — оценка клинической и прогностической значимости иммуногистохимической экспрессии АР в различных молекулярных типах РМЖ.

Материалы и методы. В настоящей работе изучалась экспрессия АР в опухолевой ткани у пациентов с различными молекулярными типами РМЖ.

Результаты. Риск смерти у больных с АР-позитивным РМЖ на 88 % ниже, чем у больных с АР-негативными опухолями.

Заключение. Сделан вывод, что изучение экспрессии АР является перспективным направлением не только в оценке прогноза заболевания, но и при поиске дополнительных подходов к лечению РМЖ.

Ключевые слова: рак молочной железы, рецепторы андрогенов, факторы прогноза, молекулярный подтип

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-32-37

PROGNOSTIC VALUE OF EXPRESSION OF ANDROGENETIC RECEPTORS IN DIFFERENT MOLECULAR TYPES OF BREAST CANCER

D.A. Ryabchikov¹, I.K. Vorotnikov¹, N.A. Kozlov¹, N.V. Chkhikvadze¹, K.S. Titov², A.S. Shusharin¹

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

²Moscow Clinical Research Center; 86 Sh. Entuziastov, Moscow, 111123, Russia

Introduction. So far in the literature there is no consensus on the relationship between the level of androgens and their metabolites in various biological fluids and tissues with the development of breast cancer. As suggested by many researchers, determining the level of androgenetic receptors (AR) in the tumor in patients with breast cancer are able to access a number of promising directions in the study of prognosis of the disease and the search for new approaches to endocrine therapy of different molecular subtypes of breast cancer.

Objective. To evaluate the clinical and prognostic significance of the immunohistochemical expression of AR in different molecular types of breast cancer.

Materials and methods. In the present work we have studied the expression of AR in tumor tissue in patients of different molecular types of breast cancer.

Results. The risk of death in patients with AR-positive breast cancer is 88 % lower than in patients with AR-negative tumors.

Conclusion. It was concluded that the study of the expression of AR, is a promising direction not only in the assessment of the prognosis of the disease, but when searching for additional approaches to the treatment of breast cancer.

Key words: breast cancer, androgen receptor, prognostic factors, molecular subtype

Введение

Сегодня рак молочной железы (РМЖ) является одной из самых распространенных злокачественных опухолей в мире и в России. Так, в 2014 г. 18,2 % из всего объема злокачественных новообразований

составила именно эта патология [1]. В отечественной и зарубежной литературе в последнее время отмечается повышенный интерес к изучению экспрессии андрогеновых рецепторов (АР) при различных молекулярных типах РМЖ. В частности, было показано,

что эстрогены стимулируют, а андрогены угнетают развитие молочной железы вне зависимости от пола [2]. Кроме того, установлено, что AP являются важным элементом регуляции клеточных процессов в гормонально-зависимых тканях (предстательная железа, молочная железа и др.), и их исследование может позволить улучшить результаты лечения РМЖ, а также оптимизировать стратификацию больных по терапевтическим и прогностическим группам [2–5]. Однако в имеющихся публикациях нет единого мнения о влиянии уровня экспрессии AP на течение и прогноз заболевания, что указывает на необходимость их более пристального исследования с помощью молекулярно-биологических методов, в том числе с помощью иммуногистохимического (ИГХ) исследования. Актуальность проблемы обусловлена еще и тем, что существующие данные о связи AP-статуса опухоли с течением и прогнозом РМЖ носят весьма противоречивый характер, при этом преобладает мнение о том, что у пациенток с AP-позитивными опухолями прогноз заболевания является более благоприятным. В этой связи становится понятной необходимость дальнейшего изучения экспрессии AP в различных молекулярных типах РМЖ [6–9].

Цель исследования – оценить клиническую и прогностическую значимость ИГХ-экспрессии AP в различных молекулярных типах РМЖ.

Материалы и методы

Настоящая работа основана на анализе ретроспективных данных комплексного обследования и лечения 70 пациенток, страдающих РМЖ, наблюдавшихся и получавших лечение в отделениях ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина». Среднее время наблюдения за больными составило $87,9 \pm 47,4$ мес (от 3,4 до 179,2 мес, медиана – 87,9 мес). Возраст пациенток варьировал от 32 до 79 лет (средний возраст $54,4 \pm 11,5$ года, медиана – 55 лет). Распределение пациенток в зависимости от вида проводимого лечения представлено на рис. 1.

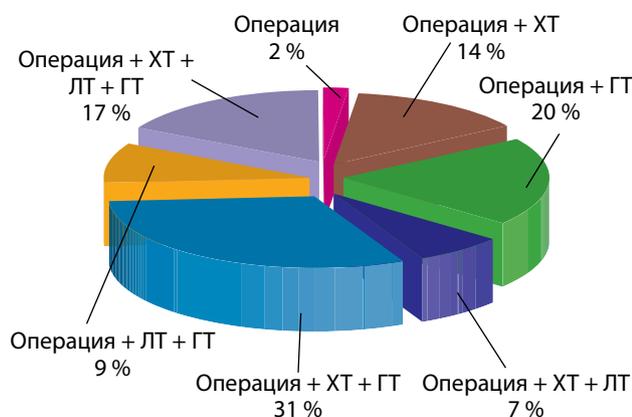


Рис. 1. Характеристика видов лечения РМЖ

Из рис. 1 видно, что большинство пациенток – 68 (97 %) – получали комбинированное или комплексное лечение: химио-, гормоно-, лучевую терапию; 2 (3 %) больных были пролечены только хирургическим методом.

Всем пациенткам на материале удаленной опухоли выполнены рутинное гистологическое и ИГХ-исследование. Во всех случаях одним морфологом был проведен пересмотр гистологических препаратов операционного материала, хранящихся в архиве патологоанатомического отделения: проведено уточнение гистологического типа опухоли и степени дифференцирования в соответствии с действующей Классификацией опухолей молочной железы ВОЗ (2013). Во всех случаях сделано ИГХ-исследование экспрессии AP, эстрогеновых рецепторов (ЭР) и прогестерона (ПР), эпидермального фактора роста 2-го типа (Her2/neu) и пролиферативной активности опухоли (индекс Ki-67).

ИГХ-исследование и интерпретация результатов.

Исследование выполнялось на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к рецепторам E ЭР α (SP1, Cell Marque), ПР (SP42, Cell Marque), AP (F39.4.1, Biogenex), Her2/neu (Herceptest, Dako) и Ki-67 (MIB1, Dako). Срезы толщиной 3–4 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Оценка реакции гормональных рецепторов проводилась в опухоли полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антиген-позитивных клеток, согласно методике Allred и соавт. [10]. В связи с отсутствием установленных пороговых значений для оценки экспрессии AP в опухолях молочной железы, результаты экспрессии были оценены по схеме Allred, применяемой для рецепторов эстрогенов и прогестерона.

В табл. 1 представлено распределение пациенток в зависимости от уровня экспрессии AP в баллах.

Таблица 1. Уровень экспрессии AP в баллах в инвазивном РМЖ

Число пациенток	Показатель, %	Сумма баллов
6	8,6	0
2	2,9	2
1	1,4	3
5	7,1	4
4	5,7	5
12	17,1	6
33	47,2	7
7	10,0	8

Таблица 2. Клинико-морфологические характеристики РМЖ в зависимости от уровня андрогенов

Показатель	Градация	AP-негативные (n = 6)		AP-позитивные (n = 64)		Всего (n = 70)	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%
Стадия	I	1	16,7	25	39,0	26	37,1
	IIa	1	16,7	12	18,8	13	18,6
	IIb	1	16,7	14	21,9	15	21,4
	IIIa	2	33,2	8	12,5	10	14,3
	IIIb	1	16,7	3	4,7	4	5,7
	IV	–	–	2	3,1	2	2,9
Гистология	НСТ*	6	100	55	86,0	61	87,1
	дольковый	–	–	2	3,1	2	2,9
	смешанный	–	–	5	7,8	5	7,1
	редкие формы	–	–	2	3,1	2	2,9
Степень злокачественности	I степень	–	–	10	15,6	10	14,3
	II степень	2	33,3	35	54,7	37	52,9
	III степень	4	66,7	18	28,1	22	31,4
	Cis	–	–	1	1,6	1	1,4

*Инвазивный рак неспецифического типа (в предыдущей классификации ВОЗ – инвазивный протоковый рак)

Как видно из табл. 1, наибольшее число пациентов – 33 (47,2 %) – имели уровень экспрессии AP 7 баллов, у остальных пациенток уровень экспрессии AP был меньше, при этом у 6 больных экспрессия AP не определялась (0 баллов).

С учетом уровня экспрессии AP в опухоли пациентки были разделены на 2 группы: AP-негативные (n = 6) и AP-позитивные (n = 64). Клинико-морфологические характеристики РМЖ в обеих исследуемых группах представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что наибольшее число пациентов – 26 (37,1 %) – имели I стадию заболевания. Из морфологических форм чаще всего выявлялся инвазивный рак неспецифического типа – 87,1 % случаев. Инвазивный рак II степени злокачественности наблюдался гораздо чаще, составив 52,9 % случаев. Все опухоли с отсутствием экспрессии AP были представлены инвазивным раком неспецифического типа (100 %) и имели II или III степень злокачественности.

Согласно молекулярно-генетической классификации, учитывая параметры РЭ, РП, Her2/neu и Ki-67, все опухоли были разделены на 4 группы в зависимости от молекулярно-генетического типа.

Данные о частоте выявления позитивного AP-статуса РМЖ в зависимости от молекулярного типа представлены в табл. 3.

Люминальные подтипы встречались гораздо чаще остальных и составили 77,1 % случаев, при этом самым распространенным из них оказался люминальный B Her2-негативный подтип – 41,4 % случаев. В группе AP-негативных опухолей отмечено достоверно большее число случаев тройного негативного рака, чем в группе AP-позитивных, – 50 и 10,9 % случаев соответственно (p = 0,034).

Результаты исследования

За время наблюдения смертность в группе больных с AP-негативным РМЖ составила 66,7 % (n = 4), что достоверно выше, чем в группе с AP-позитивными опухолями – 12,5 % (n = 8, p = 0,007).

Анализ выживаемости пациентов (по методу Каплана–Майера) в зависимости от уровня экспрессии AP представлен в табл. 4 и на рис. 2.

Статистический анализ данных табл. 4 и рис. 2 показал, что продолжительность жизни достоверно выше в группе больных с высоким уровнем экспрессии AP в опухоли. Так, из пациенток с высокой экспрессией AP через 5 лет были живы 91 %, через 10 лет – 83 %. В то же время в группе с негативным AP-статусом опухоли 10-летний рубеж не прошла ни одна больная. Пятилетняя выживаемость у пациентов с негативным AP-статусом опухоли составила 33,3 % (p = 0,0007). С учетом приведенных данных

Таблица 3. Частота выявления позитивного AP-статуса РМЖ в зависимости от молекулярного типа

Тип	AP-негативные (n = 6)		AP-позитивные (n = 64)		Всего (n = 70)	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Люминальный А	2	33,3	16	25,0	18	25,7
Люминальный В Her2 –	1	16,7	28	43,8	29	41,4
Люминальный В Her2+	–	–	7	10,9	7	10,0
Erb-B2 гиперэкспрессирующий (Her2-тип)	–	–	6	9,4	6	8,6
Базальноподобный (тройной негативный)	3	50,0	7	10,9*	10	14,3

*Статистически достоверные различия между группами AP- и AP+, $p = 0,034$.

можно сделать вывод: отсутствие экспрессии AP в опухоли является неблагоприятным прогностическим фактором, независимо от молекулярного типа.

Таблица 4. Общая выживаемость (% \pm δ) больных РМЖ в зависимости от AP-статуса опухоли

Срок	AP–	AP+	Всего
	6	64	70
1-летняя	100	98,4 \pm 1,6	95,4 \pm 2,6
3-летняя	66,7 \pm 19,2	94,9 \pm 2,9	87,1 \pm 4,3
5-летняя	33,3 \pm 19,2	91,0 \pm 3,9	81,4 \pm 5,1
10-летняя	–	83,3 \pm 5,6	81,4 \pm 5,1
Медиана	39,9	Не достигнута*	Не достигнута

* Достоверные различия между группами, $p = 0,0007$.

Регрессионный анализ по Коксу показал: отношение рисков (ОР) 0,119, $p = 0,0008$, 95 % доверительный интервал (ДИ) 0,034–0,41. Последнее доказывает, что риск смерти у больных с AP-позитивным РМЖ на 88 % ниже, чем у больных с AP-негативными опухолями. Общая выживаемость пациентов с люминальными и нелюминальными типами РМЖ в зависимости от уровня андрогенов представлена на рис. 3 и 4. Для люминального рака ($n = 54$) величина риска так же значима: ОР 0,015, $p = 0,0003$, 95 % ДИ 0,002–0,150. Для нелюминального рака ($n = 16$) экспрессия AP не оказывает существенного влияния на риск смерти: ОР 0,596, $p = 0,658$, 95 % ДИ 0,061–5,866).

Обсуждение

За последние годы существенно расширились представления о молекулярно-биологических особенностях РМЖ, выявлен ряд характерных для разных типов опухолей генетических аномалий. Про-

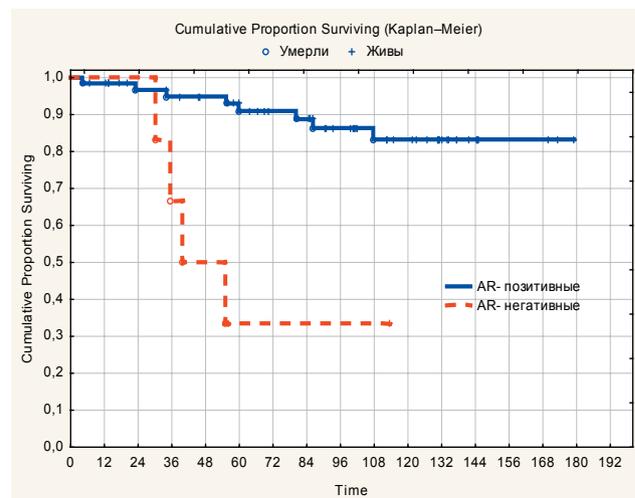


Рис. 2. Общая выживаемость в зависимости от уровня андрогенов, $p = 0,0007$

должаются исследования различных биологических показателей РМЖ, которые могут иметь прогностическое значение, изучаются различные маркеры прогноза заболевания [11, 12].

Как показали исследования V. Panet-Raymond и соавт., при люминальных типах РМЖ экспрессия AP была ассоциирована с низким показателем pT, более низкой степенью злокачественности и, соответственно, благоприятным прогнозом. Авторы пришли к выводу, что позитивный эффект экспрессии AP мог быть результатом подавления рецепторами андрогенов сигнальных путей рецепторов эстрогена, стимулирующих рост опухоли [13]. Аналогичные данные были получены нами. Так, у больных с AP-позитивными опухолями в подавляющем большинстве случаев определялась I стадия заболевания и II степень злокачественности. Результаты, во многом согласующиеся с нашими данными, получены японскими исследователями E. Tokunaga и соавт., которые изучали экспрессию AP в люминальных типах РМЖ. Ими был проанализирован уровень экспрессии AP

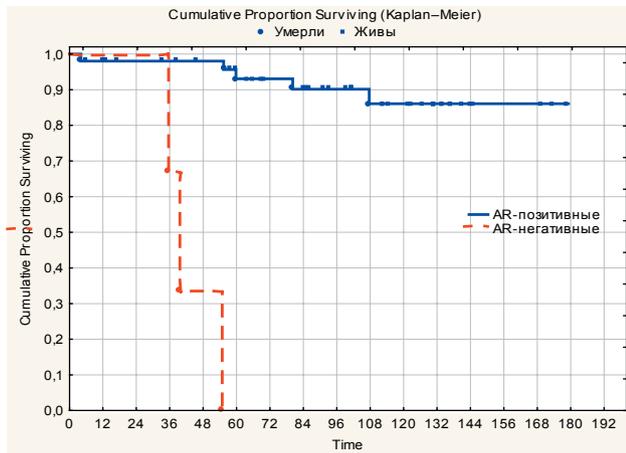


Рис. 3. Общая выживаемость пациентов с люминальными типами РМЖ в зависимости от уровня андрогенов, $p = 0,00001$

у 250 больных и сопоставлен с клинико-морфологическими характеристиками опухоли. Экспрессия АР увеличивалась с возрастом в ЭР-позитивных опухолях. У пациентов старше 51 года высокий уровень экспрессии АР достоверно коррелировал с хорошим прогнозом, и незначительно — у пациентов моложе 50 лет. Авторы пришли к выводу, что выраженная экспрессия АР ассоциирована с хорошим прогнозом у больных люминальными типами РМЖ [14]. Противоположные результаты были получены L.J. McGhan и соавт., обнаружившими, что экспрессия АР коррелирует с более поздней клинической стадией и уве-

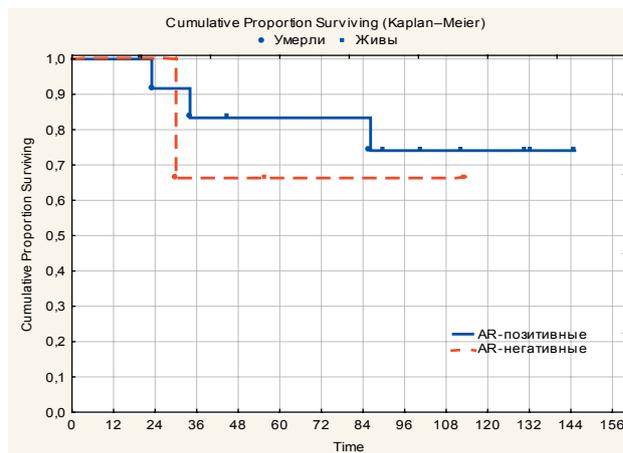


Рис. 4. Общая выживаемость пациентов с нелюминальными типами РМЖ в зависимости от уровня андрогенов, $p = 0,668$

личением частоты обнаружения метастазов в подмышечных лимфатических узлах [15]. I. Mrklic и соавт. также не нашли связи между экспрессией АР и прогнозом РМЖ [16].

Заключение

Сопоставляя наши данные с данными других исследований, можно сделать вывод, что изучение экспрессии АР в опухолевой ткани у пациентов РМЖ является перспективным направлением не только в оценке прогноза заболевания, но и при поиске дополнительных подходов к лечению РМЖ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М., 2015. С. 5–11.
2. Safarpour D., Tavassoli F.A. A Targetable Androgen Receptor – Positive Breast Cancer Subtype Hidden Among the Triple-Negative Cancers. Arch Pathol Lab Med 2015;139(5):612–7. DOI: 10.5858/arpa.2014–0122-RA. PMID: 25310144.
3. Крылов А.Ю., Крылов Ю.В. Андрогены и рак молочной железы (обзор литературы). Вестник Витебского гос. мед. ин-та 2015;5(14):5–15.
4. Brys M. Androgens and androgen receptor: do they play a role in breast cancer? Med Sci Monit 2000;6(2):433–8. PMID: 11208351.
5. Liao D.J., Dickson R.B. Roles of androgens in the development, growth, and carcinogenesis of the mammary gland. J Steroid Biochem Mol Biol 2002;80(2):175–89. PMID: 11897502.
6. Isola J.J. Immunohistochemical demonstration of androgen receptor in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. J Pathol 1993;170(1):31–5. DOI: 10.1002/path.1711700106. PMID: 8100853.
7. Hu R., Dawood S., Holmes M.D. et al. Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. Clin Cancer Res 2011;17(7):1867–74. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-10–2021. PMID: 21325075. PMID: PMC3076683.
8. Moinfar F., Okcu M., Tsybrovskyy O. et al. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. Cancer 2003;98(4):703–11. DOI: 10.1002/cncr.11532. PMID: 12910513.
9. Ogawa Y., Hai E., Matsumoto K. et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. Int J Clin Oncol 2008;13(5):431–5. DOI: 10.1007/s10147-008-0770-6. PMID: 18946753.
10. Lester S.C., Bose S., Chen Y.Y. et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. Arch Pathol Lab Med 2009;133(10):1515–38. DOI: 10.1043/1543-2165-133.10.1515. PMID: 19792042.
11. Tang D., Xu S., Zhang Q., Zhao W. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. Medical Oncol 2012;29(2):526–33. DOI: 10.1007/s12032-011-9948-2. PMID: 21519872.
12. Federici C., Petrucci F., Caimi S. et al. Exosome Release and Low pH Belong

- to a Framework of Resistance of Human Melanoma Cells to Cisplatin. PLoS ONE 2014;9(2):e88193. DOI: 10.1371/journal.pone.0088193. PMID: 24516610. PMCID: PMC3916404.
13. Panet-Raymond V., Gottlieb B., Beitel L.K. et al. Interactions between androgen and estrogen receptors and the effects on their transactivational properties. Mol Cell Endocrinol 2000;167(1–2):139–50. PMID: 11000528.
14. Tokunaga E., Hisamatsu Y., Taketani K. et al. Differential impact of the expression of the androgen receptor by age in estrogen receptor-positive breast cancer. Cancer Med 2013;2(6):763–73. DOI: 10.1002/cam4.138. PMID: 24403250. PMCID: PMC3892381.
15. McGhan L. J., McCullough A.E., Protheroe C.A. et al. Androgen receptor-positive triple negative breast cancer: a unique breast cancer subtype. Ann Surg Oncol 2014;21(2):361–67. DOI: 10.1245/s10434-013-3260-7. PMID: 24046116.
16. Mrklic I., Pogorelic Z., Capkun V., Tomic S. Expression of androgen receptors in triple negative breast carcinomas. Acta Histochemica 2013; 115(4):344–48. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.09.006. PMID: 23031358.

ФАКТОРЫ ПРОГНОЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ НЕЙРОЭНДОКРИННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ РЕЖИМАМИ НА ОСНОВЕ АРАНОЗЫ

С.А. Полозкова¹, В.А. Горбунова¹, В.В. Делекторская¹, Н.Ф. Орел^{1,2}, Н.Н. Козлов¹, А.Е. Кузьминов¹, А.А. Маркович¹, А.С. Одинцова¹, Г.С. Емельянова³

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 23;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 123995 Москва, ул. Баррикадная, 2/1;

³ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России; Россия, 127473 Москва, ул. Десятская, 20, стр. 1

Контакты: Светлана Александровна Полозкова elevana@list.ru

Введение. При изучении химиопрепаратов, применяемых при нейроэндокринных новообразованиях, необходимо найти новые факторы прогноза с целью определить подгруппы больных, которые получают оптимальную пользу от лекарственного лечения.

Цель исследования — оптимизация химиотерапии режимами на основе Аранозы больных с нейроэндокринными новообразованиями путем определения группы пациентов с наилучшим эффектом на терапию.

Материалы и методы. Лечение на основе Аранозы проведено 122 пациентам. Были оценены частота объективного эффекта и контроль роста опухоли (объективный эффект + стабилизация длительностью более 6 мес) (шкала RECIST 1.0) при каждом варианте лечения и медианы выживаемости без прогрессирования.

Результаты. Разница в эффективности Аранозы в монорежиме и в комбинациях с другими препаратами не выявлена. Препаратами контроля роста опухоли были локализация метастазов только в печени, менее 3 зон метастазирования, проведение более 6 курсов лечения на основе Аранозы, высокая дифференцировка опухоли, отсутствие редукции дозы Аранозы и химиотерапии темозоломидом в анамнезе ($p < 0,05$). Выживаемость без прогрессирования была выше у пациентов, у которых присутствовали контроль роста опухоли, отсутствие экспрессии O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы в опухолевой ткани, Ki-67 ≤ 20 %, высокая дифференцировка опухоли, проведение более 6 курсов химиотерапии на основе Аранозы, объективный биохимический эффект, менее 3 метастатических зон ($p < 0,05$).

Заключение. В дальнейшем необходимо продолжить изучение прогностических факторов эффективности алкилирующих препаратов при нейроэндокринных новообразованиях.

Ключевые слова: Араноза, химиотерапия, нейроэндокринные новообразования, прогностические и предиктивные факторы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-38-46

PROGNOSTIC FACTORS OF THE EFFICACY OF ARANOZA-BASED THERAPY IN NEUROENDOCRINE NEOPLASMS

S.A. Polozkova¹, V.A. Gorbunova¹, V.V. Delektorskaya¹, N.F. Orel^{1,2}, N.N. Kozlov¹, A.E. Kuzminov¹, A.A. Markovich¹, A.S. Odintsova¹, G.S. Emelyanova³

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 23 Kashirskoe sh., Moscow, 115478, Russia;

²Russian Medical Academy of Continuous Education, Ministry of Health of Russia; 2/1 Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russia;

³A.I. Evdokimov Moscow State Medical and Dental University, Ministry of Health of Russia; 20—1 Delegatskaya St., Moscow, 127473, Russia

Introduction. In patients with neuroendocrine neoplasms it is necessary to search for new prognostic factors to identify a subgroup of patients who will benefit from drug treatment.

Aim. The aim of the study was an optimization of Aranoza-based therapy in patients with neuroendocrine neoplasms by using both morphological and clinical factors as predictors of the treatment efficacy.

Materials and methods. A total of 122 patients were enrolled and assessed for radiological response (RECIST 1.0) and progression-free survival.

Results. Aranoza and its combinations had similar efficacy. The localization of metastases only in the liver, less than 3 metastatic zones, more than 6 courses of Aranoza-based chemotherapy, well-differentiated tumors, absence of doses reduction of Aranoza and temozolomide in anamnesis were predictors of the disease control rate. Progression-free survival was higher in patients with disease control rate

(objective response + stabilization more than 6 months), Ki-67 ≤ 20 %, well-differentiated tumors, more than 6 courses of Aranoza-based chemotherapy, objective biochemical response, less than 3 metastatic zones and absence of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase expression.

Conclusion. Future analysis of prognostic factors in patients treated with alkylating agents is needed.

Key words: Aranoza, chemotherapy, neuroendocrine neoplasms, prognostic and predictive factors

Введение

Нейроэндокринные новообразования (НЭН) — редкие злокачественные опухоли, происходящие из энтерохромаффинных клеток [1]. В зависимости от популяционного исследования заболеваемость НЭН составляет от 1 до 9 случаев на 100 тыс. населения в год [2, 3].

В 2010 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) предложила классификацию НЭН желудочно-кишечного тракта и поджелудочной железы (ПЖ), обозначив всю группу опухолей данного типа термином «нейроэндокринные новообразования». В ней были выделены опухоли низкой (нейроэндокринные опухоли, НЭО G₁), промежуточной (НЭО G₂), высокой (нейроэндокринные карциномы, НЭК G₃) степеней злокачественности и смешанные аденонейроэндокринные карциномы (содержат ненейроэндокринный компонент и не менее 30 % нейроэндокринных клеток) [4].

В 2004 г. ВОЗ разработала классификацию НЭН органов внутригрудной локализации:

- типичный карциноид, характеризующийся низкой степенью злокачественности G₁, низким митотическим индексом — менее 2 митозов на 10 репрезентативных полей зрения (РПЗ) и отсутствием некрозов;
- атипичный карциноид, характеризующийся промежуточной степенью злокачественности G₂, митотическим индексом от 2 до 10 митозов на 10 РПЗ или отдельными участками очагового некроза;
- крупноклеточный нейроэндокринный рак, характеризующийся высокой степенью злокачественности G₃, большим митотическим индексом (более 10 митозов на 10 РПЗ) и более распространенными некрозами;
- мелкоклеточный рак, характеризующийся высокой степенью злокачественности G₃, высоким митотическим индексом (более 80 митозов на 10 РПЗ) и обширными зонами некроза.

В 2015 г. данная классификация была пересмотрена, и в нее было включено определение индекса пролиферативной активности Ki-67 (табл. 1) [5].

При первичном обследовании у 50 % больных выявляют местно-распространенные и метастатические НЭН. Арсенал противоопухолевых препаратов, эффективных при высокодифференцированных (ВД) НЭО, невелик и включает в основном алкили-

рующие препараты: стрептозотоцин (СТЗ; в РФ не зарегистрирован), дакарбазин, темозоломид и комплексные соединения платины. За рубежом стандартом лечения ВД НЭО ПЖ является СТЗ в монорежиме и в комбинированных режимах химиотерапии (СТЗ ± доксорубин / 5-фторурацил (5-ФУ)), эффективность которых в среднем составляет 25 %, медиана выживаемости без прогрессирования (ВБП) — 8 мес. При использовании тройных комбинаций со СТЗ объективный эффект (ОЭ) достигает 38–56 %, а медиана ВБП — 18,9 мес. Эффективность режимов на основе темозоломида в среднем равна 40 %, медиана ВБП — 16 мес [6–16]. В большинстве исследований алкилирующих препаратов при ВД непанкреатических НЭО частота ОЭ обычно не превышает 20 %, медиана ВБП в среднем составляет 10 мес [7, 9, 16–18]. С учетом малой чувствительности ВД НЭО к химиотерапии при изучении различных ее режимов проводятся попытки идентифицировать предиктивные и прогностические факторы, способные предсказать ее эффективность, поскольку индивидуальный подход и персонализация терапии позволят существенно повысить ее эффективность. Однако в большинстве случаев данные не достигали статистической значимости из-за малого числа пациентов и их большой гетерогенности.

Таблица 1. Индекс пролиферации Ki-67 при НЭН грудной клетки

Номенклатура	Ki-67, %
Типичный карциноид	< 5
Атипичный карциноид	5–20
Крупноклеточный нейроэндокринный рак	40–80
Мелкоклеточный рак	50–100

М. Kouvaraki и соавт. (2004) ретроспективно проанализировали результаты лечения 84 пациентов с НЭН ПЖ в режиме СТЗ + доксорубин + 5-ФУ. При этом 79 из 84 пациентов получили данный режим в первой линии. ОЭ (шкала RECIST) зафиксирован у 39 % (33/84), стабилизация заболевания (СЗ) — у 50 % (42/84) пациентов. Медиана ВБП была равна 18 мес. Не выявлено разницы в частоте ОЭ у пациентов с местно-распространенными и метастатическими опухолями, разным объемом поражения

печени ($\leq 75\%$ против $> 75\%$), получавших и не получавших лечение в предшествующий период. Однако в группе пациентов с метастазами в печени частота ОЭ была выше, чем в группе с экстрапеченочными отдаленными метастазами с вовлечением печени или без него, — 49% против 19% ($p = 0,02$), у пациентов со снижением уровня хромогранина А (ХГА) на 30% и более — 50% против 22% ($p = 0,04$). ВБП была более продолжительной у пациентов с опухолями низкой степени злокачественности ($p = 0,003$), старше 54 лет ($p = 0,04$), поражением печени менее 75% ($p = 0,01$) и у тех, кто получил режим в первой линии лечения ($p = 0,05$) [10].

N. Turner и соавт. (2010) в исследовании, включавшем пациентов с ВД НЭО и НЭК панкреатической ($n = 49$) и непанкреатической локализации ($n = 18$), изучили режим СТЗ + цисплатин + 5-ФУ в первой линии терапии. Можно было провести максимум 6 курсов химиотерапии. Частота ОЭ (шкала RECIST) при НЭН ПЖ составила 38% (18/47). Выявлено, что на частоту ОЭ не влияли локализация первичной опухоли, индекс пролиферации Ki-67, общее состояние пациента, возраст, уровень ХГА. При этом у пациентов с НЭК частота ОЭ была статистически значимо выше, чем у больных с ВД НЭО, — 56% против 26% ($p = 0,046$), что, вероятно, связано с включением в режим цисплатина. Для всей группы пациентов медиана ВБП была равна 9,1 мес [16].

В исследовании ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) (E6282) дакарбазина у 50 пациентов с НЭН ПЖ объективный эффект по шкале ВОЗ отмечен у 34% (17/50) пациентов, медиана длительности ответа составила 10 мес (95% доверительный интервал (ДИ) 4–28 мес). Среди пациентов, ранее получавших химиотерапию, частота ОЭ составила 14% (3/22), а среди нелеченых пациентов — 50% (14/28) ($p = 0,008$) [12].

В работе J. Strosberg и соавт. (2011) показано, что частота ОЭ при использовании режима темозоломид + капецитабин была статистически значимо выше при индексе пролиферации Ki-67 $> 5\%$ ($n = 28$), чем при Ki-67 $\leq 5\%$ ($n = 31$), — 64% против 29% ($p = 0,006$) [15].

При изучении режима «темозоломид + бевацизумаб» при НЭО ПЖ объективный ответ был зарегистрирован в 33% (5/15) случаев (шкала RECIST), медиана ВБП составила 14,3 мес. Большинство пациентов получали данный режим в первой линии лечения. ВБП не зависела от локализации первичной опухоли и наличия/отсутствия терапии октреотидом во время химиотерапии [19].

В исследовании W. Sun и соавт. (2005) при метастатических ВД непанкреатических НЭО, когда использовался режим СТЗ + 5-ФУ ($n = 78$), у пациентов, ранее не получавших химиотерапию, частота ОЭ (шкала

ВОЗ) и медиана ВБП составили 15% (12/78) и 5,3 мес, а при наличии химиотерапии в анамнезе — 11% (3/27) и 4,7 мес соответственно. ВБП была лучше при общем состоянии пациента 0–1, чем 2 ($p = 0,0013$) [18].

В ходе исследования J. Stropa и соавт. (2013) 22 пациента с карциноидами бронхов получили темозоломид главным образом в первой линии лечения. Частичный эффект (ЧЭ) был зарегистрирован у 14% (3/22) пациентов (у всех пациентов диагностирован атипичный карциноид легких), СЗ — у 50% (11/22) и ПЗ — у 32% (7/22) пациентов (шкала RECIST). Медиана ВБП составила 5,3 мес. Не выявлено влияния степени злокачественности (G_1 против G_2), предшествующего хирургического лечения и химиотерапии на ВБП [17].

Таким образом, в ряде работ была показана тенденция к увеличению частоты ОЭ, если опухоль локализована в ПЖ, отсутствует химиотерапевтическое лечение в анамнезе, имеется хорошее общее состояние по шкале ECOG, невысокий уровень ХГА до начала лечения, индекс пролиферации Ki-67 более 5% и небольшая распространенность опухолевого процесса [20].

Стандартом первой линии лечения НЭК является режим этопозид + цисплатин/карбоплатин, эффективность которого в среднем составляет 36% , медиана общей выживаемости (ОВ) — 12 мес. В одной из работ было показано, что при индексе пролиферации Ki-67 более 55% ответ на платиносодержащую химиотерапию лучше (42% против 15%), а медиана ОВ на 4 мес короче (10 против 14 мес), чем в группе с Ki-67, равным $20–55\%$ [21]. Поэтому пациенты с НЭК и Ki-67 менее 55% , вероятно, должны получать в первой линии режимы на основе неплатиновых препаратов, например темозоломида.

Таким образом, разработка новых терапевтических подходов и поиск факторов прогноза их эффективности при НЭН является актуальной задачей.

Материалы и методы

Исследование выполнено на базе отделения химиотерапии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Целью исследования было улучшение результатов противоопухолевой терапии больных с метастатическими НЭН путем применения режимов химиотерапии на основе Аранозы и определение группы пациентов с наилучшим эффектом на терапию.

Пациенты получали один из следующих режимов химиотерапии в зависимости от предшествующего лечения и сопутствующих заболеваний:

1) Араноза 1000 мг в 1–2-й день и 500–1000 мг в 3-й день (500–690 мг/м²/сут) внутривенно струйно, суммарно не более 3000 мг на один курс химиотерапии, один раз в 3 нед;

2) Араноза 1000 мг (500–666 мг/м²/сут) внутривенно струйно в 1-й и 2-й дни + капецитабин 2000 мг/м²/сут внутрь с разделением суточной дозы на 2 приема с интервалом 12 ч с вечера 1-го дня по утро 15-го дня цикла, 1 раз в 3 нед;

3) Араноза 1000 мг (500–625 мг/м²/сут) внутривенно струйно в 1-й и 2-й дни + доксорубицин 50 мг/м² внутривенно капельно в течение 20 мин на 3-й день, 1 раз в 3 нед;

4) Араноза 1000 мг в 1-й день и 500–800 мг во 2-й день (450 мг/м²/сут) внутривенно струйно + темозоломид 100 мг/м²/сут внутрь с 3-го по 6-й день на первом цикле и с 3-го по 7-й день при последующих циклах, если нет токсичности III–IV степени после 1-го цикла химиотерапии, 1 раз в 3 нед.

Для оценки эффективности лечения использовались следующие параметры:

- частота ОЭ (процент больных с полными и частичными регрессиями от общего числа больных в данной группе) и контроль роста опухоли (КРО), (процент больных с полными, частичными регрессиями и СЗ длительностью более 6 мес от общего числа больных в данной группе по данным двух контрольных обследований), которые оценивались по шкале RECIST, версия 1.0;
- объективный биохимический эффект – доля пациентов с исходно повышенным уровнем ХГА, у которых при 2 последующих измерениях и более отмечены нормализация или снижение его уровня на 50 % и более;
- симптоматический эффект – доля пациентов с функционально активными опухолями, у которых в процессе лечения отмечалось субъективное исчезновение или уменьшение выраженности симптомов заболевания (частоты приливов, стула, интенсивности болевого синдрома и др.);
- ВВП – период времени от начала лечения до первого выявления прогрессирования заболевания или летального исхода по любой причине, или последнего контакта.

Для статистической обработки данных применяли пакет программ Microsoft Office Excel 2007, Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., США) и «АСТА» (ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России). Для сравнения несвязанных групп по качественным признакам использовался критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность или двухсторонний точный критерий Фишера в случае малых выборок при таблицах сопряжения 2 × 2 с учетом поправки Бонферрони при множественных сравнениях. Во всех случаях применяли 95 % ДИ и двухсторонний *p*. На первом этапе проведен однофакторный анализ для определения влияния факторов на выживаемость. Далее использовался регрессионный анализ пропорциональных рисков Кокса

для выявления признаков, значимо влияющих на выживаемость. Выживаемость анализировалась в соответствии с методом Каплана–Майера и сравнивалась по логарифмическому ранговому тесту. Данные представлены в виде медианы и 95 % ДИ. Многофакторный анализ заключался в построении решающих правил по методу Байеса с применением различных наборов факторов.

Результаты и обсуждение

В исследование было включено 122 больных с метастатическими НЭН. Общая характеристика пациентов представлена в табл. 2.

Исследуемые группы пациентов были однородны по возрасту, полу, статусу ECOG, индексу массы тела, статусу MGMT, локализации первичной опухоли, локализации метастазов, индексу пролиферации Ki-67, степени дифференцировки опухоли, функциональной активности, исходному уровню ХГА и сопутствующей терапии аналогами соматостатина. В группе «Араноза + капецитабин» статистически значимо чаще, чем в группе «Араноза + доксорубицин», лечение проводилось в качестве первой линии (*p* = 0,003). Эффективность лечения на основе Аранозы представлена в табл. 3.

Таким образом, между группами лечения не было отличий по частоте ОЭ, КРО, симптоматического и биохимического эффектов, медиане ВВП. Достижение симптоматического и биохимического эффектов было возможно у пациентов, не получавших аналоги соматостатина на фоне химиотерапии, а также у тех, кто получал аналоги соматостатина с 1-го курса химиотерапии и имел определенные симптомы заболевания или рост ХГА на фоне их введения до начала химиотерапии.

Анализ прогностических факторов эффективности лечения больных с НЭН проведен с объединением исследуемых 4 групп с учетом сравнимой эффективности всех режимов химиотерапии.

При сравнении группы пациентов с ОЭ с группой без него выявлено, что частота ОЭ была значимо больше:

- при панкреатических НЭН: 41,1 % (23/56) против 11,1 % (6/54) при непанкреатических НЭН (*p* = 0,0008, отношение шансов (ОШ) 5,6; 95 % ДИ 2,0–15,2);
- метастазах в печени: 33,3 % (23/69) против 10,9 % (5/46) при экстрапеченочных метастазах с вовлечением печени или без такового (*p* = 0,01, ОШ 4,1; 95 % ДИ 1,4–11,8);
- наличии менее 3 метастатических зон: 32,9 % (28/85) против 5,4 % (2/37) при 3 и более зонах метастазирования (*p* = 0,001, ОШ 8,6; 95 % ДИ 1,9–38,3);
- отсутствии экспрессии MGMT: 45,8 % (22/48) против 3,7 % (1/27) при наличии экспрессии MGMT (*p* = 0,0001, ОШ 22,0; 95 % ДИ 2,8–175,5);

Таблица 2. Общая характеристика пациентов в исследовании (n = 122)

Параметр	Общий показатель (n = 122)	Араноза (n = 36)	Араноза + капецитабин (n = 30)	Араноза + темозоломид (n = 25)	Араноза + доксорубин (n = 31)
Медиана возраста (мин.–макс.), лет	55 (19–76)	55 (33–76)	57 (26–71)	56 (19–70)	48 (23–76)
Пол, n (%)					
Муж.	45 (36,9)	16 (44,4)	8 (26,7)	9 (36)	12 (38,7)
Жен.	77 (63,1)	20 (55,6)	22 (73,3)	16 (64)	19 (61,3)
Общее состояние по шкале ECOG, n (%)					
0–1	114 (93,4)	31 (86,1)	27 (90)	25 (100)	31 (100)
2	8 (6,6)	5 (13,9)	3 (10)	0	0
Локализация первичного очага, n (%)					
Нейроэндокринные новообразования поджелудочной железы	56 (45,9)	16 (44,4)	13 (43,3)	11 (44)	16 (51,6)
Непанкреатические нейроэндокринные новообразования	54 (44,3)	16 (44,4)	12 (40)	13 (52)	13 (41,9)
Метастазы нейроэндокринных новообразований в печени без выявленного первичного очага	12 (9,8)	4 (11,1)	5 (16,7)	1 (4)	2 (6,5)
Количество зон метастазирования, n (%)					
1–2	85 (69,7)	28 (77,8)	22 (73,3)	16 (64)	19 (61,3)
3 и более	37 (30,3)	8 (22,2)	8 (26,7)	9 (36)	12 (38,7)
Распределение метастазов по зонам метастазирования, n (%)					
Печень	69 (56,6)	24 (66,7)	17 (56,7)	14 (56)	14 (45,2)
Экстрапеченочные метастазы с вовлечением печени или без него	33 (27)	8 (22,2)	9 (30)	8 (32)	8 (25,8)
Экстрапеченочные метастазы с вовлечением печени	13 (10,7)	3 (8,3)	0	3 (12)	7 (22,6)
Метастазы в лимфатических узлах	7 (5,7)	1 (2,8)	4 (13,3)	0	2 (6,5)
Функциональная активность, n (%)					
Функционально активные нейроэндокринные новообразования	39 (34,5)	16 (48,5)	6 (25)	6 (24)	11 (35,5)
Функционально неактивные нейроэндокринные новообразования	74 (65,5)	17 (51,5)	18 (75)	19 (76)	20 (64,5)
Предшествующее лечение, n (%)					
Хирургическое лечение	68 (55,7)	18 (50)	15 (50)	18 (72)	17 (54,8)
Химиотерапия	62 (50,8)	19 (52,8)	9 (30)	12 (48)	22 (71)
Иммунотерапия	27 (22,1)	12 (33,3)	7 (23,3)	6 (24)	2 (6,5)
Химиоэмболизация печеночной артерии	6 (4,9)	3 (8,3)	0	1 (4)	2 (6,5)
Таргетная терапия	12 (9,9)	2 (5,6)	2 (6,7)	4 (16)	4 (13)
Терапия аналогами соматостатина	55 (45,1)	18 (50)	9 (30)	13 (52)	15 (48,4)
Уровень ХГА на момент начала лечения, n (%)					
Повышен	83 (76,1)	28 (80)	18 (78,3)	18 (72)	19 (73,1)
Норма	26 (23,9)	7 (20)	5 (21,7)	7 (28)	7 (26,9)
Терапия пролонгированными аналогами соматостатина, n (%)					
С первого курса лечения	67 (54,9)	20 (55,6)	14 (46,7)	12 (48)	21 (67,7)
С последующих курсов лечения	10 (8,2)	3 (8,3)	3 (10,0)	2 (8)	2 (6,5)
Отсутствие терапии	45 (36,9)	13 (36,1)	13 (43,3)	11 (44)	8 (25,8)
Индекс пролиферации Ki-67, n (%)					
Менее 3 %	7 (5,7)	3 (8,3)	3 (10)	0	1 (3,2)
3–20 %	87 (71,3)	25 (69,4)	18 (60)	20 (80)	24 (77,4)
Более 20 %	19 (15,6)	3 (8,3)	6 (20)	4 (16)	6 (19,4)
Индекс пролиферации Ki-67, %					
Медиана	10	7	12	11	15
Степень дифференцировки опухоли, n (%)					
Высокодифференцированные нейроэндокринные опухоли	95 (77,9)	29 (80,6)	21 (70)	20 (80)	25 (80,6)
Нейроэндокринные карциномы	18 (14,8)	2 (5,6)	6 (20)	4 (16)	6 (19,4)
Статус O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансферазы (MGMT), n (%)					
Отсутствие экспрессии MGMT	48 (64)	12 (33,3)	15 (83,3)	10 (52,6)	11 (57,9)
Экспрессия MGMT	27 (36)	7 (19,4)	3 (16,7)	9 (47,4)	8 (42,1)

Таблица 3. Эффективность химиотерапии на основе Аранозы

Параметр	Режим химиотерапии				p
	Араноза (n = 36)	Араноза + капецитабин (n = 30)	Араноза + темозоломид (n = 25)	Араноза + доксорубицин (n = 31)	
Объективный эффект	33 % (12/36)	20 % (6/30)	28 % (7/25)	16 % (5/31)	0,365
СЗ сроком более 6 мес	47 % (17/36)	47 % (14/30)	36 % (9/25)	45 % (14/31)	0,333
Объективный эффект + СЗ длительностью 6 мес и более	81 % (29/36)	67 % (20/30)	64 % (16/25)	61 % (19/31)	0,242
Медиана ВБП, мес (ДИ)	15,3 (7,3–33,9)	15,8 (7,2–25,5)	17,9 (3,2–27,1)	17,9 (3,2–27,1)	0,791
Симптоматический эффект (n = 39)	100 % (16/16)	83 % (5/6)	83 % (5/6)	73 % (8/11)	0,957
Биохимический эффект (n = 83)	39 % (11/28)	44 % (8/18)	44 % (8/18)	53 % (10/19)	0,880

- достижении объективного биохимического эффекта: 54,1 % (20/37) против 6,1 % (2/33) при достижении биохимической стабилизации или прогрессирования ($p = 0,00002$; ОШ 18,2; 95 % ДИ 3,8–87,6);
- проведении более 6 курсов химиотерапии на основе Аранозы: 43,9 % (25/57) против 7,7 % (5/65) при проведении менее 6 курсов лечения ($p = 0,00001$, ОШ 9,4; 95 % ДИ 3,3–26,8).

Другие факторы (пол, возраст, статус ECOG, индекс пролиферации Ki-67, степень дифференцировки опухоли, функциональная активность опухоли, одновременное использование с химиотерапией аналогов соматостатина, дозовая интенсивность Аранозы, исходный уровень ХГА в плазме крови, режим лечения и линия терапии) не оказали значимого влияния на частоту ОЭ.

КРО оказался статистически значимо выше:

- при метастазах в печени: 78,3 % (54/69) против 56,5 % (26/46) при экстрапеченочных метастазах с вовлечением печени или без такового ($p = 0,01$, ОШ 2,8; 95 % ДИ 1,2–6,3);
- наличии менее 3 метастатических зон: 78,8 % (67/85) против 54,1 % (29/37) при 3 и более зонах метастазирования ($p = 0,005$, ОШ 3,2; 95 % ДИ 1,4–7,3);
- проведении более 6 курсов химиотерапии на основе Аранозы: 93 % (53/57) против 52,3 % (34/65) при проведении менее 6 курсов лечения ($p < 0,05$, ОШ 12,1; 95 % ДИ 3,9–37,3);
- отсутствии редукции дозы Аранозы: 78,8 % (67/85) против 54,1 % (20/37) при наличии редукции дозы ($p = 0,005$, ОШ 3,2; 95 % ДИ 1,4–7,3);
- при ВД НЭО: 73,7 % (70/95) против 44,4 % (8/18) при НЭК ($p = 0,03$, ОШ 3,5; 95 % ДИ 1,2–9,9);

- отсутствии темозоломида в анамнезе (учитывались пациенты из групп Аранозы, Араноза + капецитабин и Араноза + доксорубицин, получившие химиотерапию на основе Аранозы не в первой линии): 72,7 % (32/44) против 25 % (2/8) у пациентов, ранее получавших темозоломид ($p = 0,02$, ОШ 8,0; 95 % ДИ 1,4–45,2).

Не выявлено влияния таких факторов, как пол, возраст, статус ECOG, индекс пролиферации Ki-67, функциональная активность опухоли, локализация первичной опухоли, одновременное использование аналогов соматостатина и химиотерапии, исходный уровень ХГА в плазме крови, биохимический эффект на лечение, режим лечения и линия терапии на КРО.

Далее было изучено влияние ряда клинико-морфологических факторов на ВБП в объединенной группе пациентов. Эффективность химиотерапии за счет увеличения медианы ВБП значимо улучшали:

- КРО (20,5 мес против 2,9 мес; $p < 0,05$, ОР 2,7; 95 % ДИ 1,2–6,4);
- индекс пролиферации Ki-67 ≤ 20 % (16,2 мес против 8,1 мес; $p = 0,03$, ОР 2,1; 95 % ДИ 1,2–3,7);
- ВД НЭО (17,3 мес против 3,6 мес; $p = 0,01$, ОР 2,3; 95 % ДИ 1,3–4,1);
- более 6 курсов химиотерапии на основе Аранозы (21,2 мес против 6,9 мес; $p = 0,00002$, ОР 2,5; 95 % ДИ 1,7–4,2);
- объективный биохимический эффект (26,6 мес против 8,9 мес; $p = 0,0003$, ОР 2,9; 95 % ДИ 1,7–5,2);
- менее 3 метастатических зон (18,6 мес против 7,3 мес; $p = 0,01$; ОР 1,9; 95 % ДИ 1,2–3).

Не выявлено влияния таких факторов, как пол, возраст, статус по шкале ECOG, локализация первичной опухоли, локализация метастазов, функциональная активность опухоли, дозовая интенсивность

Аранозы, использование аналогов соматостатина во время химиотерапии, на ВБП.

На следующем этапе изучения влияния признаков на ВБП проведен многофакторный анализ. В него были включены факторы, показавшие статистически значимое влияние на ВБП во время однофакторного анализа. Прогноз течения болезни специалист оценивает до назначения терапии, поэтому в многофакторный анализ были включены следующие признаки: уровень Ki-67, линия лечения, количество зон метастазирования и статус экспрессии MGMT (табл. 4). Независимое прогностическое влияние на ВБП оказали количество зон метастазирования и статус MGMT.

Таблица 4. Результаты многофакторного анализа признаков, влияющих на ВБП у больных с метастатическими НЭН

Признак	p	Отношение рисков	95,0 % ДИ для отношения рисков	
			Нижняя граница	Верхняя граница
Количество зон метастазирования	0,04	1,6	1,0	2,7
Статус MGMT	0,002	2,6	1,4	4,7
Ki-67 (20 %)	0,06	1,8	0,9	3,4
Линия	0,2	1,4	0,9	2,2

Для выявления значимых факторов, влияющих на ВБП больных с НЭН, проведен многофакторный анализ, который состоял в построении 2 решающих правил по данным о 119 больных с учетом 20 факторов. Из анализа были исключены 20 больных из-за отсутствия данных по ряду факторов. За основу мы выбрали однолетнюю ВБП с учетом среднего показателя ВБП. На первом этапе с учетом коэффициентов информативности было отобрано 9 наиболее важных факторов, которые значимо влияли на ВБП. Для каждой градации фактора были рассчитаны коэффициенты веса, позволяющие определить индивидуальный прогноз для больного (табл. 5).

Для определения индивидуального прогноза ВБП больного суммируются коэффициенты веса каждого признака с учетом знака. При отрицательной сумме коэффициентов вероятность благоприятного прогноза (пережить 1 год без прогрессирования заболевания) составляет 88,9 % (95 % ДИ 47,0–99,9), при положительной сумме коэффициентов вероятность неблагоприятного прогноза составляет 64,7 % (95 % ДИ 35,2–87,8).

В нашем исследовании группа пациентов с НЭК была небольшой ($n = 18$). У 12 из 18 пациентов индекс пролиферации Ki-67 был менее 55 %, а у 6 – более 55 %. В 1-й подгруппе (Ki-67 = 20–55 %) ОЭ составил 25 % (3/12), КРО (ОЭ + СЗ по шкале RECIST) – 83,3 % (10/12), КРО (ОЭ + СЗ длительностью более 6 мес) – 58,3 % (7/12), медиана ВБП – 8,1 мес (95 % ДИ 3,1–18,7). Во 2-й подгруппе (Ki-67 более 55 %) ОЭ зарегистрировано не было, СЗ (по шкале RECIST) составила 33 % (2/6), СЗ длительностью более 6 мес – 0 %, ПЗ – 67 % (4/6), медиана ВБП – 1,9 мес (95 % ДИ 1,4–2,9) (табл. 6).

Таблица 5. Коэффициенты веса для расчета индивидуального прогноза выживаемости без прогрессирования

№	Фактор	Градация	Коэффициент веса
1	Количество зон метастазирования	1–2	–47
		3 и более	125
2	Количество курсов химиотерапии, курс	≤ 6	67
		> 6	–60
3	Индекс пролиферации Ki-67, %	≤ 10	–48
		> 10	54
4	Биохимический ответ	Полный эффект + частичный эффект	–74
		Стабилизация заболевания + прогрессирование заболевания	49
5	Локализация метастазов	Печеночные метастазы	–41
		Экстрапеченочные метастазы с вовлечением печени или без него	67
6	Дифференцировка опухоли	Высокая	–16
		Низкая	82
7	Линия лечения	Первая	–29
		Последующие	29
8	Возраст, лет	< 55	27
		> 56	–30
9	Локализация первичной опухоли	Нейроэндокринные новообразования поджелудочной железы	5
		Непанкреатические нейроэндокринные новообразования	–5

Таким образом, между группами пациентов с индексом пролиферации Ki-67, равным 20–55 %,

Таблица 6. Эффективность лечения пациентов с НЭК в соответствии с индексом Ki-67

Показатель	Индекс пролиферации Ki-67				p	Отношение рисков (95 % ДИ)
	20–55 % (n = 12)		Более 55 % (n = 6)			
	1-я линия	Последующие линии	1-я линия	Последующие линии		
Частичный эффект	–	3	–	–	0,5	–
Контроль роста опухоли	1	6	–	–	0,04	2,2 (1,2–4,2)
Медиана выживаемости без прогрессирования (95 % ДИ), мес	8,1 (3,1–18,7)		1,9 (1,4–2,9)		0,03	4,5 (1,1–17,4)

и с Ki-67, составляющим более 55 %, различия в частоте ОЭ были статистически не значимы ($p = 0,5$), в то время как КРО (ОЭ + СЗ длительностью более 6 мес) и медиана ВВП были значимо больше в 1-й группе: 58 против 0 % ($p = 0,04$, ОР 2,2; 95 % ДИ 1,2–4,2) и 8,1 мес против 1,9 мес ($p = 0,03$, ОР 4,5; 95 % ДИ 1,1–17,4) соответственно. Поэтому режимы на основе Аранозы могут быть рекомендованы пациентам с НЭК с индексом пролиферации Ki-67 от 20 до 55 % в первой и последующих линиях лечения. В группе пациентов с Ki-67 более 55 % режимы с Аранозой были неэффективными. Однако следует учитывать, что в работе группа пациентов с НЭК была небольшой.

Заключение

Таким образом, эффективность комбинаций с Аранозой («Араноза + капецитабин», «Араноза + темозоломид» и «Араноза + доксорубин») не отличается от эффективности Аранозы в монорежиме. Результаты нашего исследования по изучению предиктивных и прогностических факторов в большей степени согласуются с данными литературы. В дальнейшем необходимо продолжить их изучение на большей выборке пациентов с ограничением критериев включения, с учетом большой гетерогенности группы НЭН, чтобы определить подгруппу больных, которые могут получить максимальную пользу от проводимого лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Falconi M., Bartsch D., Eriksson B. ENETS consensus guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine neoplasms of the digestive system: well-differentiated pancreatic non-functioning tumors. *Neuroendocrinology* 2012;95:120–34. DOI: 10.1159/000335587.
- Alsina M., Marcos-Gragera R., Capdevila J. et al. Neuroendocrine tumors: A population-based study of incidence and survival in Girona province 1994–2004. *Cancer Epidemiology* 2011;35:49–54. DOI: 10.1016/j.canep.2011.05.011. PMID: 21840785.
- Lawrence B., Gustafsson B., Chan J. et al. The Epidemiology of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2011;40:1–18. DOI: 10.1016/j.ecl.2010.12.005. PMID: 21349409.
- Kloppel G., Perren A., Heitz P. et al. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Ann NY Acad Sci* 2004;1014:13–27. PMID: 15153416.
- Travis W., Brambilla E., Burke A., Marx A. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol* 2015 Sep; 10(9):1240–2. DOI: 10.1097/JTO.0000000000000663. PMID: 26291007.
- Cheng P., Saltz L. Failure to confirm major objective antitumor activity for streptozocin and doxorubicin in the treatment of patients with advanced islet cell carcinoma. *Cancer* 1999;86:944–8. PMID 10491519.
- Ekeblad S., Sundin A., Janson E. et al. Temozolomide as monotherapy is effective in treatment of advanced malignant neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res* 2007;13:2986–91. DOI: 10.1158/1078–0432.CCR-06–2053. PMID: 17505000.
- Fjallskog M., Janson E., Falkmer U. et al. Treatment with combined streptozocin and liposomal doxorubicin in metastatic endocrine pancreatic tumors. *Neuroendocrinology* 2008;88:53–8. DOI: 10.1159/000117575.
- Gonzalez M., Biswas S., Clifton L. et al. Treatment of neuroendocrine tumours with infusional 5-fluorouracil, folinic acid and streptozocin. *Br J Cancer* 2003;89:455–6. DOI: 10.1038/sj.bjc.6601167. PMID: 12888810.
- Kouvaraki M., Ajani J., Hoff P. et al. Fluorouracil, doxorubicin, and streptozocin in the treatment of patients with locally advanced metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *J Clin Oncol* 2004;22(23):4762–71. DOI: 10.1200/JCO.2004.04.024. PMID: 15570077.
- McCullum A., Kulke M., Ryan D. et al. Lack of efficacy of streptozocin and doxorubicin in patients with advanced pancreatic endocrine tumors. *Am J Clin Oncol* 2004;27(5):485–488. PMID: 15596916.
- Ramanathan R., Cnaan A., Hahn R. et al. Phase II trial of dacarbazine

- (DTIC) in advanced pancreatic islet cell carcinoma. Study of the Eastern Cooperative Oncology Group-E6282. *Ann Oncol* 2001;12:1139–43. PMID: 11583197.
13. Saif M., Kaley K., Brennan M. et al. A retrospective study of capecitabine/temozolomide (CAPTEM) regimen in the treatment of metastatic pancreatic neuroendocrine tumors (pNETs) after failing previous therapy. *JOP* 2013;14(5):498–501. PMID: 24018594.
14. Sarker D., Williams M., Hochhauser D. et al. 5-Fluorouracil, cisplatin and streptozocin (FCiSt): an effective new regimen for advanced pancreatic neuroendocrine tumours. *ASCO Gastrointestinal Cancers Symposium*. 2004; Abstr. 100.
15. Strosberg J., Fine R., Choi J. et al. First-line chemotherapy with capecitabine and temozolomide in patients with metastatic pancreatic endocrine carcinomas. *Cancer* 2011;117:268–75. DOI: 10.1002/cncr.25425. PMID: 20824724.
16. Turner N., Strauss S., Sarker D. et al. Chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and streptozocin for neuroendocrine tumours. *Br J Cancer* 2010;102:1106–12. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605618. PMID: 20234360.
17. Crona J., Fanola I., Lindholm D. et al. Effect of temozolomide in patients with metastatic bronchial carcinoids. *Neuroendocrinology* 2013;98(2):151–5. DOI: 10.1159/000354760. PMID: 23969949.
18. Sun W., Lipsitz S., Catalano P. et al. Phase II/III study of doxorubicin with fluorouracil compared with streptozocin with fluorouracil or dacarbazine in the treatment of advanced carcinoid tumors: Eastern Cooperative Oncology Group Study E1281. *J Clin Oncol* 2005;23:4897–904. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.616. PMID: 16051944.
19. Chan J., Stuart K., Earle C. et al. Prospective study of bevacizumab plus temozolomide in patients with advanced neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol* 2012;30(24):2963–8. DOI: 10.1200/JCO.2011.40.3147. PMID: 22778320.
20. Sorbye H., Welin S., Langer S. et al. Predictive and prognostic factors for treatment and survival in 305 patients with advanced gastrointestinal neuroendocrine carcinoma (WHO G3): the NORDIC NEC study. *Ann Oncol* 2013;24:152–60. DOI: 10.1093/annonc/mds276.
21. Fjallskog M., Granberg D. et al. Treatment with Cisplatin and Etoposide in Patients with Neuroendocrine Tumors. *Cancer* 2001;92:1101–7. PMID: 11571721.

ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПАЦИЕНТОВ С ОСЛОЖНЕННЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Л. П. Николаева¹, Д. В. Черданцев¹, К. С. Титов^{2,3}

¹ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России; Россия, 660077 Красноярск, ул. П. Железняка, 1;

² ГБУЗ «Московский клинический научный центр Департамента здравоохранения г. Москвы»; Россия, 111123 Москва, ш. Энтузиастов, 86;

³ ФГБОУ «ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова» Минздрава России; 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Людмила Петровна Николаева lpnikolaeva@yandex.ru

Введение. Увеличение численности больных с сахарным диабетом и большое количество ампутаций нижних конечностей заставляет искать новые методы лечения данных пациентов.

Материалы и методы. В исследование включено 17 пациентов с осложненной формой сахарного диабета. У пациентов исследовался костный мозг сразу же после ампутации нижней конечности. В лаборатории определяли количество гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток с использованием специфических маркеров. Проводилась иммуногистохимическая оценка всех образцов костного мозга.

Результаты и заключение. Полученные данные показывают биологическую ценность костного мозга, удаляемого при ампутации нижней конечности пациента с осложненным сахарным диабетом. Простота получения костного мозга делает эту процедуру доступной в хирургической практике. Гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки можно использовать в аутологичной клеточной терапии для пациента.

Ключевые слова: ампутация конечности, костный мозг, аутологичная клеточная терапия, стволовые клетки

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-47-50

THE CHARACTERISTIC OF BONE MARROW STEM CELLS OF PATIENTS WITH THE COMPLICATED DIABETES

L. P. Nikolaeva¹, D. V. Cherdantsev¹, K. S. Titov^{2,3}

¹ V.F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Health of Russia;
1 St. P. Zheleznyaka, Krasnoyarsk 660077, Russia;

² Moscow Clinical Research Center of Health Department of Moscow; 86 Sh. Entusiastov, Moscow 111123, Russia;

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovitianov St., Moscow, 117997, Russia

Introduction. An increase in patients with diabetes and a large number of amputations of limbs make the search for new treatments for these patients.

Materials and methods. The study included 17 patients with complicated forms of diabetes. Patients were studied in the bone marrow immediately after surgery – the amputation of the limb. The number of hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells using specific markers were determined in the laboratory. The immunohistochemical characteristics of bone marrow were carried out for all samples.

Results and conclusion. The obtained results indicate the biological value of bone marrow removed with amputation of the lower limb of the patient with complicated diabetes mellitus. The ease of obtaining bone marrow makes the procedure approachable in surgical practice. The presence of hematopoietic and mesenchymal stem cells provides the opportunity to use them in autologous cell therapy for patient.

Key words: amputation of a limb, bone marrow, autologous cell therapy, stem cells

Введение

По данным статистических исследований, каждые 10–15 лет число заболевающих сахарным диабетом удваивается. Примерно 40–60 % всех нетравматических ампутаций нижних конечностей проводится у больных с осложненным сахарным диабетом [1, 2]. Спустя 15–20 лет после начала болезни у 80 % боль-

ных сахарным диабетом ампутуются одна или обе нижние конечности [3]. В 40 % наблюдений после первой ампутации на уровне бедра или голени больные теряют подвижность и могут передвигаться только в пределах дома. С увеличением возраста больных прослеживается тенденция увеличения доли больших ампутаций: так, у лиц в возрасте от 65 до 74 лет

ампутации голени и бедра составляют 32 и 18 %, у лиц старше 75 лет – 34 и 28 % соответственно [4]. Уровень ампутации определяет летальность. Высокие ампутации приводят к ограничению социальной адаптации пациентов, существенно сокращают продолжительность жизни больных в результате поражения контралатеральной конечности и присоединения различного рода осложнений [5]. Нижняя конечность, удаляемая во время вынужденной ампутации, – важное депо костного мозга: в полости бедренной кости находится около 25 % всего костного мозга. Важной особенностью костного мозга является одновременная принадлежность 2 регуляторным системам организма – системе крови и иммунной системе, клетки которых участвуют в обеспечении адаптивных реакций [6]. В настоящее время доказано, что восстановление поврежденного органа происходит не только за счет активации органных регионарных стволовых клеток, но и за счет миграции мезенхимальных стволовых клеток из других органов, прежде всего из костного мозга, в зону повреждения. При ампутации конечности иммунная система сокращена на четверть, и то, как долго сохранится созданный иммунодефицит, зависит от индивидуальных особенностей пациента [7]. Во время вынужденной ампутации конечности важно снизить потери костного мозга.

Применение тканевых и клеточных технологий уже вышло из разряда доклинических исследований. Ближайшая задача биомедицинских исследований в этой области – применение инновационных клеточных технологий [8]. Большинство известных технологий забора костного мозга у живых лиц для последующей трансплантации ткани костного мозга [9] или выделенного концентрата стволовых клеток предполагает использование методик инвазивной трепанобиопсии [10]. Впервые мезенхимальные стволовые клетки были обнаружены именно в костном мозге [11]. В последние годы во всем мире началось интенсивное изучение стволовых клеток из различных источников. Стволовые клетки можно использовать при многих заболеваниях, в том числе при сахарном диабете. Аутологичные стволовые клетки, полученные из костного мозга, применяются для лечения заболеваний сердца [12]. Цель лечения сахарного диабета – предупреждение его осложнений, снижение уровня вводимого инсулина и нормализация уровня глюкозы в крови [13]. Уже проводятся пилотные исследования по применению аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при сахарном диабете [14]. Стволовые клетки, полученные из ампутированной конечности, можно использовать для конкретного больного с целью улучшить качество его жизни и обеспечить профилактику дальнейших осложнений сахарного диабета.

Цель исследования – количественный и качественный анализ мезенхимальных и гемопоэтических стволовых клеток в образцах костного мозга ампутированных конечностей у пациентов с осложненным сахарным диабетом.

Материалы и методы

В исследование включено 17 больных диабетом 2-го типа, осложненного синдромом диабетической стопы. Возраст пациентов – 55–65 лет. Исследуемые образцы костного мозга получали сразу же после ампутации нижней конечности. В операционной извлекали костный мозг из бедренной кости в стерильную пробирку, которую транспортировали в лабораторию.

Для анализа проходят следующие этапы:

- гомогенизация и разведение образца;
- очистка клеток костного мозга от конгломератов клеток и жировой ткани;
- анализ образцов для определения количества мезенхимальных стволовых клеток костного мозга;
- анализ образцов для определения количества гемопоэтических стволовых клеток костного мозга.

Для разрушения конгломератов клеток и перевода клеток в суспензионное состояние костный мозг подвергался мягкому гомогенированию с добавлением фосфатного буфера. Удаление конгломератов клеток и жировой ткани проводили посредством отстаивания образца в течение 10 мин, при этом жир костного мозга поднимался в верхний слой. Не затрагивая верхний слой, в новую пробирку отбирали нижнюю фазу, содержащую ядерные клетки костного мозга, и 2 раза отмывали центрифугированием при 400g в течение 5 мин в фосфатном буфере. Осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буфера, их количество подсчитывали в камере Горяева. Суспензию клеток разводили фосфатным буфером до концентрации 1×10^7 клеток/мл.

Для количественного определения гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга использовали пробирки BD Trucount™ Tubes для подсчета абсолютного количества лейкоцитов.

Для определения количества гемопоэтических стволовых клеток костного мозга анализ образцов проводили согласно рекомендации фирмы-производителя BD Biosciences. Гемопоэтические стволовые клетки должны быть положительными по маркерам CD34, CD90, CD49f. Для составления панели антител были использованы конъюгаты антител, рекомендованные фирмой-производителем BD Biosciences. Анализ выполняли на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (рис. 1).

Проведено гейтирование мезенхимальных стволовых клеток по положительной экспрессии CD90, CD105, CD73 и отрицательной – CD34, CD11b,

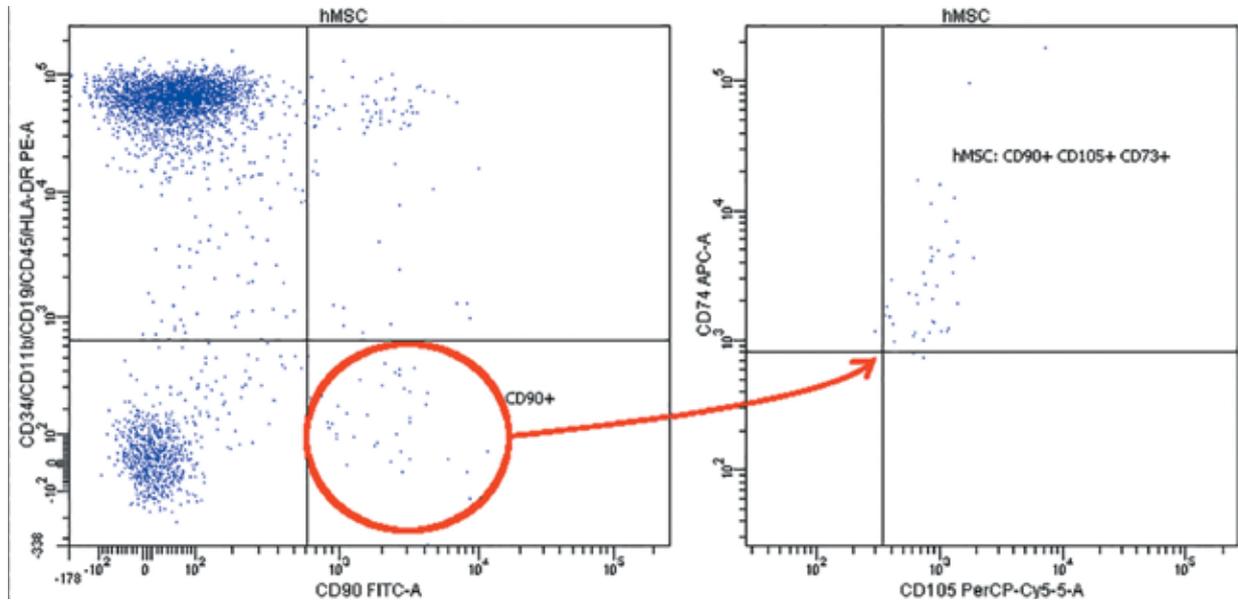


Рис. 1. Определение мезенхимальных стволовых клеток

CD19, CD45 и HLA-DR. Клетки были анализированы на проточном цитофлуориметре с использованием набора Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences).

Согласно рекомендациям Международного общества клеточной терапии, мезенхимальные клетки костного мозга должны быть положительными по маркерам CD73, CD90, CD105 и отрицательными по CD34, CD45, CD14 или CD11b, CD19 или CD796, и HLA-DR. Для определения количества мезенхимальных клеток костного мозга использовали набор Human MSC Analysis Kit (BD Biosciences). Набор содержит конъюгированные антитела к маркерам мезенхимальных стволовых клеток (FITC CD90, PerCP-Cy5.5 CD105 и APC CD73) и смесь антител отрицательного контроля (PE CD45, PE CD34, PE CD11b, PE CD19 и PE HLA-DR).

Результаты

Исследовано 15 образцов костного мозга пациентов, перенесших ампутацию нижней конечности по поводу осложненного течения сахарного диабета. Количество полученного костного мозга зависит от уровня ампутации, который определялся индивидуально [9]. Наибольшее количество костного мозга (до 200–250 мл) получали при ампутации конечности на уровне верхней трети бедра. Количество клеток в костном мозге зависит от количества костного мозга и составляло примерно от 0,5 до 75,0 млн клеток. Содержание мезенхимальных стволовых клеток костного мозга составляло от 0,3 до 0,9 %, гемопоэтических стволовых клеток костного мозга – от 0,01 до 0,8 %. В среднем содержание мезенхимальных и гемопоэтических клеток в костном мозге ампутированной конечности одинаково, незначительно

преобладают мезенхимальные клетки. Стоит отметить, что содержание стволовых клеток в костном мозге бедренной кости не зависит от возраста. Сравнение количества стволовых клеток в костном мозге у больных пожилого возраста и молодых пациентов, когда ампутация конечности проводилась вследствие травматического повреждения конечности и невозможности ее сохранить, показало отсутствие большого отличия.

Имуногистохимическая характеристика костного мозга

При проведении иммуногистохимического анализа костного мозга трубчатых костей было установлено, что клеточность костного мозга составляет в среднем от 50 до 80 % в различных участках. В участках клеточного строения костного мозга определяются клетки реактивного окружения, представленные расположенными вблизи капилляров гистиоцитами, эозинофилами, плазматическими клетками, единичными тучными клетками. Иммуногистоархитектоника костного мозга сохранена.

Определяются многочисленные клетки гранулопоэза различной степени зрелости со смещением в сторону незрелых промежуточных форм. Клетки эритропоэза представлены небольшими скоплениями эритробластов, формирующих эритропоэтические островки, состоящие из различных клеточных форм; в составе части скоплений определяются клетки макрофагального ряда. Мегакарициты имеют морфологию зрелых клеток, распределены в центральных отделах костномозговых ячеек, часто вблизи сосудов синусоидного типа, без формирования кластеров. Лимфоидные элементы распределены диффузно,

не формируют скоплений и агрегатов, имеют морфологию типа малого лимфоцита. Сосуды синусоидного типа содержат дифференцированные клеточные формы. При иммуногистохимическом исследовании в образцах определяются экспрессирующие CD34 клетки с мононуклеарной морфологией, распределенные дискретно, без кластерообразования. При 400-кратном увеличении в костном мозге бедренной кости число CD34⁺ клеток составляет в среднем 6–8 клеток в поле зрения (рис. 2), в костном мозге подвздошной кости – в среднем 3–4 клетки в поле зрения.

Заключение

Полученные данные показывают биологическую ценность костного мозга, удаляемого при ампутации нижней конечности у пациента с осложненным сахарным диабетом. Благодаря простоте получения костного мозга доступно в хирургической практике. Гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки можно использовать в аутологичной клеточной терапии пациента. Клеточные технологии развиваются стремительно и возможности применения стволовых клеток костного мозга при различных заболеваниях, в том числе для аллогенной клеточной терапии,

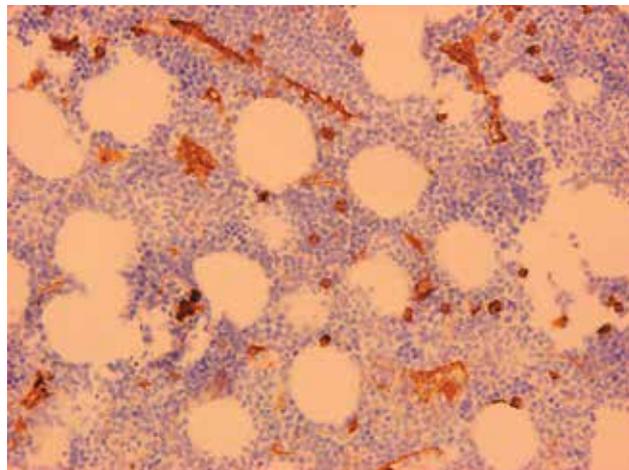


Рис. 2. Иммуногистохимическое исследование костного мозга бедренной кости с антителами к CD34 с окрашиванием гематоксилином, $\times 400$

расширяются очень быстро. В хирургической практике клеточная терапия становится реальной.

Данная работа выполнена при содействии Красноярского краевого фонда поддержки научной и научно-технической деятельности.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Николаева Л. П., Черданцев Д. В., Степаненко А. В., Дятлов В. Ю. Изменение состояния антиоксидантной системы у больных с синдромом диабетической стопы. *Фундаментальные исследования* 2010;11:95–7.
2. Питерс-Хармел Э., Матур Р. Сахарный диабет: диагностика и лечение. М.: ИД «Практика», 2008. 496 с.
3. Barc P., Skora J., Pupka A. Bone-marrow cells in therapy of critical limb ischaemia of lower extremities – own experience. *Acta Angiolog* 2006;12(4):155–66.
4. Пальцев М. А. Медицина XXI века в свете клеточной биологии. *Вестн. РАМН* 2004;9:3–11.
5. Norgren L., Hiatt W.R., Dormandy J.A. et al. Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007;45 (suppl S): S5–67. DOI: 10.1016/j.jvs. 2006.12.037. PMID: 17223489.
6. Bruder S.P., Fink D.J., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem* 1994;56:283–94. DOI: 10.1002/jcb.240560303. PMID: 7876320.
7. Gu Y.Q., Zhang J., Guo L.R. et al. Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells for patients with lower limb ischemia. *Chin Med J* 2008;121(11):963–7. PMID: 18706241.
8. Weaver C.V., Garry D.G. Regenerative biology: a historical perspective and modern applications. *Regen Med* 2008;3:63–82. DOI: 10.2217/17460751.3.1.63. PMID: 18154463.
9. Krause J. Bone marrow overview. In: Rodak B., ed. *Hematology: Clinical Procedures and Applications*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. P. 188–195.
10. Сисла Б. Руководство по лабораторной гематологии. Пер. с англ. Под общ. ред. А. И. Воробьева. М.: Практическая медицина, 2011. 352 с.
11. Jamshidi K., Swaim W.R. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: A new biopsy device. *J Lab Clin Med* 1971;77:335. PMID: 5540776.
12. Shake J.G., Gruber P.J., Baumgartner W.A. et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–56. PMID: 12078791.
13. Lu D., Chen B., Liang Z. et al. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 2011;92(1):26–36. DOI: 10.1016/j.diabres. 2010.12.010. PMID: 21216483.
14. Packham D.K., Fraser I.R., Kerr P.G., Segal K.R. Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells (MPC) in Diabetic Nephropathy: A Randomized, Placebo-controlled, Dose Escalation Study. *EBioMedicine* 2016;9:1–7. DOI: 10.1016/j.ebiom.2016.09.011. PMID: 27743903. PMID: PMC5078602.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОРТОТОПИЧЕСКОГО РОСТА РАКА ПОЧКИ ЧЕЛОВЕКА С ПЕРЕВИВАЕМЫМ ШТАММОМ РПОЧ1 НА ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШАХ

Н. В. Андропова, С. М. Ситдикова, Л. Ф. Морозова, Н. Т. Райхлин, И. А. Букаева, И. Ж. Шубина,
М. В. Киселевский, Е. М. Трещалина

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

Контакты: Елена Михайловна Трещалина treshalina@yandex.ru

Введение. Разработка новых ортотопических моделей опухолевого роста (*surgical orthotopic implantation, SOI*) открывает возможность доклинического изучения потенциального антиметастатического действия препаратов, в том числе направленных на лечение диссеминированного светлоклеточного рака почки, с использованием в качестве имплантата фрагмента опухоли или метастаза от пациента. Использование подкожного (*п/к*) ксенографта открывает возможность оптимизации *SOI* с расширением возможностей применения в эксперименте. Наличие *п/к* ксенографта РПОЧ1, охарактеризованного трансплантационно, морфологически, иммунологически и по чувствительности к классическим противоопухолевым цитостатикам в коллекции опухолевых штаммов ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Минздрава России, позволяет получить ортотопическую модель для полифункционального применения при доклиническом изучении новых специфических лекарств.

Цель исследования — подготовка и получение доклинической ортотопической модели светлоклеточного рака почки человека с имплантатом в виде *п/к* ксенографта РПОЧ1.

Материалы и методы. Использованы *п/к* РПОЧ1 и иммунодефицитные мыши-самки *Valb/c nude* разведения РОНЦ. Трансплантационные характеристики определены при пассировании имплантата в паренхиму почки. О результативности ортотопической имплантации в динамике судили по кинетическим, патоморфологическим и иммунологическим характеристикам с применением методов световой микроскопии, проточной цитофлуориметрии и моноклональных антител (МКА, *Caltag Laboratories*) против соответствующих антигенов. Лекарственная чувствительность оценена по отношению к ингибиторам тирозинкиназ по стандартным показателям ($T/C \leq 42\%$, число полных регрессий).

Результаты. При ортотопической имплантации РПОЧ1 на 7, 14 и 21 с получены опухолевые узлы размерами $5,0 \pm 1,0 \text{ мм}^3$, $215,0 \pm 88,0 \text{ мм}^3$ и $608,0 \pm 157,0 \text{ мм}^3$. Гистологически опухоль представлена разделенными соединительно-тканными прослойками, солидными полями крупных полиморфных клеток с митозами (10–15 в 1 очаге) и единичными очагами некрозов на 21 с. Повышенный в 1,5 раза на 14-е сутки у мышей уровень экспрессии *NK1.1* и в 3,3 раза уровень *CD8a* свидетельствуют о тенденции к развитию индуцированной опухолевым ростом иммуносупрессии. Показана высокая чувствительность РПОЧ1 к сорафенибу и сунитинибу ($T/C_{\min} = 2–30\%$).

Заключение. Получен ортотопический ксенографт светлоклеточного рака почки человека РПОЧ1 со 100 % прививаемостью, воспроизводимыми биологическими, иммунологическими, характеристиками и чувствительностью к ингибиторам тирозинкиназ, пригодный для доклинического изучения различных средств, в том числе иммунологических, или комбинаций, направленных на лечение этой патологии.

Ключевые слова: ортотопический имплантат, рак почки человека

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-51-60

MODELING OF ORTHOTOPICAL GROWTH OF HUMAN KIDNEY CANCER WITH SUBCUTANEOUS XENOGRAFTS RPOCH1 ON IMMUNODEFICIENT MICE

N. V. Andronova, S. M. Sitdikova, L. F. Morozova, N. T. Raichlin, I. A. Bukaeva, I. Zh. Shubina, M. V. Kiselevsky, H. M. Treshalina
N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Introduction. Creation of new orthotopic models of tumor growth (*surgical orthotopic implantation, SOI*) promotes pre-clinical studies of anti-metastatic functional potential of the drugs including those which aim to treat advanced clear-cell renal carcinoma with the use of patient's tumor or metastasis sample for implantation material. The use of subcutaneous (*s. c.*) xenograft contributes to *SOI* improvement and extends experimental opportunities. The collection of tumor strains of N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center that includes *s. c.* xenograft RPOch1, which was characterized by transplantation, pathological, and immunological parameters and in terms of sensitivity towards classical antitumor cytostatics, presents the base for obtaining an orthotopic model for multifunctional usage in pre-clinical studies of specific medicines.

Objective. Preparation and obtaining an orthotopic model of human clear-cell renal carcinoma with the implant of subcutaneous xenograft RPoch1.

Materials and methods. The study used s. c. RPoch1 and immunodeficient female mice Balb/c nude on the N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center breeding. Transplantation characteristics were defined during implant passages into kidney parenchyma. The effectiveness of orthotopic implantation was estimated in the dynamics according to kinetic, pathological, morphological, and immunological parameters by light microscopy, flow cytometry, monoclonal antibodies (mAb, Caltag Laboratories) against corresponding antigens. Sensitivity to specific drugs was assessed against inhibitors of tyrosine kinases according to standard parameters ($T/C \leq 42\%$, total regressions).

Results. After orthotopic implantation of RPoch1 on days 7, 14 and 21 the tumor lesions were registered with the size of $5.0 \pm 1.0 \text{ mm}^3$, $215.0 \pm 88.0 \text{ mm}^3$ and $608.0 \pm 157.0 \text{ mm}^3$. Histological examination showed that the tumor had separated connective tissue layers of solid areas of large polymorphic cells with mitosis (10–15 in a lesion) and single areas with necrosis on day 21. The 1.5-fold enhanced expression of NK1.1 in mice on day 14 and 3.3-fold increase of CD8a expression demonstrate the tendency to develop immune suppression induced by growing tumor. The results showed high sensitivity of RPoch1 to sorafenib and sunitinib ($T/C_{\min} = 2–30\%$).

Conclusion. The authors obtained an orthotopic xenograft of human clear-cell renal carcinoma RPoch1 with 100% transplantation potential, reproducible biological characteristics including immunological parameters and sensitivity to inhibitors of tyrosine kinases, which can be used for pre-clinical studies of various agents including immunological or different combinations of antitumor drugs against this cancer type.

Key words: orthotopic implant, human kidney cancer

Введение

Ортоотопические ксенографты получают, как правило, путем имплантации *ex tempore* фрагментов опухолей человека (операционный материал) разных локализаций иммунодефицитным мышам в тот орган, из которого получены (хирургическая ортоотопическая имплантация, surgical orthotopic implantation, SOI). SOI используют на завершающем этапе доклинического изучения новых противоопухолевых препаратов для оценки действия на метастазирование или на клиническом этапе в рамках программы прогноза индивидуальной лекарственной чувствительности пациента в раннем послеоперационном периоде (колоректальный рак) [1]. Однако прогноз лекарственной чувствительности на этой модели оправдан только для противоопухолевых цитостатиков и существенно ограничен для иммунотерапевтических или таргетных средств [2]. Недостатком метода является также отсутствие гарантированной 100% ортоотопической имплантации операционного материала, так как имплантат в силу случайной выборки фрагмента опухоли может не содержать необходимого для опухолевого роста пула пролиферирующих клеток при смене микроокружения. Как правило, не представляется возможным повторно взять материал у пациента. Использование опухолевого материала с воспроизводимыми трансплантационными и биологическими характеристиками, например подкожного (п/к) ксенографта для получения ортоотопической модели, позволило бы оптимизировать SOI. Не удалось найти подобные эксперименты в тематической литературе.

Нами апробирована возможность получения ортоотопической модели рака почки человека с использованием п/к ксенографта RPoch1 из коллекции ФГБУ «Российский онкологический онкологический

центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России. Ксенографт получен из удаленного опухолевого узла пациента РОНЦ им. Н.Н. Блохина [3]. Важно также, что в коллекции есть депонированная во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов оригинальная клеточная линия RPoch1 (рег. № Н-165). Такая тест-система выигрышна еще и потому, что позволяет оценить антипролиферативное действие агента или комбинации последовательно на 1 модели *in vitro* / *in vivo*. Наиболее ценными являются оценка чувствительности модели к современному стандарту лечения (ингибиторам тирозинкиназ) и наличие онкомишени для апробации инновационных таргетных средств, например STLA-4 – ключевой мишени иммунологического надзора (immune checkpoint blockade) для аналогов ипилимумаба [4].

Штамм RPoch1 имеет строение трабекулярно-папиллярной светлоклеточной аденокарциномы с узелками папиллярного рака. PAS+–окрашивание четко прослеживает базальные мембраны, на которых расположен многоядный и цилиндрический эпителий. Опухоль характеризуется общей продолжительностью клеточного цикла 28,2 ч со следующей продолжительностью фаз: $G_1+1/2M$ – 8,5 (8,3–8,9) %, S – 14,9 (14,6–15,3) %, $G_2+1/2M$ – 4,8 (4,7–5,0) %. Пролиферативный пул в момент перевивки: 21,0 (20,4–23,1) % клеток. Уровень синтеза ДНК в клетках, определенный по интенсивности радиоактивной метки (импульс/минута): ^3H -тимидин – 759 (629–1003), ^3H -дезоксисуридин – 896 (805–1200). В опухоли определяются гормональные рецепторы человека к андрогенам (114,0), выражена экспрессия онкогенов *sis*, *p53*, *c-myc* и *myb*. П/к ксенографт отличается отсутствием чувствительности к классическим противоопухолевым цитостатикам: дактиномицину, блеомицину,

метотрексату, проспидину, гексаметилмеламину, винбластину, 5-фторурацилу, адриамицину и CCNU. Чувствительность к ингибиторам тирозинкиназ, современному стандарту лечения, ранее не определялась. В связи с этим целесообразно оценить состояние иммунологического надзора у мышей Balb/c nude с РПоч1 для изучения средств иммунотерапии и дополнить характеристику лекарственной чувствительности к ингибиторам тирозинкиназ. Полученные данные можно экстраполировать на ортотопическую модель, поскольку у клеток метастатических узлов и первичной опухоли лекарственная чувствительность идентична. С учетом иммунопривилегированной зоны подкапсульного пространства почки и для адекватного неоангио- и васкулогенеза имплантацию следует выполнять в паренхиме органа.

Приведенные выше свойства светлоклеточного рака почки человека РПоч1 *in vivo* открывают возможность модификации SOI, направленной на получение доклинической ортотопической модели с использованием п/к ксенографта. Полученная модель может применяться для прогноза эффективности различных фармакологических средств лечения первичного или метастатического светлоклеточного рака почки человека. В соответствии с этим сформулированы цель и задачи исследования.

Цель исследования — подготовка и получение доклинической ортотопической модели светлоклеточного рака почки человека с имплантатом в виде п/к ксенографта РПоч1.

Задачи:

- оценка чувствительности п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ;
- определение основных характеристик ортотопического роста п/к ксенографта РПоч1 человека в почке мышей Balb/c nude с патоморфологической идентификацией;
- определение показателей иммунологического надзора при ортотопическом росте п/к рака почки человека РПоч1 у мышей Balb/c nude.

Материалы и методы

Оценка чувствительности подкожного ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ

П/к ксенографт перевиваемого рака почки человека РПоч1 трансплантировали по стандартной методике всем взятым в опыт животным, которых ранжировали по группам. Одну из групп оставляли без специфического лечения и считали контрольной. Остальные группы получали ингибиторы тирозинкиназ, входящие в стандарты лечения диссеминированного рака почки человека [5–8].

Использованные препараты:

- нексавар (сорафениб, Bayer Health Care AG, Bayer Schering Pharma AG, Германия), 1 упаковка, содержащая 112 таблеток по 200 мг;
- сутент (сунитиниб, Pfizer, США, Pfizer Italia, Италия), 1 флакон, содержащий 30 капсул по 12,5 мг, и 2 упаковки, содержащие по 28 капсул по 25 мг.

Препараты вводили мышам перорально металлическим зондом в оптимальных схемах применения. Проведено по 1 циклу лечения с сорафенибом или сунитинибом. Кроме того, выполнено последовательное лечение сорафенибом и сунитинибом для моделирования клинической ситуации, при которой сунитиниб назначают во 2-й линии после малоэффективного курса сорафениба в 1-й линии лечения.

Один цикл лечения включал 15-дневный курс введения сорафениба или 10-дневный курс сунитиниба с началом через 72 ч после трансплантации опухоли. Две линии лечения выполняли последовательно, применяя цитостатики при перекрывающейся экспоненциальную фазу роста опухоли сокращенной схеме лечения и уменьшенных соответственно суммарных дозах препаратов. Первую линию лечения начинали через 72 ч после трансплантации опухоли, 2-ю — сразу после окончания 1-й, т. е. на 8-е сутки после трансплантации опухоли.

Для проведения экспериментов составлены следующие группы численностью 10–15 мышей:

- группа 1 — контроль роста опухоли;
- группа 2 получала 1 цикл лечения сорафенибом в желудок ежедневно 15 дней, суммарные дозы — 150–450 мг/кг;
- группа 3 получала 1 цикл лечения сунитинибом в желудок ежедневно 10 дней, суммарные дозы — 200–800 мг/кг;
- группа 4 получала 2 линии лечения ежедневно по 5 дней сорафенибом в желудок в суммарной дозе 50 мг/кг (1-я линия) + сунитиниб в суммарной дозе 100 мг/кг (2-я линия). Общая продолжительность 2 линий лечения — 10 дней.

Оценку эффективности проводили с использованием стандартных показателей Т/С, % (treatment/control, критерий Т/С ≤ 42 % [2]) и числа полных регрессий в сравнении с контролем. Для вычисления показателей многократно измеряли объем опухоли, рассчитывая индивидуальный и средний объемы в каждой группе.

Оценка переносимости лечения выполнена путем визуального контроля за поведением и состоянием животных в процессе и после лечения, а также по результатам аутопсии внутренних органов.

По завершению экспериментов все животные были умерщвлены передозировкой эфирного наркоза с соблюдением принятых в международной практике гуманных методов.

Биологические характеристики ортотопического роста РПоч1

О результативности ортотопической имплантации судили по кинетическим и патоморфологическим характеристикам. Материал для трансплантации получали из 3-го пассажа п/к ксенографта рака почки человека РПоч1 иммунодефицитным мышам Balb/c nude [3, 9]. Фрагмент опухолевого узла объемом 1,0 мм³, извлеченного у наркотизированной мыши при соблюдении правил асептики и антисептики, использовали *ex tempore* в качестве материала для ортотопической трансплантации. В условиях билатерального ламинара мышей-реципиентов ($n = 30$), находящихся под золотильным наркозом, фиксировали на операционном столике. Кожу обрабатывали 70 % раствором этилового спирта и делали разрез в поясничной области. Кожу отсепарировали, вскрывали заднюю брюшную стенку между веточками поясничных нервов над просвечивающей почкой. Почку захватывали мягким малым глазным пинцетом и в области задней поверхности верхнего полюса делали брюшистым скальпелем разрез глубиной 2–3 мм, через который помещали в паренхиму почки заранее приготовленный фрагмент для трансплантации. Мышцы и кожу послойно ушивали непрерывным швом. После трансплантации за мышами наблюдали в течение 28 дней с ежедневным контролем поведения и состояния.

Кинетику роста РПоч1 в почке определяют по среднему объему опухолевого узла на 7-е ($n = 10$), 14-е ($n = 10$) и 21-е ($n = 10$) сутки после трансплантации опухоли. Мышей умерщвляли дислокацией шейных позвонков, извлекали почку с опухолью и измеряли объем опухолевого узла в 3 проекциях ($V_{cp} = a \times b \times c$).

Патоморфологическое исследование опухолевых узлов в почке на 14-е и 21-е сутки после трансплантации проводили методом световой микроскопии (Polivar, Австрия) окрашенных гематоксилином и эозином срезов.

Статистический анализ данных выполняли с помощью стандартного метода Фишера.

Методика иммунологического исследования

Иммунологическое исследование касалось оценки поверхностных маркеров спленоцитов мышей с ортотопически трансплантированным перевиваемым раком почки человека РПоч1 ($n = 5$). Использован метод проточной цитофлуориметрии с лазерным проточным цитометром FACSCanto II™ (Becton Dickinson & Co, США) с программным пакетом BD FACSDiva [10]. Уровень экспрессии поверхностных маркеров изучаемых клеток определяют при помощи моноклональных антител (МКА, Caltag Laboratories)

против соответствующих антигенов в сравнении с интактными животными ($n = 5$).

Мышечные спленоциты отмывают холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 1 % фетальной телячьей сывороткой (ФТС) и инкубируют с МКА, конъюгированными с красителем флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) или фикоэритрином (PE) согласно инструкции производителя. Отмывают 2 раза холодным ФСБ с 1 % ФТС. Клетки фиксируют в ФСБ, содержащем 1 % раствор параформальдегида. На проточном цитометре определяют уровень экспрессии дифференцировочных антигенов лимфоцитов CD3, CD4, CD8a, CD19, NK1.1, активационных антигенов CD38, молекул главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, МНС) класса II; костимулирующих молекул CD40, CD80/B7–1, CD86/B7–2. Данные анализируют после выделения соответствующего гейта клеточной популяции в режиме dot/plot – распределения клеток по их линейному прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию. При учете результатов подсчитывают 5000 событий в гейте. Данные представляют процентное содержание клеток, экспрессирующих определенный маркер, в общем пуле гейтированных клеток.

Результаты

Оценка чувствительности подкожного ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ

Показано, что п/к ксенографт перевиваемого рака почки человека РПоч1 обладает высокой чувствительностью к противоопухолевой химиотерапии ингибиторами тирозинкиназы – сорафенибом и сунитинибом.

Сорафениб при 15-кратном курсе в разовых дозах 10–30 мг/кг (суммарно 150–450 мг/кг) вызывал достоверный противоопухолевый эффект в течение 9 дней после окончания введения, $T/C_{min} = 9–28$ %. Переносимость лечения была удовлетворительной при разовой дозе 10 мг/кг (суммарно 150 мг/кг), более высокие дозы были эффективными, но сопровождалась токсичностью (табл. 1).

Сунитиниб при 10-кратном курсе в разовых дозах 20–80 мг/кг (суммарно 200–800 мг/кг) также был эффективен и приводил к $T/C_{min} = 2–23$ %, достоверному лишь на 1 срок при разовой дозе 40 мг/кг (суммарно 400 мг/кг). При разовых дозах 40 и 80 мг/кг сунитиниб вызывал дозозависимую гибель мышей после 5 приемов препарата в рамках 10-кратного курса с характерными для препарата побочными эффектами (окраской кожных покровов) (табл. 2).

При проведении 2 линий лечения с последовательным применением сорафениба и сунитиниба 5-кратным курсом на 5-е сутки после окончания лечения получено достоверное ингибирование роста

Таблица 1. Чувствительность п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к сорафенибу

Группа	Разовая доза*	Средний объем опухоли на сутки после трансплантации			Т/С, %, на сутки после окончания лечения			Гибель от токсичности
		18	22	26	1	5	9	
Контроль (вода)	0,3 мл	335 (83–587)	509 (109–909)	1032 (840–1225)	100	100	100	–
Сорафениб	10 мг/кг	31 (8–175)	137 (87–187)	288 (175–490)**	9	27	28**	0/10
	20 мг/кг	51 (18–84)	94 (26–162)	154 (64–528)**	15	18	15**	2/10 10 с
	30 мг/кг	57 (24–90)	90 (50–130)	324 (27–504)**	17	18	31**	7/10*** 8, 13 с

*Лечение ежедневно на 3–18-й дни после трансплантации опухоли, ** $p < 0,05$; ***картина гибели – уменьшение массы селезенки, дистрофия печени; $n = 10$.

опухоли, Т/С = 30 % ($p < 0,05$). Этот эффект удерживался до 14 сут на уровне Т/С = 27–33 % ($p < 0,05$) (табл. 3, 4).

Определение основных характеристик ортотопического роста п/к ксенографта РПоч1 человека в почке мышей Balb/c nude с патоморфологической идентификацией.

Развитие опухолевых узлов перевиваемого рака почки человека РПоч1 в почке иммунодефицитных мышей Balb/c nude демонстрируют следующие рисунки. На рис. 1 показана массовая доля опухоли по отношению к ткани почки в течение 3 нед после трансплантации. Опухолевые узлы в почке визуализируются уже на 7-е сутки после ортотопической трансплантации фрагментов объемом 1,0 мм³, которые занимают не более 1/5–1/7 почки. На 14-е сутки после трансплантации опухолевые узлы занимают более половины ткани почки либо практически одинаковой с ней величины. Значимой динамики до 21-х суток не выявлено.

Кинетика роста опухолевых узлов РПоч1 в почке в течение 3 нед после трансплантации представлена в табл. 5. Видно, что на 7-е сутки опухолевые узлы достигают 9,0 мм³, $V_{cp} = 5,0 \pm 1,0$ мм³. На 14-е сутки после трансплантации максимальный объем опухолевых узлов составил 486,0 мм³ при $V_{cp} = 215,0 \pm 88,0$ мм³.

Кинетика роста опухолевых узлов РПоч1 в почке в течение 3 нед после трансплантации представлена в табл. 5. Видно, что на 7-е сутки опухолевые узлы достигают 9,0 мм³, $V_{cp} = 5,0 \pm 1,0$ мм³. На 14-е сутки после трансплантации максимальный объем опухолевых узлов составил 486,0 мм³ при $V_{cp} = 215,0 \pm 88,0$ мм³.

Таблица 2. Чувствительность п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к сунитинибу

Группа	Разовая доза*	Средний объем опухоли, мм ³ , на сутки после трансплантации			Т/С, %, на сутки после окончания лечения			Гибель от токсичности		
		18	22	26	5	9	13	Число павших	Сутки по отношению к лечению	
									после начала	после окончания
Контроль	Вода 0,3 мл	335 (83–587)	509 (109–909)	1032 (840–1225)	100	100	100	–	–	–
Сунитиниб	20 мг/кг	43 (б. разброс)	279 (б. разброс)	437 (33–841)	13	55	43	3/10	7	2–4
					$n = 7$					
Сунитиниб	40 мг/кг	21 (б. разброс)	39 (б. разброс)	148 (45–392)**	6	8	14**	7/10***	10	5, 8, 12
					$n = 3$					
Сунитиниб	80 мг/кг	77	330	672	23	65	65	8/10***	1, 5	1, 8
					$n = 2$					

*Лечение ежедневно на 3–12-й дни после трансплантации опухоли. ** $p < 0,05$. *** При дозе 40 мг/кг после 5 введений появилась интенсивная желтовато-зеленоватая окраска кожных покровов; картина гибели: понос, окраска кожных покровов и органов брюшной полости (кишечника, передней брюшной стенки, признаки геморрагического колита), уменьшение массы селезенки, дистрофия печени. *** При дозе 40 мг/кг некоторое уменьшение массы тела, слабая желтовато-зеленоватая окраска кожных покровов; картина гибели: уменьшение массы селезенки, раздражение кишечника; при дозе 80 мг/кг после 5 введений появилась интенсивная желтовато-зеленоватая окраска кожных покровов; картина гибели: понос, интенсивная окраска кожных покровов и органов брюшной полости (кишечника, передней брюшной стенки, признаки геморрагического колита), уменьшение массы селезенки, раздражение кишечника, дистрофия печени.

Таблица 3. Чувствительность п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к последовательному лечению сорафенибом и сунитинибом

Группа	Режим лечения	Средний объем опухоли (мм ³) на сутки после трансплантации опухоли				Т/С, %, на сутки после окончания лечения			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Контроль	Вода 0,3 мл 10 дн.	926 (824–1028)	1058 (915–1201)	1246 (1159–1333)	1526 (1430–1622)	100			
Сорафениб + сунитиниб	10 × 5 20 × 5	276 (228–324)	288 (226–350)	343 (281–405)	504 (404–604)	30*	27*	28*	33*

Примечание. Отличие от контроля достоверно, * $p < 0,05$. Контроль: измерения опухолей после перевивки (сутки): 1–18, 2–20, 3–22, 4–27. Расчет Т/С, % (сутки после окончания лечения): 1, 3, 5, 10.

Таблица 4. Воспроизводимость чувствительности п/к ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 к ингибиторам тирозинкиназ

Группы	Разовая доза*	Средний объем опухоли на сутки после трансплантации				Т/С, %, на сутки после окончания лечения			
		18	20	22	27	1	3	5	10
Контроль	Вода 0,3 мл	1068 (868–1268)	1341 (1161–1521)	1418 (1242–1594)	2015 (1801–2229)	100			
1-й опыт: сорафениб + сунитиниб	10 × 5 20 × 5	276 (228–324)	288 (226–350)	343 (281–405)	504 (404–604)	30*	27*	28*	33*
2-й опыт: сорафениб + сунитиниб	10 × 5 20 × 5	374 (276–472)	388 (292–484)	397 (319–475)	605 (515–695)	35*	29*	28*	30*

Примечание: $n = 10–12$, лечение ежедневно на 3–18-й дни после трансплантации опухоли, * $p < 0,05$.

На 21-е сутки максимальный объем опухолевых узлов составил 936,0 мм³ при $V_{cp} = 608,0 \pm 157,0$ мм³.

Гистологическая картина опухолевых узлов РПоч1 в ткани почки на 14-е и 21-е сутки после трансплантации показала следующее. На 14-е сутки после ортотопической трансплантации рака почки человека РПоч1 в ткани почки различаются корковый

и мозговой слои (рис. 2). В корковом слое видны почечные тельца (клубочки), окруженные тонкой капсулой и содержащие мелкие кровеносные сосуды (капилляры). Клубочки окружены большим количеством извитых канальцев, являющихся частью нефрона. В мозговом слое преобладают продольно расположенные канальцы. В почке имеются кровеносные сосуды, местами полнокровные. Почка окружена капсулой. В ткани почки обнаружены 1–2 участка разрастания опухоли. Эти участки мелкие, располагаются под капсулой, состоят из полиморфных опухолевых клеток, растущих в виде солидных полей. В отдельных участках опухоли встречаются единичные митозы. На 21-е сутки после трансплантации опухолевые разрастания крупные, занимают большую часть ткани почки. Ее сохранившиеся участки содержат извитые и прямые канальцы, почечные клубочки, кровеносные сосуды. Местами почечная ткань сдавлена. Опухоль состоит из крупных полиморфных клеток, образующих солидные поля, которые в некоторых местах разделены тонкими соединительно-тканными прослойками, имеются единичные мелкие очаги некрозов. Во многих участках опухоли встречаются митозы, их количество достигает 10–15 в 1 очаге.

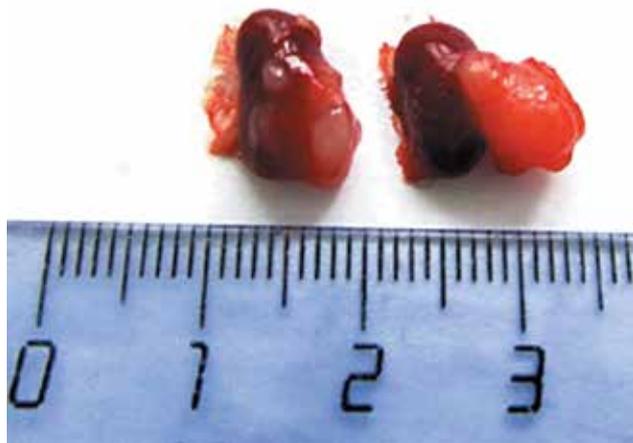


Рис. 1. Опухолевые узлы ортотопического ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 на 14-е сутки после трансплантации, максимальный объем 486,0 мм³

Результаты морфологического исследования дают основание считать, что период между 14-ми и 21-ми сутками опухолевого роста в почке является наиболее благоприятным для проведения терапии, направленной на подавление цитопролиферации ортотопической опухоли.

Определение показателей иммунологического надзора при ортотопическом росте подкожного рака почки человека РПоч1 у мышей Balb/c nude

Иммунологические показатели мышей Balb/c nude с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 представлены в табл. 6 и на рис. 3 и 4. Результаты иммунофенотипирования спленцитов селезенки иммунодефицитных мышей с ортотопически трансплантированным ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 представлены в табл. 6. Видно, что на 14-е сутки после трансплантации уровень экспрессии маркеров иммунитета у мышей возрастает: NK1.1 – в 1,5 раза, CD8a – в 3,3 раза. Показатели активации макрофагального звена и маркеры активационных антигенов CD38 и MHC II свидетельствуют о тенденции к снижению числа клеток, экспрессирующих эти антигены.

Рисунок в формате DotPlot: ось x, y – логарифмическая шкала, интенсивность флуоресценции MFI представляет экспрессию поверхностных клеточных маркеров, конъюгированных с FITC или PE.

Полученные данные свидетельствуют о том, что на фоне некоторого оживления исходно дефектного врожденного иммунитета гибридных иммунодефицитных мышей Balb/c nude ортотопический ксено-

Таблица 5. Кинетика роста ортотопического ксенографта перевиваемого рака почки человека РПоч1 у иммунодефицитных мышей Balb/c nude

Номер мыши	Объем опухоли (мм ³), 1 пассаж на сутки после имплантации фрагмента			
	7	14	21	28
1	3,0	270,0	840,0	2808,0
2	3,0	160,0	420,0	2244,0
3	3,0	486,0	936,0	–
4	9,0	288,0	280,0	–
5	4,0	120,0	539,0	–
6	3,0	120,0	448,0	–
7	6,0	210,0	504,0	–
8	6,0	192,0	864,0	–
9	6,0	140,0	648,0	–
10	4,0	168,0	–	–
Среднее арифм.	5,0 ± 1,0	215,0 ± 88,0	608,0 ± 157,0	2526,0 ± 750,0

Примечание. Прочерк означает, что исследование не проводилось.

графт перевиваемого рака почки человека РПоч1 в стадии активной пролиферации вызывает иммунодепрессию, характерную для начала диссеминированного процесса.

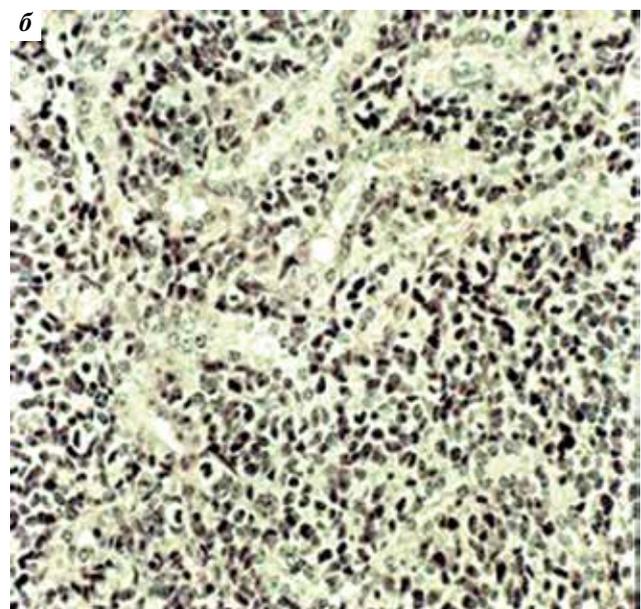
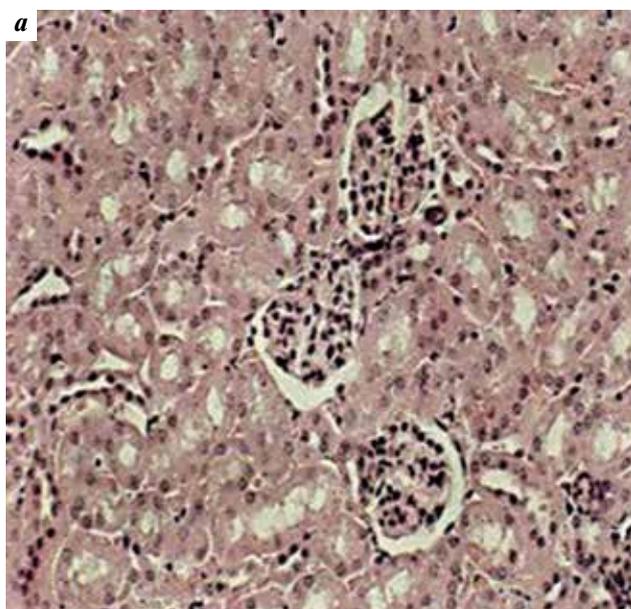


Рис. 2. Почка с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 на 14-е сутки после трансплантации, ×200

Таблица 6. Субпопуляции спленоцитов, экспрессирующих поверхностные антигены у иммунодефицитных мышей *Valb/c nude* с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1

Маркер	Интактные животные (M ± m)	Животные с трансплантированным раком почки РПоч1 (M ± m)
CD3	0,0	0,0
CD4	0,0	0,0
CD8a	3,8 ± 1,6	12,4 ± 1,1
NK1.1	4,5 ± 1,6	6,9 ± 1,7
CD19	25,3 ± 3,7	21,8 ± 2,9
CD40	51,3 ± 4,4	41,8 ± 1,6
CD80	6,5 ± 2,9	9,0 ± 2,2
CD86	43,4 ± 2,6	30,1 ± 3,2
CD38	44,0 ± 3,1	40,2 ± 2,4
МНС II	24,4 ± 1,6	13,1 ± 1,5

Примечание. Поверхностные клеточные маркеры: CD3 – зрелые T-лимфоциты; CD4 – T-хелперы; NK1.1 – натуральные киллеры; CD8a экспрессируется на НК-клетках, есть данные об экспрессии на незрелых дендритных клетках (ДК); CD19 – В-лимфоциты; CD40 – ко-стимулирующая молекула антигенпрезентирующих клеток (АПК); CD80 – ко-стимулирующая молекула АПК, может экспрессироваться на активированных В-лимфоцитах; CD86 – ко-стимулирующая молекула АПК, может экспрессироваться на активированных В-лимфоцитах; CD38 – активационный антиген, экспрессируется на НК-клетках, В-лимфоцитах; МНС II – молекула гистосовместимости II класса, ограниченно экспрессируется на клетках некоторых типов, включая дендритные клетки и В-лимфоциты.

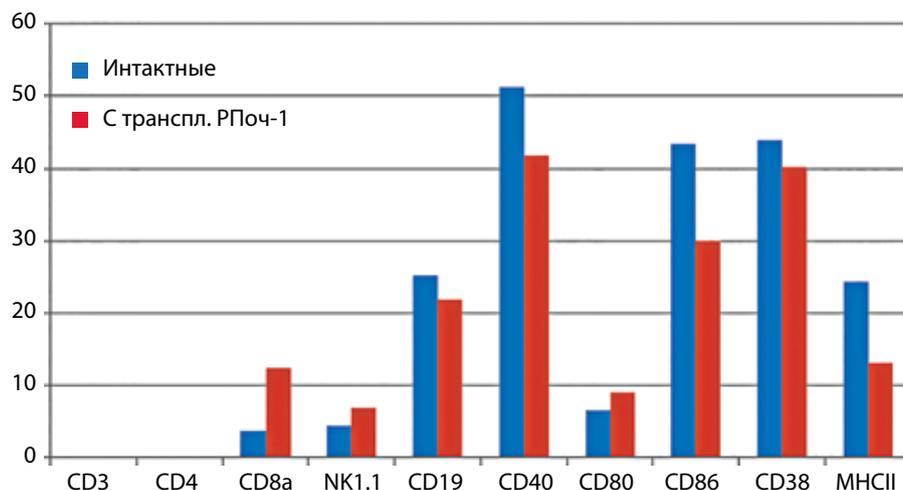


Рис. 3. Содержание различных субпопуляций спленоцитов у мышей *Valb/c nude* с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 и у интактных мышей

Заключение

В результате проведенных исследований на иммунодефицитных мышях *Valb/c nude* разведения ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана новая оригинальная методика получения ортотопического ксенографта, позволяющая оптимизировать технологию SOI. Воспроизводимый ортотопический рост п/к ксенографта рака РПоч1 человека в почке иммунодефицитной мыши *Valb/c nude* получен с помощью трансплантационных манипуляций под контролем таких биологических характерис-

тик, как прививаемость, контроль параметров роста, элементы иммунологического надзора и чувствительность к ингибиторам специфических тирозинкиназ. Принципиальным отличием методики от SOI, использующей опухолевый материал от пациента в качестве имплантата, является имплантат в виде п/к ксенографта с гарантированной 100 % ортотопической имплантацией, воспроизводимыми биологическими, в том числе иммунологическими, характеристиками и известной лекарственной чувствительностью. Это открывает возможность не только

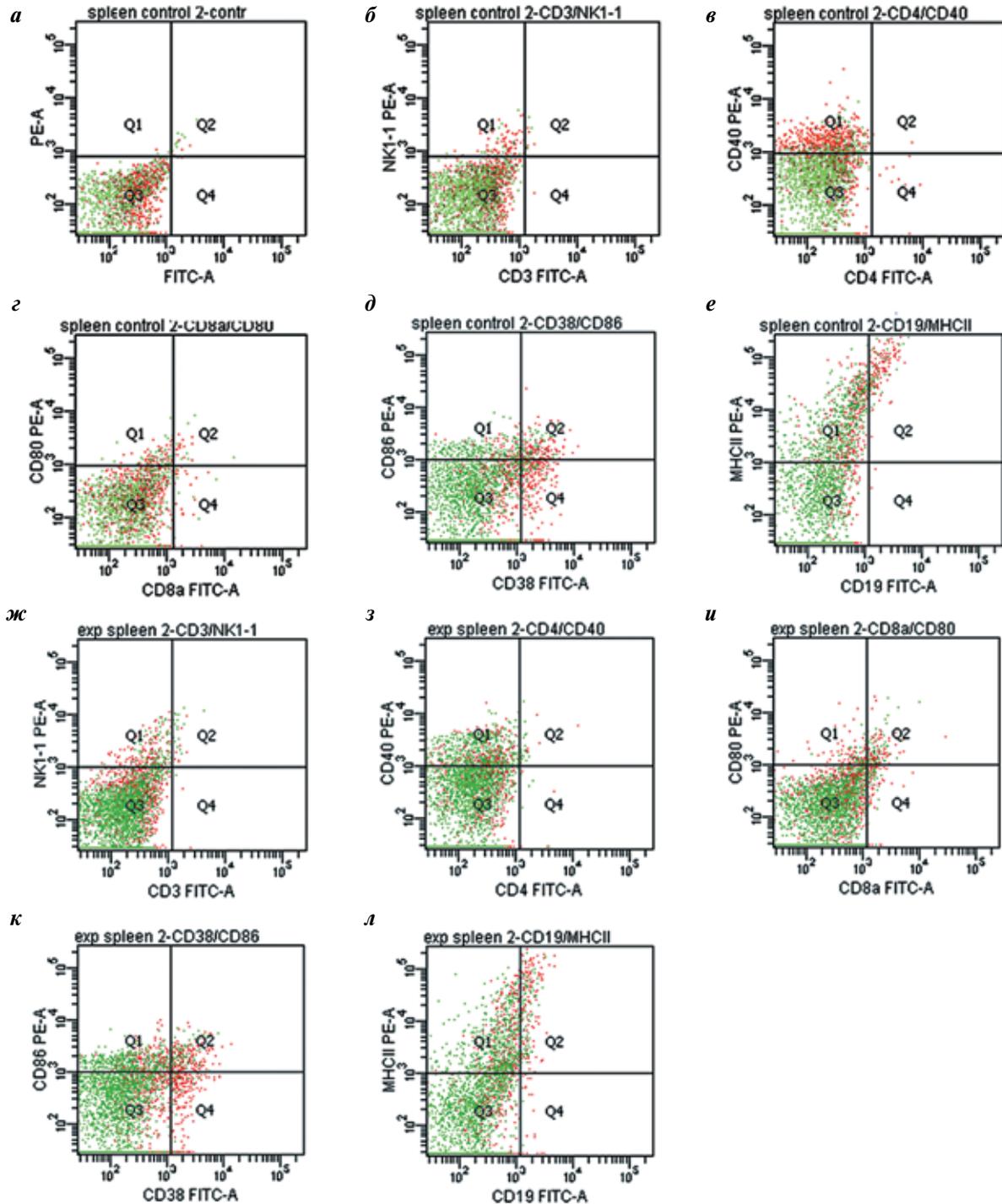


Рис. 4. Экспрессия различных маркеров (данные проточной цитометрии) на субпопуляции спленоцитов мышей *Balb/c nude* с ортотопическим ксенографтом перевиваемого рака почки человека РПоч1 и у intactных мышей: а – intactные животные, контроль; б – intactные животные, двойная метка CD3/NK1.1; в – intactные животные, двойная метка CD4/CD40; г – intactные животные, двойная метка CD8a/CD80; д – intactные животные, двойная метка CD38/CD86; е – intactные животные, двойная метка CD19/МНС II; ж – животные с трансплантированной опухолью, CD3/NK1.1; з – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD4/CD40; и – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD8a/CD80; к – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD38/CD86; л – животные с трансплантированной опухолью, двойная метка CD19/МНС II

исследовать на такой модели антиметастатическое действие агентов и составлять прогноз эффективности, но и отрабатывать на доклиническом этапе

биодоступность новых средств, в том числе иммунологических, или комбинаций, направленных на лечение этой патологии.

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

1. Survey of antitumor and toxicity test systems. EORTC. Screening and Pharmacology Group 1989; Oct.: 23–25.
2. 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. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
3. Трещалина Е. М. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред. М. И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009. С. 37–38.
4. Самойленко И. В., Харкевич Г. Ю., Демидов Л. В. Применение блокатора рецепторов СТЛА4 в лечении больных метастатической меланомой. Российский медицинский журнал 2015;1:4–9.
5. Носов Д. А. Рак почки. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н. И. Переводчиковой, В. А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015. С. 294–300.
6. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Ed. by V. A. Teicher, P. A. Andrews. 2nd ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2004. 450 p.
7. Michel S. M., Vervenn E. W., De Santis M. et al. SWITCH: A randomized sequential open-label study to evaluate efficacy safety of sorafenib (SO)/sunitinib (SU) versus SU/SO in the treatment of metastatic renal cell cancer (mRCC). J Clin Oncol 2014;32(4):393. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.04.017. PMID: 25952317.
8. Rini B. I., Escudier B., Tomczar P. et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. Lancet 2011;378(9807):1931–9. DOI: 10.1016/S0140–6736(11) 61613–9. PMID: 22056247.
9. Трещалина Е. М. Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М.: Издательская группа РОНЦ, 2010.
10. Шубина И. Ж., Чикилева И. О., Михайлова И. Н. и др. Активированные натуральные киллеры в клеточной иммунотерапии. Российский иммунологический журнал 2012;6(15);1:71–9.

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ЭНАНТИОМЕРОВ CPdA *IN VITRO* НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ЛИМФОБЛАСТНОГО ЛЕЙКОЗА

А.В. Савинкова¹, Л.Р. Тилова¹, О.И. Борисова¹, Е.М. Жидкова^{1,2}, К.А. Кузин¹, К.И. Кирсанов¹,
Г.А. Белицкий¹, И.В. Будунова³, М.Г. Якубовская¹, Е.А. Лесовая^{1,4}

¹ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24, стр. 15;

²Московский технологический университет; Россия, 119454 Москва, пр-т Вернадского, 78;

³Северо-Западный университет; США, 60611 Чикаго, авеню Ист-Чикаго, 303;

⁴Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольтная, 9

Контакты: Екатерина Андреевна Лесовая lesovenok@yandex.ru

Введение. Глюкокортикоиды являются важным компонентом химиотерапии гемобластозов. Терапевтическое действие глюкокортикоидов реализуется посредством активации глюкокортикоидного рецептора (GR) по механизму транс-репрессии, развитие побочных эффектов связано с транс-активацией. Ранее было показано, что соединение класса селективных агонистов GR, CpдA, селективно запускает транс-репрессию в клетках лейкоза. CpдA представляет собой смесь 2 энантиомеров, которые могут по-разному взаимодействовать с рецептором.

Цель исследования – синтез энантиомеров CpдA и оценка их биологических свойств.

Материалы и методы. Синтез энантиомеров был осуществлен на основании дигидроксилирования алкенов по Шарплессу; противоопухолевую активность *in vitro* определяли по антипролиферативному и проапоптотическому эффекту. Лигандные свойства оценивали путем ПЦР-анализа экспрессии глюкокортикоид- и NF-κB-зависимых генов.

Результаты и выводы. Протемонстрировано, что энантиомеры CpдA обладают противоопухолевым действием *in vitro*, а также не вызывают запуска транс-активации. Более того, S-энантиомер CpдA является более перспективным кандидатом для дальнейших исследований *in vivo*.

Ключевые слова: глюкокортикоидный рецептор, энантиомеры, гемобластозы, транс-активация, транс-репрессия, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-61-69

ANTI-TUMOR EFFECT OF CPdA ENANTIOMERS *IN VITRO* IN THE MODEL OF ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA

A.V. Savinkova¹, L.R. Tilova¹, O.I. Borisova¹, E.M. Zhidkova^{1,2}, K.A. Kuzin¹, K.I. Kirsanov¹, G.A. Belitsky¹, I.V. Budunova³,
M.G. Yakubovskaya¹, E.A. Lesovaya^{1,4}

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; bld. 15, 24 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478, Russia;

²Moscow Technological University; 78 Vernadsky av., Moscow 119454, Russia;

³Northwestern University; 303 East Chicago av., Chicago 60611, USA;

⁴Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov; 9 Vysokovoltynaya St., Ryazan 390026, Russia

Introduction. Glucocorticoids are the important component of combined chemotherapy of blood cancer. Therapeutic effects of glucocorticoids is realized via activation of glucocorticoid receptor transrepression, the development of side effects is associated with transactivation. We demonstrated earlier that compound belonging the class of selective glucocorticoid receptor agonists, CpдA, selectively induced transrepression in blood cancer cells. CpдA represents a mixture of two enantiomers, which can differ in interaction with the receptor.

Aim. The main aim of present study was to synthesize CpдA enantiomers and to evaluate their biological properties.

Materials and methods. Synthesis was carried out based on Sharpless dihydroxylation; anti-tumor activity *in vitro* was evaluated by antiproliferative and pro-apoptotic effects. Ligand properties were estimated by PCR-analysis of glucocorticoid- and NF-κB-dependent genes expression.

Results and conclusions. We demonstrated that CpдA enantiomers revealed anti-tumor activity *in vitro* and did not induce transactivation. Moreover, S-enantiomer of CpдA in the most tests demonstrated more pronounced activity and is more perspective molecule for future studies *in vivo*.

Key words: glucocorticoid receptor, enantiomers, hemoblastosis, transactivation, transrepression, anti-tumor activity

Введение

Глюкокортикоиды являются важнейшим компонентом терапии ряда заболеваний, в том числе полихимиотерапии лейкозов у детей [1–7]. Однако их применение сильно ограничено развитием резистентности, а также ряда серьезных метаболических осложнений, в частности остеопороза, стероидного диабета, нарушений водно-солевого обмена и др. [4, 5, 8–10]. Терапевтическое действие глюкокортикоидов в основном реализуется через ДНК-независимую транс-репрессию – белок-белковое взаимодействие GR с факторами транскрипции, что ингибирует активность данных факторов и приводит к снижению жизнеспособности опухолевых клеток [11–13]. Развитие побочных эффектов связано с запуском трансактивационного механизма, при котором рецептор образует димер, транслоцируется в ядро и связывается с палиндромными последовательностями глюкокортикоид-рецептивных элементов в промоторах антиапоптотических, пролиферативных и провоспалительных генов, что приводит к усилению их транскрипции (рис. 1а) [14–16].

Использование селективных агонистов GR (SEGRA), которые, в отличие от глюкокортикоидов, не приводят к образованию димерного комплекса рецептора и, соответственно, запускают лишь транс-репрессорные механизмы, снижая тем самым вероятность развития побочных эффектов (рис. 1б), является перспективным направлением в гормональной терапии и химиотерапии гемобластозов. К классу SEGRA относится соединение растительного происхождения 2-(4-ацетоксифенил)-2-хлор-N-метилэтиламмоний хлорид, или CpдA (рис. 2б). GR-зависимый противоопухолевый эффект CpдA на моделях гемобластозов *in vitro* и *in vivo* был продемонстрирован ранее в отделе химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [17, 18]. Однако CpдA представляет собой рацемическую смесь из 2 энантиомеров (R и S) (рис. 2в), которые могут обладать одинаковыми физико-химическими свойствами, но по-разному взаимодействовать с GR и, следовательно, проявлять различную биологическую активность, что ранее не было изучено. Данные особенности могут выступать причиной различия их фармакодинамических и фармакокинетических свойств.

Таким образом, данное исследование было направлено на изучение биологических эффектов энантиомеров нестероидного лиганда GR, CpдA, на модели острого лимфобластного лейкоза *in vitro* с целью определения перспективности использования соединений данного класса в химиотерапии гемобластозов.

Материалы и методы

Синтез энантиомеров CpдA. Синтез чистых энантиомеров CpдA осуществлен на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова на основании ассиметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу [19] (рис. 3) по следующей схеме.

Стирол, защищенный ацетатной группой (3), обрабатывали коммерчески доступной реакционной смесью AD-mix-β (тетраоксид осмия OsO₄ в качестве окислителя, гексацианоферрат (III) калия K₃[Fe(CN)₆] в качестве кооксиданта, карбонат калия K₂CO₃ в качестве буфера для поддержания щелочной среды и аддукт фталазина с дигидрохинидином, позволяющий получить чистый (R) – энантиомер CpдA; Sigma-Aldrich, США). Диол (4) обрабатывали в пиридине тозилхлоридом и N-Вос-N-метиламидом лития и получали спирт (5). При обработке продукта (5) тионилхлоридом с последующим удалением Вос-защитной группы при добавлении безводного хлороводорода получали (R) – энантиомер CpдA. Получение (S) – энантиомера CpдA проводили по аналогичной схеме с помощью реакционной смеси AD-mix-α (Sigma-Aldrich, США), где в качестве стереоселективного катализатора использовали аддукт фталазина с дигидрохинидином. Оценку чистоты полученных энантиомеров проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с хиральной неподвижной фазой. Данные, полученные после хроматографии на хиральной неподвижной фазе, подтверждали образование R- и S-изомеров с энантиомерным избытком 98 %. Спектр ЯМР ¹H (400 МГц, d₆-DMSO): 2.23 м. д. (s, 3H); 2.51–2.52 (m, 3H); 3.19–3.27 (m, 2H), 4.88–4.91 (m, 1H); 6.83–6.85 (d, 2H); 7.16–7.19 (d, 2H).

Клеточные линии и обработка клеток. В работе использовали клетки острого лимфобластного лейкоза линии СЕМ. Культура клеток СЕМ была получена в фазе обострения от пациентки с острым лимфобластным лейкозом [20–23]. Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 5 % эмбриональную сыворотку телят (РАА, Австрия) и гентамицин («ПанЭко», Россия) (50 ед/мл) при 37 °С и в 5 % CO₂. Клетки обрабатывали 1 мкМ дексаметазона (Dex, Sigma-Aldrich, США), 1 мкМ CpдA или энантиомерами CpдA (R, S в концентрациях 1 мкМ).

Трансдукция клеток лентивирусными векторами. Вирусные стоки высокого титра получали путем котрансфекции клеток линии 293Т лентивирусными векторами (плазида pGreenPuro-shGR, несущая короткую шпилечную РНК к гену GR, и контрольная плазида pGIPZ) (System Biosciences, США) совместно с упаковочной плазмидой psPAX2 (плазида № 12260) и плазмидами pCMV-VSV-G (плазида № 8454) и pMD2.G (плазида № 12259), кодирующими

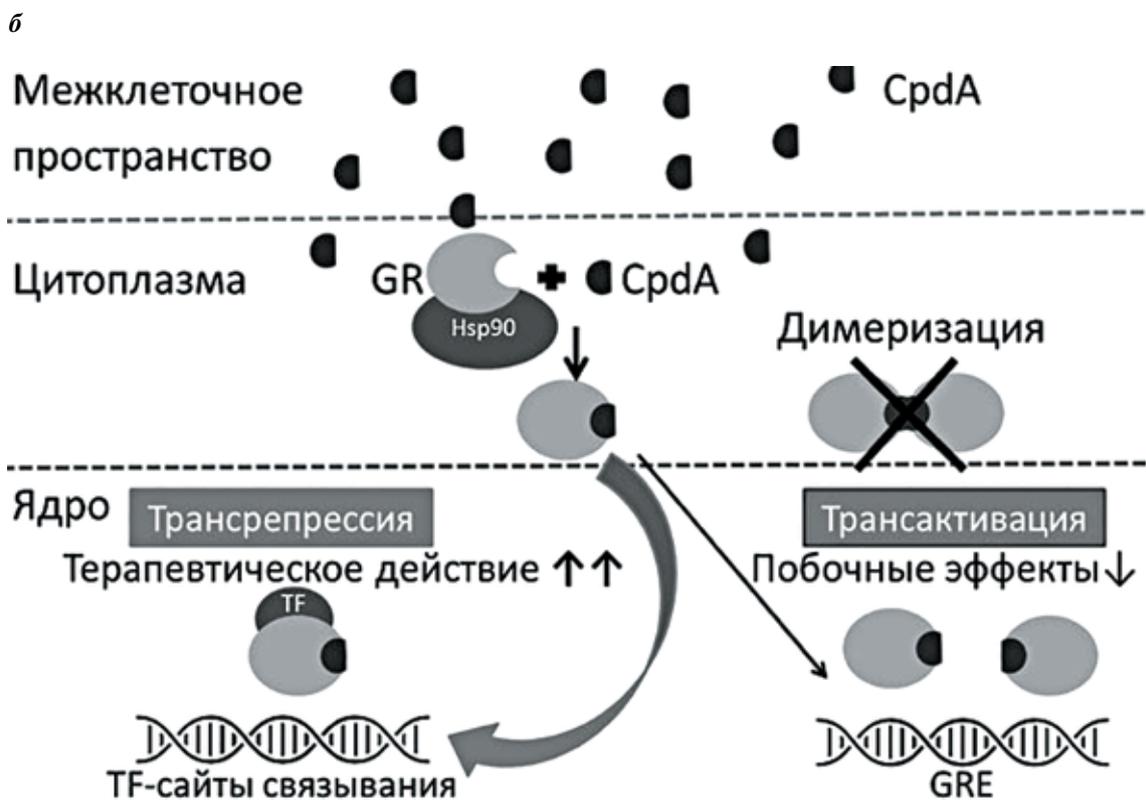
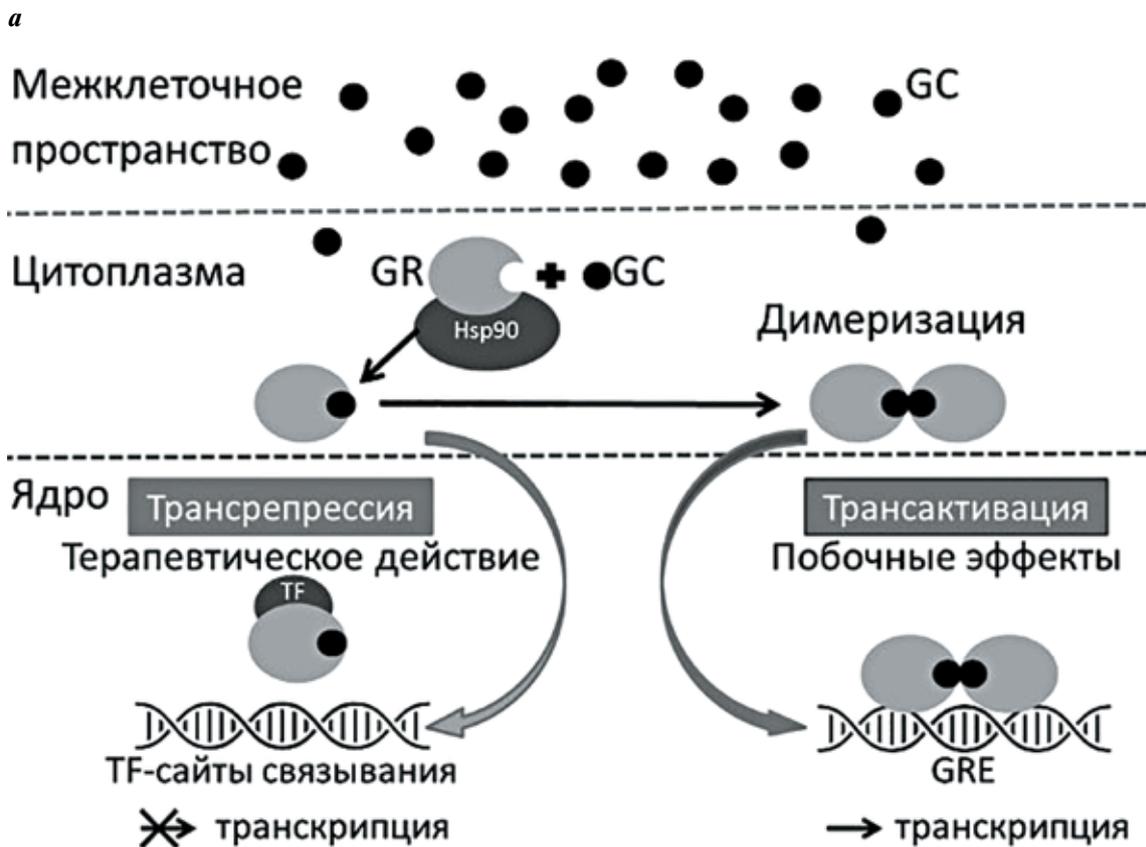


Рис. 1. Механизмы действия глюкокортикоидов (а) и SEGRA (б) на примере CpdA

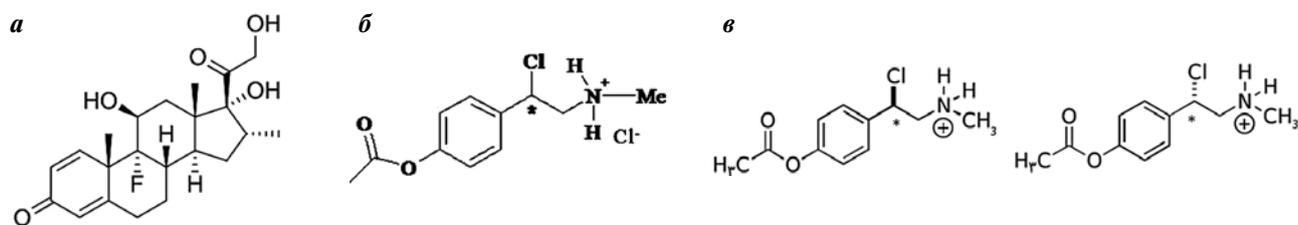


Рис. 2. Структурные формулы глюкокортикоида дексаметазона (а), CpDA (б) и энантиомеров CpDA (в). *Хиральный атом углерода в молекуле CpDA

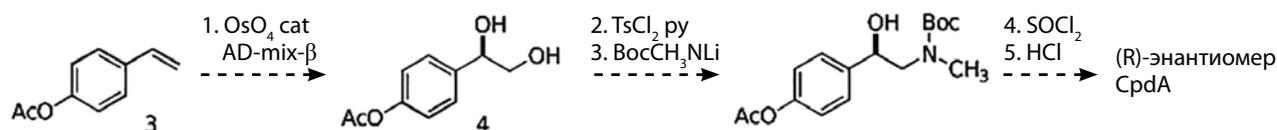


Рис. 3. Синтез чистых энантиомеров CpDA на основании асимметричного дигидроксилирования алкенов по Шарплессу

оболочечные гликопротеины (Addgene, США). Трансфекцию проводили с помощью реагента TransIT[®]-293 (Mirus-Bio, США) по протоколу производителя. Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали через 24–48 ч после трансфекции, центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин и использовали для инфекции клеток СЕМ. В результате инфекции была получена стабильная линия клеток СЕМ-shGR, экспрессирующая короткую шпилечную РНК к гену GR, и контрольная линия СЕМ-pGIPZ. Далее полученные трансформированные клетки культивировали на селективной среде, содержащей антибиотик пурамицин, в течение 14–21 сут. Об эффективности трансдукции лентивирусных конструкций судили по интенсивности пролиферации клеток в среде с пурамицином, по интенсивности флуоресценции GFP (клетки исследовали на флуоресцентном микроскопе Zeiss, с использованием фильтра для GFP-флуоресценции при 400-кратном увеличении), а также по результатам иммуноблоттинга.

Иммуноблоттинг. Для проведения иммуноблоттинга тотальные клеточные лизаты выделяли по методу, описанному ранее [7]. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, США). Белки разделяли с помощью

электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (LI-COR, США). Для иммуноблоттинга использовали антитела к GR- α (Santa Cruz Biotechnology, США). Для предотвращения неспецифической сорбции мембраны в течение 1 ч инкубировали с 5 % раствором блокирующего агента Blotto (Bio-Rad, США) в TBS-буфере (20 мМ Трис-НCl, pH 7.6, 150 мМ NaCl), затем инкубировали с первичными антителами в течение 6 ч при комнатной температуре. Для контроля загрузки и переноса мембраны инкубировали с антителами к GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, США). Мембраны отмывали и инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, образовавшиеся комплексы проявляли хемилюминесцентным реагентом (все реактивы Amersham, Великобритания). Количественный анализ проводился путем денситометрического сканирования с использованием компьютерной программы Image Quant for Windows.

Определение антипролиферативного эффекта. Антипролиферативный эффект определяли путем прямого подсчета клеток. Клетки культивировали в 24-луночном планшете в присутствии исследуемых соединений или растворителя (0,1 % этанола или

Условия проведения ПЦР и последовательность используемых праймеров

Праймер	Последовательность		Размер продукта
	прямой праймер	обратный праймер	
FKBP51	5'-gaatggtgaggaacgcgat-3'	5'-tgccaagactaaagacaatggt-3'	250
GILZ	5'-cagcccagccatgaacacc-3'	5'-cgcagaaccaccagggcct-3'	144
CCND1	5'-gctggagcccgtgaaaaga-3'	5'-ctcccctctgcatctttg-3'	135
CCND2	5'-ctacctccagctgctccta-3'	5'-cccagccaagaacgggcc-3'	161
RPL27	5'-accgctacccccgaaagtg-3'	5'-cccgtcgggcct tgcgtta-3'	125

ДМСО); подсчет клеток проводили через 24 ч после обработки. Каждая экспериментальная или контрольная группа состояла из 3 лунок.

Определение уровня апоптоза. Уровень апоптоза определяли с помощью метода проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием (PI), для чего клетки центрифугировали, осадок суспендировали в 1 мл раствора, содержащего 5 мкг/мл PI, 0,1 % цитрата натрия и 0,3 % NP-40. Полученные образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Число апоптотических клеток определяли как пре-G1-пик на ДНК-гистограмме.

Количественная амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), сопряженная с обратной транскрипцией. Для обратной транскрипции использовали набор MMLV Reverse Transcriptase, случайные праймеры, смесь для ПЦР (Invitrogen, США) и тотальную РНК, выделенную с помощью набора для выделения РНК RNeasy kit (Qiagen, США). Количественный ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-анализатора Bio-Rad iQ5. Программа амплификации была следующей: 95 °С – 10 мин, 40 циклов (95 °С – 15 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с). Относительное изменение экспрессии исследуемой мРНК вычисляли методом $\Delta\Delta Ct$, где $\Delta\Delta Ct$ определяли путем вычитания среднего ΔCt контроля из ΔCt экспериментальных образцов [24]. В качестве контроля использовали ген рибосомного белка L27 (*Rpl27*). Праймеры для амплификации были сконструированы с помощью базы данных Primer-Bank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>) и пакета программ Oligo 6. Последовательности праймеров приведены в таблице.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты повторены трижды. Средние значения и среднеквадратичное отклонение рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel и сравнивали с парным двухвыборочным t-тестом Стьюдента для средних. Во всех случаях статистические критерии считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

GR-зависимый противоопухолевый эффект энантиомеров CpdA *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза

Согласно терминологии, используемой в современной литературе, противоопухолевое действие препарата *in vitro* (т. е. клеточные культуры) включает способность препарата подавлять пролиферацию и индуцировать апоптоз в клетках линии интересующей нозологической формы злокачественного новообразования. Линия острого лимфобластного лейкоза СЕМ использовалась в исследованиях нашей лаборатории ранее. Было показано, что GR в данной клеточной линии экспрессируется на достаточно

высоком уровне, его ген не несет в себе мутаций, функциональная активность рецептора также была подтверждена ранее [10, 11, 23, 25].

Для доказательства того, что антипролиферативное действие энантиомеров CpdA реализуется через GR, нами была получена сублиния клеток СЕМ-shGR со сниженной экспрессией рецептора при помощи коротких шпилечных РНК к гену GR, как было описано ранее [23]. В качестве контрольной сублинии клеток использовали клетки СЕМ-pGIPZ, полученные с помощью лентивирусной трансдукции плазмиды pGIPZ в геном клеток СЕМ. На рис. 4а, б представлены результаты иммуноблоттинга тотальных клеточных лизатов данных сублиний и денситометрический анализ полученных данных. Можно увидеть, что экспрессия GR в клетках СЕМ-shGR снизилась на ~ 90 %.

Определение антипролиферативного эффекта проводили в течение 24-часовой инкубации с растворителем, Dex, CpdA или энантиомерами CpdA (R, S) с помощью прямого подсчета клеток. Рабочие концентрации CpdA и Dex эквивалентны (1 мкМ), поскольку данные соединения обладают сходной аффинностью к GR [26] и определены нами ранее [11, 25]. Рабочие концентрации энантиомеров CpdA были эквивалентны концентрации рацемата, так как по химической структуре, а следовательно, по молекулярной массе данные соединения абсолютно идентичны. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-pGIPZ после обработки Dex в течение 24 ч составило $69,1 \pm 8,3$ %, после обработки CpdA – $54,7 \pm 4,2$ %. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-pGIPZ после обработки энантиомерами CpdA составило $57,2 \pm 8,2$ % после обработки S-энантиомером CpdA в течение 24 ч, а после аналогичной обработки R-энантиомером CpdA – $43,8 \pm 7,4$ % (рис. 4в). В то же время антипролиферативный эффект всех исследуемых соединений на клетки с подавленной экспрессией GR был гораздо менее выражен. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки Dex в течение 24 ч составило $87,3 \pm 7,6$ %, после обработки рацематом CpdA – $86,0 \pm 4,6$ %. Количество жизнеспособных клеток линии СЕМ-shGR после обработки энантиомерами CpdA составило $80,0 \pm 11,8$ % после обработки S-энантиомером CpdA в течение 24 ч, а после аналогичной обработки R-CpdA – $83,3 \pm 9,4$ % (рис. 4г).

Таким образом, был продемонстрирован GR-зависимый антипролиферативный эффект энантиомеров CpdA, сопоставимый с антипролиферативным действием глюкокортикоидов, а также ранее исследованным антипролиферативным эффектом рацемической смеси CpdA [11, 25].

При исследовании проапоптотического эффекта энантиомеров CpdA с помощью проточной цитофлуо-

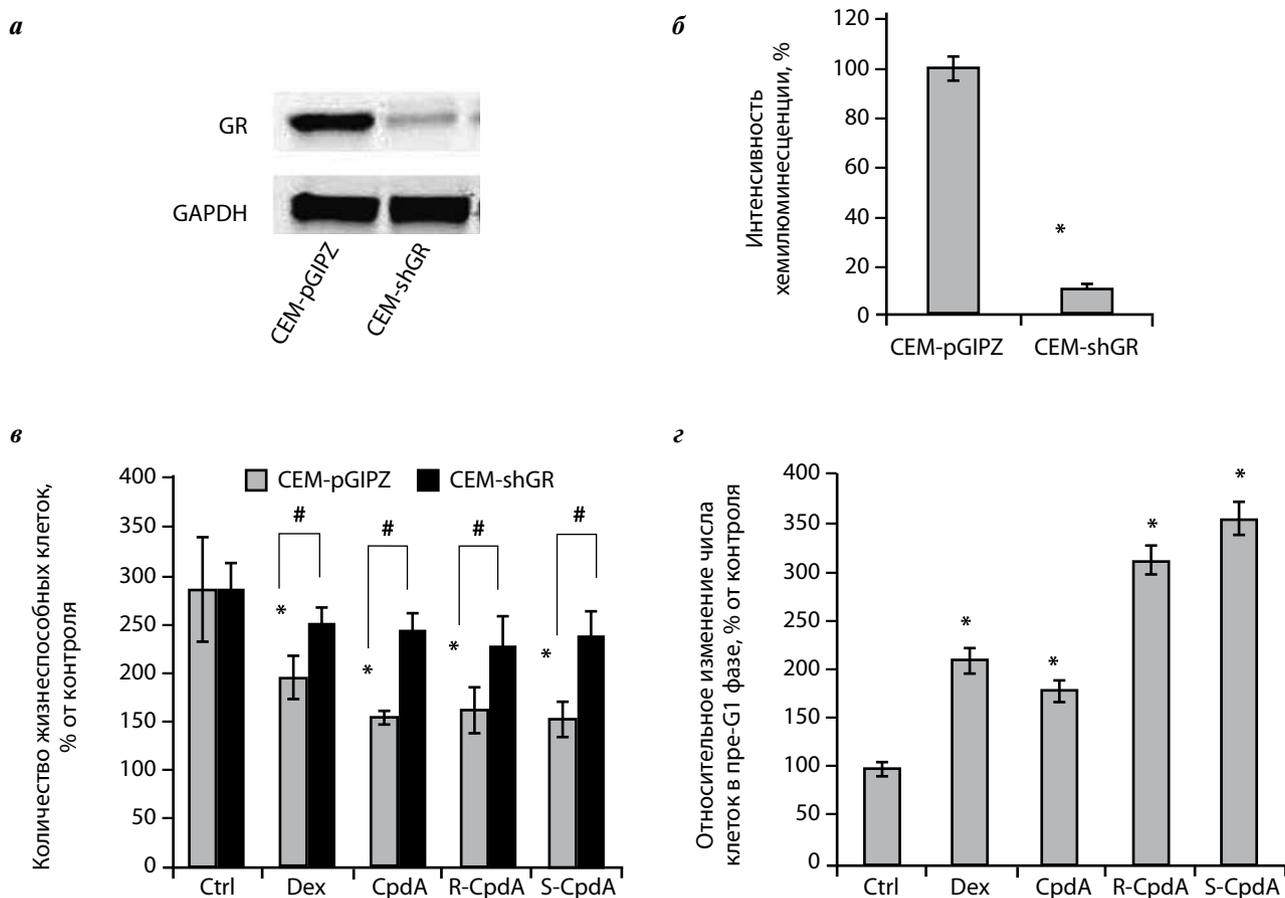


Рис. 4. GR-зависимый противоопухолевый эффект энантиомеров Cpda *in vitro*: а – оценка экспрессии GR в клетках CEM после трансдукции лентивирусных конструкций pGF-shGR и pGIPZ методом иммуноблоттинга. Для оценки эффективности нанесения экстрактов на нитроцеллюлозную мембрану использовали иммуноблоттинг с антителами к GAPDH; б – денситометрический анализ данных иммуноблоттинга. На графике представлена интенсивность полос в долях единицы, нормализованная относительно GAPDH; в – антипролиферативный эффект энантиомеров Cpda на клетки CEM. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью прямого подсчета. Представлено количество живых клеток после обработки 1 мкМ Dex, 1 мкМ Cpda или энантиомеров Cpda (R, S в концентрациях 1 мкМ) в процентах от контроля, обработанного растворителем; * – статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$), # – статистически достоверное отличие количества жизнеспособных клеток CEM-shGR от CEM-pGIPZ; г – проапоптотический эффект энантиомеров Cpda в клетках CEM. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по количеству клеток в пре-G1-фазе; * – статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$)

риметрии показано, что в клетках CEM инкубация с Dex, Cpda и с обоими энантиомерами Cpda вызвала запуск апоптоза в клетках острого лимфобластного лейкоза CEM.

Количество клеток, находящихся в пре-G₁ фазе, после обработки Dex в течение 24 ч составило $210,5 \pm 4,5$ % относительно контроля, после обработки рацемической смесью Cpda – $178,9 \pm 2,6$ %. В то же время после обработки R- и S-энантиомерами количество клеток, находящихся в пре-G₁ фазе, составило $310,5 \pm 2,6$ % и $352,6 \pm 5,3$ % соответственно. Необходимо отметить, что степень индукции апоптоза обоими энантиомерами была значительно выше данного показателя, полученного при обработке клеток рацематом Cpda или дексаметазоном.

Проапоптотический эффект энантиомеров Cpda на клетки острого лимфобластного лейкоза CEM

коррелировал со степенью подавления роста и жизнеспособности данных клеток при инкубации с этими соединениями. Таким образом, можно сделать следующий вывод: антипролиферативный эффект энантиомеров Cpda связан с запуском апоптоза, причем R- и S-энантиомеры обладают более выраженным проапоптотическим эффектом, чем их рацемическая смесь или Dex.

Транс-репрессорный и транс-активационный потенциал энантиомеров Cpda

ДНК-независимая транс-репрессия, запускаемая GR, обусловлена белок-белковым взаимодействием GR с другими транскрипционными факторами, такими как NF-κB, AP-1, Ets-1, Elk-1, SRF, CRE/ATF и NFATc [26]. Мы исследовали транс-репрессорный потенциал энантиомеров Cpda в сравнении

с рацемической смесью CpдA и дексаметазоном с помощью количественной ПЦР генов, регулируемых как NF- κ B, так и AP-1 – регуляторов клеточного цикла циклинов D1 и D2, содержащих в промоторной области сайты связывания NF- κ B.

При обработке Dex клеток линии СЕМ экспрессия гена CCND1 снизилась в 3,1 раза, в то время как при обработке CpдA этот показатель снизился в 1,7 раза. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия того же гена в клетках была подавлена в 1,3 и 2,2 раза соответственно (рис. 5а).

Экспрессия гена CCND2 после обработки Dex и CpдA возросла на 20 %, однако это увеличение было статистически недостоверным. При обработке S- и R-энантиомерами экспрессия указанного гена незначительно снизилась по сравнению с рацемической смесью в 1,2 и 1,3 раза соответственно (рис. 5б).

Так, было показано, что энантиомеры CpдA обладают более высоким транс-репрессорным потенциалом, чем рацемическая смесь.

Запуск транс-активационного механизма GR в клетке происходит при связывании гомодимера рецептора с палиндромными последовательностями нуклеотидов в ДНК – глюкокортикоид-респонсивных элементов. Это приводит к ацетилированию гистонов, уменьшению плотности хроматина, что увеличивает доступ к ДНК фермента РНК-полимеразы II, катализирующего синтез мРНК [27]. Таким образом, в клетке активируются процессы транскрипции генов и образования белков, обладающих про-пролиферативным и антиапоптотическим действием. В данной работе мы исследовали транс-активационный потенциал энантиомеров CpдA путем оценки изменения экспрессии GR-зависимых генов, несущих в своих

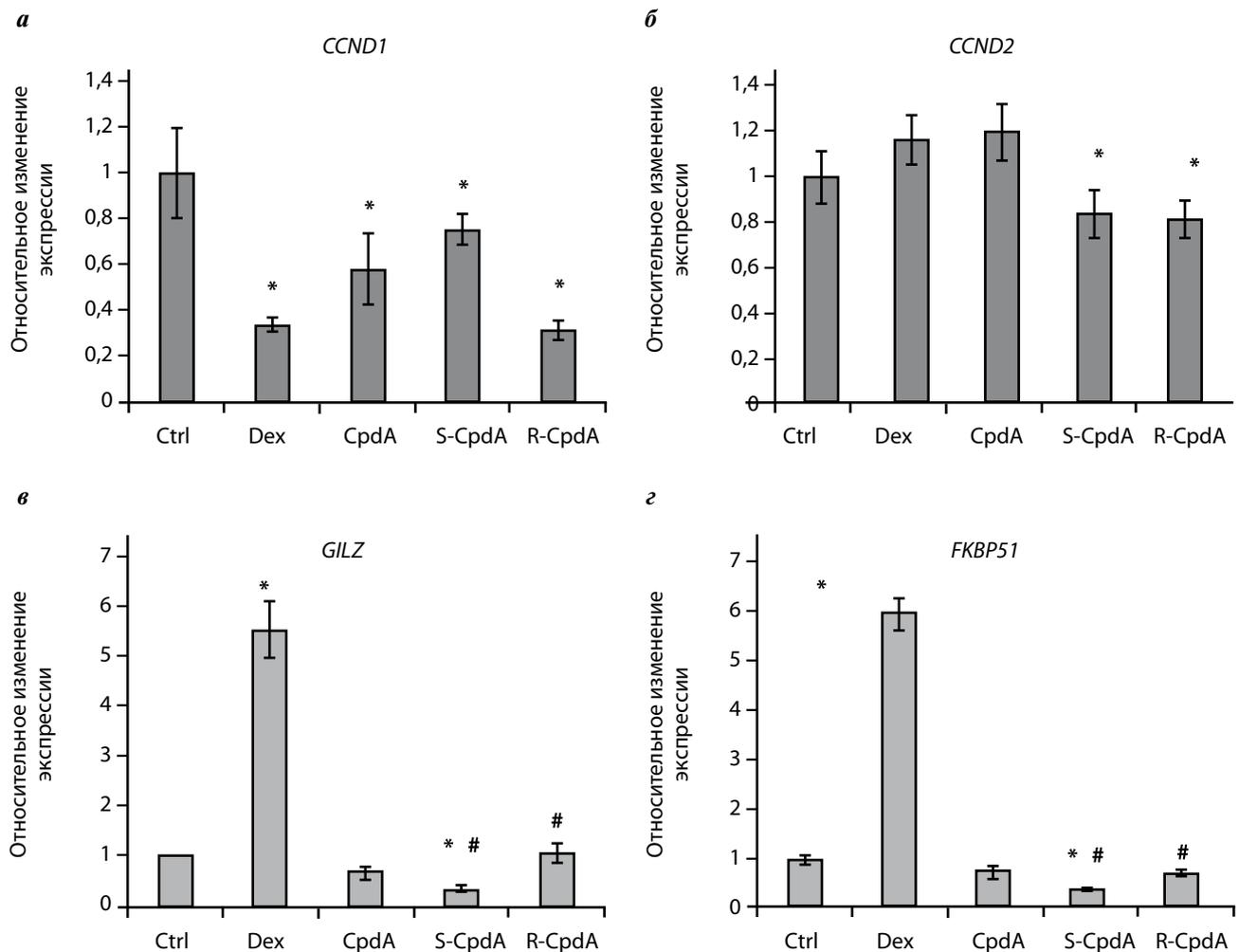


Рис. 5. Влияние энантиомеров CpдA на запуск транс-репрессии (а, б) и транс-активации (в, г) в клетках СЕМ. Клетки культивировали в течение 1 ч (CCND1), 4 ч (CCND2) и 24 ч (GILZ и FKBP51) в присутствии растворителя, 1 мкМ Dex, 1 мкМ CpдA или энантиомеров CpдA (R, S в концентрациях 1 мкМ). Уровень экспрессии генов определяли методом количественной ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией. Количество ПЦР-продуктов оценивали и нормализовали по количеству ПЦР-продукта рибосомного белка L27 (Rpl27); * – статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$), # – статистически достоверное отличие экспрессии генов GILZ и FKBP51 от экспрессии данных генов в клетках, обработанных Dex

промоторах респонсивные элементы глюкокортикоидов с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией. На основании данных литературы о профилях экспрессии генов после обработки глюкокортикоидами [28] в качестве таких характеристических генов мы выбрали гены белка 51, связывающего FK506 (FK506 Binding Protein 51, FKBP51), и белка Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper (GILZ).

Исследовали изменение экспрессии генов FKBP51 и GILZ при обработке Dex, CpдA и энантиомерами CpдA клеток СЕМ. Для каждого из этих генов в литературе подробно описаны последовательности глюкокортикоид-респонсивных элементов и отмечено возрастание экспрессии после обработки глюкокортикоидами [28–32]. Количество мРНК вышеперечисленных генов сильно возрастало после обработки Dex в 6,1 и 5,5 раза для FKBP51 и GILZ соответственно, в то время как при инкубации клеток СЕМ с CpдA экспрессия этих генов не изменялась (рис. 5*в*, *г*). Экспрессия гена FKBP51 при обработке клеток СЕМ S-энантиомером CpдA снижалась в 2 раза, экспрессия гена GILZ – в 3 раза (рис. 5*в*, *г*). Однако в присутствии R-энантиомера экспрессия гена GILZ незначительно повышалась (на 10 и 20 % соответственно), но эти показатели были статистически неотличимы от контроля (рис. 5*в*, *г*). Необходимо отметить, что ген FKBP51 является не только маркером транс-активации, он играет важную роль в развитии резистентности к глюкокортикоидам. Для гена GILZ описано его антиапоптотическое действие в Т-лимфоцитах [11, 25]. Таким образом, поскольку S-энантиомер CpдA не увеличивает экспрессию данных генов или подавляет ее, то можно рассматривать S-CpдA как более безопасный агонист GR, не вызывающий развитие резистентности.

Таким образом, энантиомеры CpдA по своему эффекту на экспрессию GR-зависимых генов FKBP51 и GILZ отличаются от рацемической смеси CpдA. В частности, S-энантиомер проявил большую

способность к подавлению транс-активации и запуску транс-репрессии по сравнению с рацемической смесью. Различия в биологических свойствах энантиомеров CpдA обусловлены, как нам представляется, различиями в конформации образовавшегося комплекса «лиганд-рецептор», и следовательно, различной аффинностью к транскрипционными факторам, с которыми взаимодействует активированный GR.

Заключение

Данная работа показывает, что в клетках острого лимфобластного лейкоза СЕМ энантиомеры CpдA проявляют GR-зависимый антипролиферативный эффект в большей степени, чем рацемат CpдA и дексаметазон, использовавшиеся в качестве положительного контроля. Антипролиферативный эффект энантиомеров CpдA обусловлен, с одной стороны, развитием апоптоза, а с другой – селективным запуском транс-репрессии, в результате которой снижалась пролиферативная активность злокачественных клеток кроветворной системы.

Таким образом, энантиомеры CpдA проявляют GR-зависимый противоопухолевый эффект *in vitro* на модели острого лимфобластного лейкоза. Энантиомеры CpдA способны селективно запускать транс-репрессию GR, не индуцируя механизм транс-активации, что снижает риск развития побочных эффектов, а также резистентности к данным соединениям. Биологические эффекты S-энантиомера CpдA на клетки острого лимфобластного лейкоза СЕМ более выражены по сравнению с глюкокортикоидом дексаметазоном, рацемической смесью и R-CpдA. Следовательно, S-CpдA является более перспективным кандидатом для дальнейших исследований *in vivo*.

Работа была выполнена при поддержке грантов РФФИ 15-04-04006, 16-04-01410 и гранта фонда «Династия».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Басов П. В. Влияние глюкокортикоидных гормонов на Т-лимфоциты у больных туберкулезом легких. Проблемы туберкулеза 1990;1:30–3.
2. Витовская О. П. Медикаментозно индуцированная глаукома. Офтальмологические ведомости 2014;7(3):58–62.
3. Иванова А. А. Механизмы антилейкемического действия и возможные пути развития резистентности при использовании глюкокортикоидов в терапии острых лейкозов (обзор литературы). Гематология и трансфузиология 2000;45(2):12–5.
4. Спичак И. И., Богачева М. В., Билялутдинова Д. И. и др. Частота стероидного диабета на программной полихимиотерапии у детей с лимфобластным лейкозом. Педиатрический вестник Южного Урала 2014; 1–2:30–3.
5. Страчунский Л. С., Козлов С. Н. Глюкокортикоидные препараты. Методическое пособие. Смоленск, 1997.
6. Cutolo M. Glucocorticoids and chronotherapy in rheumatoid arthritis. RMD open 2016;2(1):1–10. DOI: 10.1136/rmdopen-2015–000203. PMID: 27042335.
7. Klaustermeyer W. B., Choi S. H. A perspective on systemic corticosteroid therapy in severe bronchial asthma in adults. Allergy Asthma Proc 2016;37(3):192–8. DOI: 10.2500/aap.2016.37.3941. PMID: 27178888.

8. Топорова И.Ю., Паровичникова Е.Н., Клясова Г.А. и др. Частота развития и структура инфекционных осложнений, возникающих у больных с гемобластозами на различных этапах программной химиотерапии. *Гематология и трансфузиология (приложение)* 2012;54.
9. Lekva T., Bollerslev T.J., Kristo C. et al. The glucocorticoid-induced leucine zipper gene (GILZ) expression decreases after successful treatment of patients with endogenous Cushing's syndrome and may play a role in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;V(1):246–55. DOI: 10.1210/jc.2009–0595. PMID: 19875485.
10. Thompson E.B., Harmon J.M. Glucocorticoid resistance in human leukemia *in vivo* and *in vitro*. *Adv Exp Med Biol* 1986;196:111–27. DOI: 10.1007/978-1-4684-5101-6_8. PMID: 3521219.
11. Лесовая Е.А., Емельянов А.Ю., Кирсанов К.И. и др. Противоопухолевое действие нестероидного лиганда глюкокортикоидного рецептора, СрдА, на клетки линий Т-клеточного лейкоза. *Биохимия (Москва)* 2011;76(11):1242–52.
12. Polman J.A., de Kloet E.R., Datson N.A. Two populations of glucocorticoid receptor-binding sites in the male rat hippocampal genome. *Endocrinology* 2013;154(5):1832–44. DOI: 10.1210/en.2012–2187. PMID: 23525215.
13. Ray A., Prefontaine K.E. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(2):752–6. PMID: 8290595.
14. Хаитов Р.М., Ильина Н.И. Аллергология и иммунология. Национальное руководство. М.: ГОЭТАР-Медиа, 2012. 633 с.
15. Hudson W.H., Youn C., Ortlund E.A. The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat Struct Mol Biol* 2013;20(1):53–8. DOI: 10.1038/nsmb.2456. PMID: 23222642.
16. Surjit M., Ganti K.P., Mukherji A. et al. Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-legged glucocorticoid receptor. *Cell* 2011;145(2):224–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.03.027. PMID: 21496643.
17. Bosscher de K., Haegeman G., Elewaut D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor modulators. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(4):497–504. DOI: 10.1016/j.coph.2010.04.007. PMID: 20493772.
18. Lesovaya E., Yemelyanov A., Swart A.C. et al. Discovery of Compound A – a selective activator of the glucocorticoid receptor with anti-inflammatory and anti-cancer activity. *Oncotarget* 2015;6(31):30730–44. DOI: 10.18632/oncotarget.5078. PMID: 26436695.
19. Sharpless K.B., Amberg W., Bennani Y.L. et al. The osmium-catalyzed asymmetric dihydroxylation: a new ligand class and process improvement. *JOC* 1992;57(10):2768–71. DOI: 10.1021/jo00036a003.
20. Antakly T., Eisen H.J. Immunocytochemical localization of the glucocorticoid receptor in steroid-sensitive and -resistant human leukemic cells. *Cancer Res* 1990;50(4):1337–45. PMID: 2404592.
21. Foley G.E., Lazarus H., Farber S. et al. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer* 1965;18:522–9. PMID: 14278051.
22. Norman M.R., Thompson E.B. Characterization of a glucocorticoid-sensitive human lymphoid cell line. *Cancer Res* 1977;37(10):3785–91. PMID: 269011.
23. Thompson E.B., Medh R.D., Zhou F. et al. Glucocorticoids, oxysterols, and cAMP with glucocorticoids each cause apoptosis of CEM cells and suppress c-myc. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1–6):453–61. PMID: 10419025.
24. Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M. et al. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine* 2006;27:95–125. DOI: 10.1016/j.mam.2005.12.007. PMID: 16460794.
25. Lesovaya E., Yemelyanov A., Kirsanov K. et al. Combination of a selective activator of the glucocorticoid receptor Compound A with a proteasome inhibitor as a novel strategy for chemotherapy of hematologic malignancies. *Cell Cycle* 2013;12(1):133–44. DOI: 10.4161/cc.23048. PMID: 23255118.
26. Yemelyanov A., Czornog J., Gera L. et al. Novel steroid receptor phyto-modulator compound A inhibits growth and survival of prostate cancer cells. *Cancer Res* 2008;68(12):4763–73. DOI: 10.1158/0008–5472.CAN-07–6104. PMID: 18559523.
27. Adcock I.M. Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther* 2000;13(3):115–26. DOI: 10.1006/pupt.2000.0243. PMID: 10873549.
28. Chauhan D., Auclair D., Robinson E.K. et al. Identification of genes regulated by dexamethasone in multiple myeloma cells using oligonucleotide arrays. *Oncogene* 2002;21(9):1346–58. DOI: 10.1038/sj.onc.1205205. PMID: 11857078.
29. Bruscoli S., Donato V., Vèlardy E. et al. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) and long GILZ inhibit myogenic differentiation and mediate anti-myogenic effects of glucocorticoids. *J Biol Chem* 2010;285(14):10385–96. DOI: 10.1074/jbc.M109.070136. PMID: 20124407. PMID: PMC2856245.
30. Kochel I., Strzadala L. FK506-binding proteins in the regulation of transcription factors activity in T cells. *Postepy Hig Med Dosw* 2004;58:118–27. PMID: 15077060.
31. Shipp L.E., Lee J.V., Yu C.Y. et al. Transcriptional regulation of human dual specificity protein phosphatase 1 (DUSP1) gene by glucocorticoids. *PLoS One* 2010;5(10):13754. DOI: 10.1371/journal.pone.0013754. PMID: 21060794.
32. Tchen C.R., Martins J.R., Paktiawal N. et al. Glucocorticoid regulation of mouse and human dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) genes: unusual cis-acting elements and unexpected evolutionary divergence. *J Biol Chem* 2010;285(4):2642–52. DOI: 10.1074/jbc.M109.037309. PMID: 19940143.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ФЕНИЛБУТИРАТА В КОМБИНАЦИИ С 5-ФТОРУРАЦИЛОМ НА МОДЕЛИ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

Н.П. Фадеев, Р.И. Харисов, Е.Г. Кованько, Ю.И. Пустовалов, В.Л. Фадеева

ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России; Россия, 197758 Санкт-Петербург, пос. Песочный, ул. Ленинградская, 70/1

Контакты: Николай Петрович Фадеев nick.fadeev2010@yandex.ru

Введение. Продолжается поиск новых противоопухолевых препаратов с высокой эффективностью и низким токсическим профилем. Одним из перспективных классов противоопухолевых агентов, отвечающих этим требованиям, являются ингибиторы деацетилазы гистонов (HDAC), в частности фенилбутират натрия (ФБ).

Цель исследования – изучение дозовой и временной зависимости противоопухолевой активности и переносимости при пролонгированном пероральном введении ФБ в сочетании с 5-фторурацилом (5-ФУ) на модели карциномы Эрлиха.

Материалы и методы. Для исследования использовали ФБ в виде порошка для приготовления водного раствора, 5-ФУ вводили внутривенно однократно в дозах 200 и 100 мг/кг. Животные были разделены на 6 групп (по 20 мышей): 1-я группа (контрольная) получала обычную питьевую воду, 2-я группа – водный раствор ФБ в дозе 800 мг/кг/сут вместо питьевой воды, 3-я группа – 5-ФУ 200 мг/кг как максимально переносимая доза (МПД), 4-я группа – ФБ + 5-ФУ (800, 200 мг/кг), 5-я группа – 5-ФУ (100 мг/кг), 6-я группа – ФБ + 5-ФУ (800, 100 мг/кг). Животные получали препараты через 48 ч после перевивки в течение 14 дней. Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили процент торможения роста опухоли (ТРО, %) и средняя продолжительность жизни (СПЖ, %) животных.

Результаты. Показано, что наиболее выраженное ингибирование роста опухоли наблюдалось при комбинированном лечении на 14-й день после перевивки в группе ФБ + 5-ФУ (200 мг/кг) и ФБ + 5-ФУ (100 мг/кг), ТРО = 92–96 % и 83–90 % соответственно по отношению к контролю. Сравнение сочетанной терапии с монотерапией показало ТРО = 63–72 % по отношению к ФБ и 54–57 % по отношению к 5-ФУ, что свидетельствует о наличии синергического противоопухолевого эффекта, который сохранялся в течение 21 дня на уровне ТРО = 72–87 % ($p < 0,05$). Пролонгированное пероральное введение ФБ в комбинации с 5-ФУ значительно улучшало толерантность и увеличило продолжительность жизни животных на 33 %, что в 1,5 раза больше, чем при монотерапии.

Выводы. Полученные данные позволяют заключить, что рациональное сочетание HDAC с цитотоксическими агентами способно преодолеть механизм устойчивости опухолевых клеток и привести к синергическому противоопухолевому эффекту, а также снизить токсичность.

Ключевые слова: фенилбутират, 5-фторурацил, карцинома Эрлиха, ингибитор деацетилазы гистонов, комбинированная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-70-75

THE STUDY OF ANTITUMOR ACTIVITY OF PHENYLBUTYRATE IN COMBINATION WITH 5-FLUOROURACIL ON MODEL OF EHRLICH CARCINOMA

N.P. Fadeev, R.I. Kharisov, E.G. Kovan'ko, Yu.I. Pustovalov, V.L. Fadeeva

Russian Research Center of Radiology and Surgical Technologies, Ministry of Health of Russia;
70/1 Leningradskay St., Pesochny, Saint. Petersburg, 197758, Russia

Introduction. Until now, the search continues for new anticancer drugs with high efficacy and low toxicity profile. One promising class of anticancer agents that meet these requirements are histone deacetylase inhibitors (HDAC), in particular, sodium phenylbutyrate (PB).

Aim. Experimental estimate of the dose and time dependence of the antitumor activity, and tolerability during prolonged oral administration of PB in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on Ehrlich carcinoma model.

Materials and methods. The animals were divided into 6 groups ($n = 20$ mice): 1st (control group) – received normal drinking water, 2nd – PB (800 mg/kg), an aqueous solution instead of drinking water, 3th – 5-FU (200 mg/kg), as the maximum tolerated dose (MTD), 4th – PB + 5-FU (800, 200 mg/kg), 5th – 5-FU (100 mg/kg) intraperitoneally, once, and 6th – PB + 5-FU (800, 100 mg/kg). The drugs were administered sequentially 48 hours after inoculation for 14 days.

Results. The most pronounced inhibition of tumor growth was observed in the combined treatment on the 14th day after inoculation in group PB + 5-FU (200 mg/kg) and PB + 5-FU (100 mg/kg), tumor growth inhibition (TGI) = 92–96 % and 83–90 % respectively, compared to controls. Comparison of combined treatment with monotherapy showed a significant increase in TGI = 63–72 %, and with

respect to PB and 54–57 % relative to 5-FU, which indicating of synergistically antitumor effect, which persisted after treatment on level of TGI = 72–87 % ($p < 0.05$), which persisted for 21 days on level of TGI = 72–87%. Prolonged oral administration PB in combination with 5-FU significantly improved tolerance and increased lifespan of the animals at 33 %, which was 1.5 times more, compared with monotherapy.

Conclusions. These data allow to conclude that a rational combination of HDAC with cytotoxic agent is able to overcome the resistance mechanism of tumor cells and lead to a synergistic antitumor effect and lower toxicity.

Key words: phenylbutyrate, 5-fluorouracil, Ehrlich carcinoma, tumor growth inhibition, combined therapy

Введение

Современная стратегия в лечении злокачественных новообразований ориентирована на рациональную комбинацию противоопухолевых средств, обусловленную фенотипическими особенностями опухолевой клетки. Кроме того, большинство существующих препаратов не обладают избирательным действием без увеличения токсичности [1–3]. Для преодоления имеющихся барьеров используются препараты с различными механизмами противоопухолевого действия. Из них наиболее перспективные способны одновременно блокировать несколько различных механизмов онкогенеза. В последние годы в число препаратов, отвечающих этим требованиям, входят ингибиторы деацетилаз гистонов (HDAC), механизм которых заключается в стимулировании быстрого накопления гиперацетилированных гистоновых белков, приводящего к деконденсации хроматина и активации транскрипции ряда генов-супрессоров, подавленных в опухолевых клетках [4–6]. Многочисленными доклиническими и клиническими исследованиями установлено, что HDAC способны оказывать плейотропное противоопухолевое воздействие на различные фенотипические признаки опухолевой клетки [7, 8]. В данном контексте представляет интерес отчетливая тенденция включения в протоколы комбинированной терапии биотерапевтических агентов, которые отличаются высокой противоопухолевой активностью, низкой токсичностью и синергичны в комбинации с традиционными химиопрепаратами [9, 10]. Одним из представителей такого класса, привлекающим внимание онкологов, является фенилбутират (ФБ) — дериват масляной кислоты естественного биологического соединения, обнаруженного в органах и тканях человека в миллимолярных концентрациях. ФБ выступает ингибитором деацетилазы гистонов, механизм действия которого основан на эпигенетической регуляции нарушений клеточного цикла опухолей. В *in vitro* и *in vivo* исследованиях установлено, что ФБ обладает многофункциональными свойствами, индуцируя цитостазис, дифференцировку и апоптоз в опухолях различного генеза. Кроме того, терапевтический потенциал ФБ заключается в его способности снижать вовлеченные в опухолевый процесс прогрессию, инвазию и ангиогенез [11, 12]. Клинические испытания ФБ в качестве

монотерапии показали его низкую миелотоксичность [13], и поэтому возможна его комбинация с традиционными противоопухолевыми агентами, в частности 5-фторурацилом (5-ФУ), который применяется в лечении рака ободочной кишки и входит в схемы химиотерапии опухолей других локализаций. Как цитотоксический агент, 5-ФУ отличается высокой противоопухолевой активностью, однако имеет и серьезные побочные эффекты, такие как гематологическая и гастроинтестинальная токсичность [14, 15]. Механизм действия 5-ФУ основан на превращении его в опухолевых клетках в 5-фтор-2-дезоксидеоксиуридин-5'-монофосфат, являющийся конкурентным ингибитором тимидилатсинтазы (TS), избыточная экспрессия которой рассматривается как ключевой фактор, определяющий устойчивость опухоли к химиотерапии с 5-ФУ. Поэтому до сих пор ведутся поиски преодоления этих барьеров с использованием комбинации нескольких препаратов с различными механизмами воздействия с целью модификации нежелательных биологических реакций [16, 17]. В недавних исследованиях показана способность ФБ подавлять TS в опухолевых клетках различного генеза. Однако наряду с положительными результатами отмечаются и их недостатки, ассоциированные с выбором адекватных дозовых и временных показателей и селективной доставки лекарственных средств, которые способны сохранять свою активность на протяжении всего курса лечения, не увеличивая токсичность [18].

Таким образом, применение ФБ в комбинации с противоопухолевыми препаратами представляется перспективным, однако имеющиеся в литературе данные недостаточны или противоречивы и поэтому требуют дальнейшего изучения.

Цель данного исследования — изучить дозовую и временную зависимость противоопухолевой активности и переносимости при пролонгированном пероральном введении ФБ в комбинации с 5-ФУ на модели солидной опухоли Эрлиха.

Материалы и методы

Исследование проводилось на 120 половозрелых самках беспородных мышей весом $25 \pm 1,5$ г, которым опухоль Эрлиха в виде суспензии, содержащей 5×10^6 опухолевых клеток в 0,2 мл 0,9 % раствора

натрия хлорида, была перевита внутримышечно в бедренную часть задней лапы. Для исследования использовали препарат ФБ (производство Chemical-Line) в виде порошка для приготовления водного раствора. 5-ФУ вводили внутривентриально однократно в дозах 200 и 100 мг/кг. Животные были разделены на 6 групп (по 20 особей): 1-я группа (контрольная) получала обычную питьевую воду *ad libitum*, 2-я группа (опытная) – водный раствор ФБ в дозе 800 мг/кг/сут вместо питьевой воды (эта доза была нами определена в предыдущем исследовании как оптимальная терапевтическая доза) [13], 3-я группа – 5-ФУ в дозе 200 мг/кг, как максимально переносимая доза (МПД) [19], 4-я группа – ФБ + 5-ФУ 200 мг/кг, 5-я группа – 5-ФУ в дозе 100 мг/кг, 6-я группа – ФБ + 5-ФУ 100 мг/кг. Животные получали препараты через 48 ч после перевивки в течение 14 дней. Во время эксперимента также ежедневно оценивали объем выпитых растворов ФБ и сравнивали с данными контрольной группы. Средний объем выпитой каждой мышью жидкости был одинаков во всех группах и составил в среднем 2,5 мл. Критериями оценки противоопухолевого эффекта служили: процент торможения роста опухоли (ТРО, %) = $(V_k - V_0)/V_k \times 100$ %, где V_k – объем опухоли в контроле, V_0 – объем опухоли в опыте и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) = $(СПЖ_0 - СПЖ_k)/СПЖ_k \times 100$ %, где СПЖ_к – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ_о – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

В период проведения опыта и по его завершении не отмечено каких-либо изменений в поведении животных и их отношении к корму. Наблюдение за животными продолжалось до их гибели. Токсичность ФБ оценивалась по ранней гибели опытных мышей по сравнению с гибелью контрольных животных и изменению массы тела по сравнению с исходной, а также по состоянию показателей периферической крови. Полученные результаты подвергались статистической обработке с использованием критерия t Стьюдента и точного метода Фишера. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$. Все манипуляции на животных проводились под контролем этического комитета РНЦРХТ МЗ РФ.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ динамики роста солидной опухоли (рис. 1, табл. 1) показал статистически достоверный противоопухолевый эффект во всех группах на протяжении всего эксперимента.

Наиболее выраженное ингибирование опухоли наблюдалось на 7-е и 14-е сутки после перевивки в группах ФБ + 5-ФУ в дозах 200 и 100 мг/кг

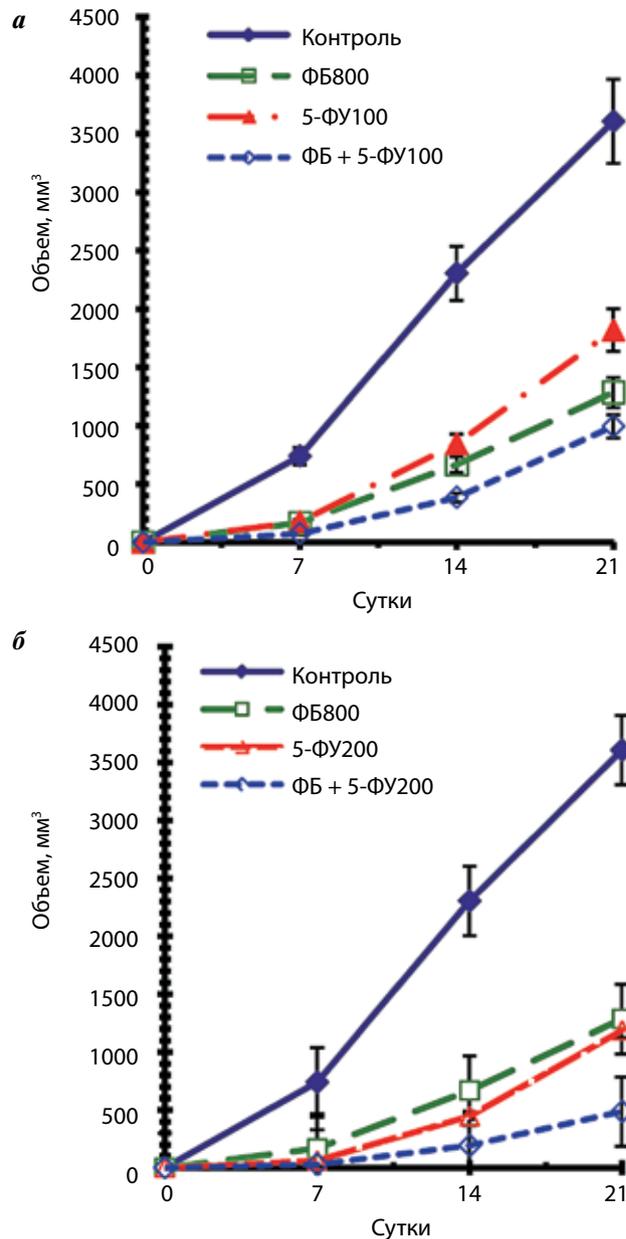


Рис. 1. Динамика роста опухоли в контроле и в группах 5-ФУ 200 мг/кг и ФБ + 5-ФУ 200 мг/кг (а) и в группах 5-ФУ 100 мг/кг и ФБ + 5-ФУ 100 мг/кг (б)

по критерию ТРО = 92–96 % и 83–90 % соответственно по отношению к контролю ($p < 0,05$). В группах, получавших ФБ и 5-ФУ в монорегиме, торможение роста опухолей было менее выраженным. Сравнение комбинированного лечения ФБ + 5-ФУ в дозах 200 и 100 мг/кг с монотерапией этими препаратами на 14-й день эксперимента показало статистически достоверное увеличение ТРО = 63–72 % по отношению к ФБ и на 54–57 % по отношению к 5-ФУ, что свидетельствует о наличии синергического эффекта ($p < 0,05$).

Привлекает внимание отчетливое последствие используемых препаратов, особенно в их комбинации,

Таблица 1. Влияние ФБ и 5-ФУ и их комбинации на торможение роста опухоли

Группа, доза ФБ, мг/кг	Объем опухоли после перевивки, мм ³			ТРО, %		
	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки	7-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Контроль	740,1 ± 107,0	2305 ± 261,8	3608,7 ± 232,8	—	—	—
ФБ 800	167,7 ± 31,0*	668,4 ± 86,5*	1284,8 ± 231,2*	77*	71*	64*
5-ФУ 200	63,9 ± 2,97*	446,6 ± 78,8*	1186 ± 232,02*	91*	81*	67*
ФБ + 5-ФУ 200	29,6 ± 6,75*	191,7 ± 58,5*	486,1 ± 108,8*	96*	92*	87*
5-ФУ 100	177,6 ± 32,6*	845,8 ± 151,6*	1820,4 ± 280,0*	76*	63*	50*
ФБ + 5-ФУ 100	74 ± 6,7*	385,4 ± 67,0*	995,8 ± 65,7*	90*	83*	72*

Примечание. Статистически достоверно по отношению к контролю, * $p < 0,05$.

что позволяет удерживать противоопухолевый эффект на уровне ТРО = 72–87 % на 21-й день от начала лечения, что, как известно, является важным моментом при снижении «клеточного возврата» между циклами химиотерапии и роли ФБ как дифференцирующего агента [10]. Кроме того, сравнение полученных данных не выявило существенных различий в эффективности между двумя комбинациями, из чего следует, что применение 5-ФУ в меньшей дозе наиболее перспективно для снижения токсичности, о чем свидетельствуют данные, представленные на рис. 2.

Из рис. 2 следует, что на 14-й день после начала лечения достоверное снижение массы тела мышей наблюдалось только в группах 5-ФУ 200 мг/кг и ФБ + 5-ФУ 200 мг/кг и составило 16 и 10 % соответственно.

Гибель 2 мышей отмечена лишь в группе 5-ФУ 200 мг/кг, при их вскрытии обнаружены явления интоксикации в виде умеренного венозного полнокровия паренхиматозных органов и кишечника, что указывает на гастроинтестинальную токсичность. При сочетанном применении исследуемых препаратов не наблюдалось гибели мышей, диареи и отказа от корма на протяжении всего опыта. В дальнейшем отмечался медленный прирост массы тела только в группе ФБ + 5-ФУ 200 мг/кг, который к окончанию опыта достигал контрольных значений. В группах ФБ + 5-ФУ 100 мг/кг масса тела мышей соответствовала контролю на протяжении всего эксперимента ($p < 0,05$). К концу наблюдения отмечалось увеличение массы тела мышей, обусловленное ростом опухолевого узла, которое было наиболее выражено в контроле

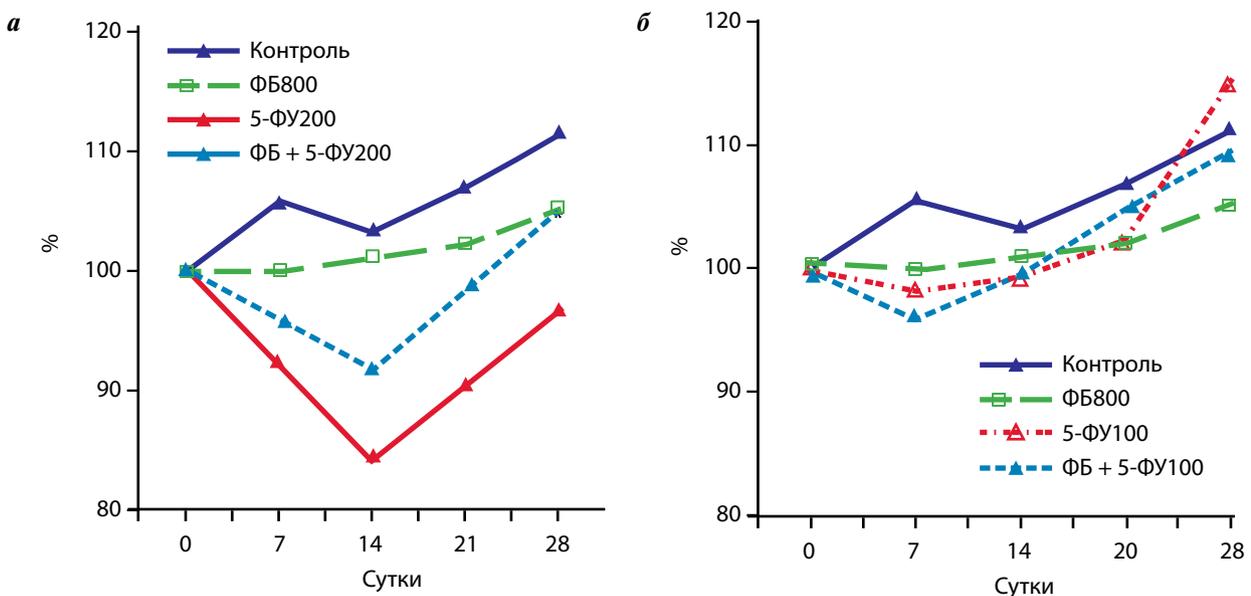


Рис. 2. Динамика изменения массы тела мышей в группах ФБ, 5-ФУ 200 мг/кг и ФБ + 5-ФУ 200 мг/кг (а) и в группах ФБ, 5-ФУ 100 мг/кг и ФБ + 5-ФУ 100 мг/кг (б)

и в значительно меньшей степени — в опытных группах, кроме группы 5-ФУ 100.

Как следует из табл. 2, наибольший эффект по увеличению средней продолжительности жизни опытных животных был получен при комбинации ФБ + 5-ФУ в дозе 200 и 100 мг/кг и составил 31–33 % соответственно по сравнению с контролем ($p < 0,05$), а при монотерапии этими препаратами УПЖ был почти в 1,5 раза меньше, что подтверждалось при сравнении с 25 и 75 % перцентилей с контролем.

Таблица 2. Влияние ФБ и 5-ФУ и их комбинации на продолжительность жизни мышей

Группа, доза, мг/кг/сут	СПЖ, дни	УПЖ, %	Выживаемость, дни	
			25-й процентиль	75-й процентиль
Контроль	27,3 ± 1		27	32
ФБ	34,8 ± 1,4	22	31	42
5-ФУ 200	34,2 ± 4,1	23*	34	43
ФБ + 5-ФУ 200	39,7 ± 3,4	31*	36	46
5-ФУ 100	34,1 ± 0,9	21*	33	42
ФБ + 5-ФУ 100	40,5 ± 2,2	33*	37	47

Примечание. УПЖ по отношению к контролю, * $p < 0,05$.

Сравнительный анализ показателей периферической крови (табл. 3) не выявил статистически

значимых различий в группе, получавшей ФБ в монотерапии, что свидетельствует о его низкой миелотоксичности, отмеченной нами ранее [13]. Применение 5-ФУ 200 и 100 мг/кг в монотерапии и в комбинации на 7-е сутки после перевивки вызывало глубокую лейкопению. К 14-м суткам наблюдалась тенденция увеличения количества лейкоцитов только в группах с двукратным снижением 5-ФУ и составила $3,3 \pm 0,4$ и $4,1 \pm 0,9 \times 10^9/\text{л}$ соответственно по сравнению с $1,2 \pm 0,1 \times 10^9/\text{л}$ и $2,0 \pm 1,2 \times 10^9/\text{л}$ на 7-е сутки ($p < 0,05$). К концу наблюдения (30-е сутки) уровень лейкоцитов достигал исходных значений. Анализ показателей красной крови установил, что при монотерапии в группах 5-ФУ 200 и 100 мг/кг на 7-е и 14-е сутки после перевивки отмечалось достоверное снижение количества эритроцитов и концентрации гемоглобина на 12–17 % соответственно по отношению к контролю. При комбинированном лечении показатели уровня эритроцитов и гемоглобина достоверно не отличались от исходных данных, и к концу эксперимента оставались в пределах физиологической нормы ($p < 0,05$). Оценка динамики изменения тромбоцитов у животных, получавших комбинированную терапию, особенно в группе ФБ + 5-ФУ 100 мг/кг, показала, что их уровень был достоверно выше по сравнению с монотерапией и к концу эксперимента достигал исходных значений.

Из представленных данных следует, что включение в протокол комбинированной терапии ФБ не усугубляло вызванную 5-ФУ гематотоксичность, при этом отмечена тенденция к снижению цитопении и ее

Таблица 3. Влияние ФБ и 5-ФУ и их комбинации на динамику состояния периферической крови

Группа, доза г/кг	7 дней				14 дней				30 дней			
	Эритроциты $\times 10^{12}/\text{л}$	Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	Гемоглобин г/л	Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$	Эритроциты $\times 10^{12}/\text{л}$	Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	Гемоглобин г/л	Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$	Эритроциты $\times 10^{12}/\text{л}$	Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	Гемоглобин г/л	Тромбоциты $\times 10^9/\text{л}$
Контроль	7,5 ± 0,3	10,4 ± 1,1	152 ± 3,6	543 ± 7,7	6,8 ± 0,2	10,1 ± 1,5	199,5 ± 8,2	615,7 ± 12,6	6,8 ± 0,2	17,6 ± 1,6	169 ± 3,4	387 ± 11,8
ФБ 800	7,3 ± 0,2	11,3 ± 2,1	158 ± 3,6	525 ± 6,7	7,2 ± 0,2	10,7 ± 0,3	174,5 ± 5,9	575,7 ± 7,3	6,7 ± 0,2	9,4 ± 1,8*	148 ± 4,8*	555 ± 12,2
5-ФУ 200	6,6 ± 0,6*	2,0 ± 1,2**	146 ± 9,8	129 ± 8,7**	6,4 ± 0,1	1,9 ± 0,5	156 ± 6,3	303 ± 15,6***	6,5 ± 0,1**	12,7 ± 2,6	146 ± 4,8**	601 ± 22,3
ФБ + 5-ФУ 200	7,2 ± 0,4	1,2 ± 0,1***	154 ± 8,7	163 ± 6,2*	6,2 ± 0,9	2,3 ± 0,3	157 ± 7,8	404 ± 18,6**	7,2 ± 0,2	12,5 ± 1,9	165 ± 12,0	591 ± 19,8
5-ФУ 100	6,2 ± 0,2**	1,6 ± 0,1***	146 ± 6,2	254 ± 10,6*	6,7 ± 0	3,3 ± 0,4	180,7 ± 6,5	383 ± 18,3***	6,6 ± 0,1	19,4 ± 2,6	144 ± 9,5*	583 ± 19,6
ФБ + 5-ФУ 100	7,6 ± 0,5	1,5 ± 0,1***	166 ± 5,9	273 ± 13,6*	6,75 ± 0	4,1 ± 0,9	184,5 ± 6,3	513 ± 16,5**	7 ± 0,2	17,7 ± 1,5	166 ± 3,6	477 ± 22,7

Примечание. Статистически достоверные различия с контролем, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

нормализации после окончания лечения, что согласуется с данными литературы [11, 20].

Заключение

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что пролонгированное пероральное введение ФБ в сочетании с 5-ФУ обладает выраженной противоопухолевой активностью в отношении солидной карциномы Эрлиха. Терапевтический эффект реализовался увеличением торможения роста опухоли благодаря способности ФБ подавлять TS – опосредованную лекарственную устойчивость и тем самым привести к синергическому эффекту. Сравнительный анализ полученных данных показал, что профиль безопасности комбинации ФБ + 5-ФУ был более благоприятным, чем при монотерапии с 5-ФУ. Уста-

новлено, что двукратное снижение дозы 5-ФУ не выявило значимых различий ТРО между двумя комбинациями и достоверно увеличивало продолжительность жизни опытных животных и улучшало переносимость химиотерапии. Важно отметить, что ФБ не усугублял гематологическую токсичность, вызванную 5-ФУ. Кроме того, у опытных животных, получавших комбинированную терапию, не наблюдалось явлений гастроинтестинальной токсичности.

Таким образом, представленные данные согласуются с исследованиями, свидетельствующими, что рациональное сочетание HDAC с цитотоксическими агентами способно преодолеть механизм устойчивости опухолевых клеток и привести к синергическому противоопухолевому эффекту, а также существенно снизить токсичность [1, 3, 16].

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Acharya M.R., Sparreboom A., Venitz J. et al. Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. *Mol Pharmacol* 2005;8 (4):917–32. DOI: 10.1124/mol.105.014167.
- Cohen D.J., Hochster H.S. Rationale for Combining Biotherapy in the Treatment of Advanced Colon Cancer Gastrointest. *Cancer Res* 2008;2(3):145–51. PMID: PMC2633070.
- Thurn K.T., Thomas S., Moore A., et al. Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Future Oncol* 2011;7(2):263–83. DOI: org/10.2217/2Ffon.11.2.
- Чуйкин И.А., Лянгузова М.С., Поспелов В.А. Механизмы антипролиферативного действия ингибиторов деацетилаз гистонов на эмбриональные стволовые клетки мыши. *Цитология* 2006;48(8):612–23.
- Bots M., Johnstone R.W. Racional Combinations Using HDAC Inhibitors. *Clin Cancer Res* June 2009;15(12):3970. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2786.
- Gilbert J., Baker S.D., Bowling M.K. et al. A phase I dose escalation and bioavailability study of oral sodium phenylbutyrate in patients with solid tumor malignancies. *Clin Cancer Res* 2001;7:292–300.
- Carraway H.E., Gore S.D. Addition of Histone Deacetylase Inhibitors in Combination Therapy. *J Clin Oncol* 2007;25(15):1955–6. DOI: 10.1200/JCO.2006.09.8293.
- Sigalotti L., Fratta E., Coral S. et al. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. *J Cell Physiol* 2007;212(2):330–47. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.015.
- Барышников А.Ю. Биотерапия опухолей: неудачи и перспективы. *Маммология* 2007;1:13–6.
- Sung M.W., Waxman S. Combination of Cytotoxic-Differentiation Therapy with 5-Fluorouracil and Phenylbutyrate in Patients with Advanced Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2007;27(2):995–1002. PMID: 17465233.
- Gore S.D., Weng L.J., Zhai S. et al. Impact of prolonged infusions of the putative differentiating agent sodium phenylbutyrate on myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Clin Canc Res* 2002;8(4):963–70.
- Iannitti T., Palmieri B. Clinical and Experimental Applications of Sodium Phenylbutyrate. *Drugs R & D* 2011;11(3):227–49. DOI: org/10.2165%2F11591280-000000000-00000.
- Фадеев Н.П., Харисов Р.И., Кованько Е.Г., Пустовалов Ю.И. Изучение противоопухолевой активности фенилбутирата натрия как ингибитора деацетилазы гистонов на модели карциномы Эрлиха. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015;159(5):612–4.
- Имянитов Е.Н., Хансон К.П. Индивидуализация терапии опухолей. Молекулярная онкология, клинические аспекты 2007:176–83.
- Трещалин И.Д., Переверзева Э.З., Бодягин Д.А. и др. Модификация токсичности противоопухолевых препаратов как метод повышения эффективности химиотерапии злокачественных новообразований. *Российский биотерапевтический журнал* 2005;4(3):106–11.
- Fazzone W., Wilson P.M., Labonte M.J. et al. Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells. *Int J Cancer* 2009;125(2):463–73. DOI: 10.1002/ijc.24403.
- Lee J.H., Park J.H., Jung Y. et al. Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. *Mol Canc Ther* 2006;5(12):3085–95. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0419.
- Shack S., Miller A., Liu L. et al. Vulnerability of Multidrug-resistant Tumor Cells to the Aromatic Fatty Acids Phenylacetate and Phenylbutyrate. *Clin Canc Res* 1996;2:865–72. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-0747-3.
- Вершинина С.Ф., Стуков А.Н. Справочник по экспериментальной терапии опухолей. СПб., 2008.
- Miller A.C., Cohen S., Stewart M. et al. Radioprotection by the histone deacetylase inhibitor phenylbutyrate. *Biophysics* 2011;50:585–96. DOI: 10.1007/s00411-011-0384-7.

ВОЗДЕЙСТВИЕ МУЛЬТИФИТОАДАПТОГЕНА В РАННЕМ ПОСТНАТАЛЬНОМ ОНТОГЕНЕЗЕ, УЛУЧШАЮЩЕЕ ВЫЖИВАЕМОСТЬ И СОМАТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ МЫШЕЙ ВЫСОКОРАКОВОЙ ЛИНИИ

Е. В. Бочаров¹, Р. В. Карпова¹, О. А. Бочарова¹, В. Г. Кучеряну², З. С. Шпрах¹

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

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

Контакты: Регина Васильевна Карпова planta39@rambler.ru

Цель исследования – изучение воздействия мультифитоадаптогена (МФА) на продолжительность жизни и соматическое состояние мышей-самцов высокораковой линии СВА при профилактическом применении в раннем постнатальном онтогенезе. **Материалы и методы.** В работе исследовали стандартизованный препарат МФА, включающий компоненты 40 растительных экстрактов, в том числе адаптогенов женьшеня, элеутерококка, родиолы розовой. МФА оказывает иммуномодулирующий, адгезиогенный, интерферогенный, антимутагенный, антиоксидантный и радиопротекторный эффекты. В работе использовано 131 животное. Опытные животные получали 10 % раствор МФА с питьевой водой в течение 1-го месяца постнатального развития, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени. В позднем онтогенезе оценивали соматическое состояние животных (двигательную активность, массу тела, состояние шерстного покрова), среднюю продолжительность жизни (СПЖ) животных и медиану выживаемости. Двигательную активность определяли, используя тест «открытого поля» в автоматическом режиме, с помощью системы Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, США). Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0. Медиану выживаемости определяли методом Каплана–Мейера.

Результаты. Применение МФА способствовало увеличению СПЖ высокоракковых мышей-самцов СВА на 17,1 % ($p < 0,001$), медианы выживаемости – на 25,6 % ($p < 0,001$). Повышение выживаемости сопровождалось сохранением двигательной активности животных без признаков похудения и алопеции.

Заключение. Нетоксичный иммуномодулятор МФА, применяемый в раннем постнатальном онтогенезе, повышал продолжительность жизни, сохраняя удовлетворительное соматическое состояние высокоракковых мышей-самцов линии СВА, вместе с тем подавляя развитие гепатокарцином.

Ключевые слова: продолжительность жизни, высокоракковая линия мышей СВА, фитоадаптоген, женьшень, родиола розовая

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-76-81

MULTIPHYTOADAPTOGENE ADMINISTRATION IN EARLY POSTNATAL ONTOGENESIS IMPROVE LIFE-SPAN AND PHYSICAL STATUS OF HIGH-CANCER MICE

E. V. Bocharov¹, R. V. Karpova¹, O. A. Bocharova¹, V. G. Kucheryanu², Z. S. Shprakh²

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

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

The aim of this investigation was to evaluate the life-span and physical status (weight, hair character, motor activity) of CBA inbred mice with high frequency of spontaneous hepatocarcinomas using multiphytoadaptogene complex (MPAC) preventive administration in early postnatal ontogenesis.

Materials and method. MPAC is a herbal formula composed of forty plants water-ethanol extracts components including adaptogenes Panax ginseng, Eleutherococcus senticosus, Rhodiola rosea. Anti-tumour, anti-oxidant, anti-mutagenic, immunomodifying activities of MPAC was demonstrated in previous studies. The study was carried out on 131 males of CBA mouse strain. The experimental mice received 10 % MPAC solution in drinking water during the first month of life including the final time period of liver differentiation. Motor activity was determined by a test of the «open field» automatically using Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, USA). The average life-span was evaluated. Statistical analysis was performed with the program STATISTICA 6.0. Survival median was determined by the Kaplan–Meier method.

Results. MPAC preventive use in early postnatal ontogenesis promotes mouse longevity increase for 17,1 % ($p \leq 0,001$), longevity median – for 25,6 % ($p \leq 0,001$). Physical status of experimental animals using MPAC administration had an advantage over control mice.

Conclusion. So, data obtained demonstrate nontoxic MPAC administration in early ontogenesis promotes significant life-span increase, keeps the body weight, good coat state, motor activity as well as prevents hepatocarcinomas formation.

Key words: life-span, CBA high-cancer strain of mice, phytoadaptogene, *Panax ginseng*, *Rhodiola rosea*

Введение

Профилактические в отношении опухолей эффекты препаратов принято оценивать, учитывая их превентивное действие на спонтанное опухолеобразование у линейных мышей. Классической экспериментальной моделью спонтанного канцерогенеза признана линия мышей СВА с высокой частотой возникновения гепатом. У мышей-самцов этой линии гепатомы наблюдают начиная с 6 мес, и в позднем онтогенезе (в возрасте 18–22 мес) определяют в 100 % случаев [1–4]. Вместе с тем выявление профилактического эффекта препаратов становится возможным благодаря изучению роли иммунобиологических систем в противоопухолевых реакциях организма.

В предыдущих исследованиях у 10 % мышей-самцов линии СВА уже в возрасте 8 мес определяли трабекулярные гепатокарциномы умеренной дифференцировки. В позднем онтогенезе (22 мес) у 100 % животных были выявлены низкодифференцированные трабекулярно-ацинарные гепатокарциномы [5]. Опухолевая прогрессия сопровождалась снижением экспрессии лейкоцитарных интегринов LFA-1 и Mac-1 (которые могут обеспечивать контактные взаимодействия иммунных эффекторов и опухолевых клеток), что способствует экранированию опухоли от иммунологического надзора. Вместе с тем подавление иммунных реакций, вероятно, обеспечено и возрастанием сывороточного уровня супрессорных интерлейкинов-6 и -10 (ИЛ-6, ИЛ-10) [6]. Применение нетоксичного адгезиогенного мультифитоадаптогена (МФА) в раннем постнатальном онтогенезе способствовало долговременному повышению экспрессии LFA-1 и Mac-1, подавлению сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 [6], снижению уровня наследственного опухолеобразования (количества и размеров гепатокарцином по сравнению с контрольными животными) [7]. Вместе с тем при воздействии МФА выявлена лейкоцитарная, в основном с участием лимфоцитов, инфильтрация и деструкция гепатокарцином [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение профилактического воздействия МФА в раннем постнатальном онтогенезе на продолжительность жизни и соматическое состояние мышей-самцов линии СВА с высокой частотой спонтанного опухолеобразования.

Материалы и методы

В исследование были включены опытная группа ($n = 48$) и 2 контрольные группы (1-я группа – 61, 2-я группа – 22) мышей-самцов высокоразовой

линии СВА (сублиния СВА/Лас Y). Мыши были получены из отдела разведения лабораторных животных ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали в стандартных условиях вивария в соответствии с международными этическими нормами, мышам давали обычный пищевой рацион. Начиная с последних сроков беременности до отъема детенышей в возрасте 3 нед самкам давали МФА. Затем в течение 1 нед детеныши-самцы пили воду с препаратом самостоятельно. Таким образом, опытные животные получали 10 % раствор МФА с питьевой водой в течение 1-го месяца постнатального развития, включая период (5–15-й день) завершения дифференцировки нормальной ткани печени. В 1-й контрольной группе мыши получали воду в качестве питья. Поскольку препарат является водно-спиртовым экстрактом, во 2-й контрольной группе мыши получали 3 % раствор этанола в воде (что соответствует концентрации этанола в получаемом животными препарате). Результаты определения изучаемых параметров в обеих контрольных группах не имели достоверных различий, поэтому эти группы были объединены в одну контрольную группу ($n = 83$).

В позднем онтогенезе оценивали массу тела, двигательную активность, состояние шерстного покрова и число животных с признаками алопеции. Двигательную активность определяли, используя тест «открытого поля» в автоматическом режиме, с помощью системы Opto-Varimex-3 (Columbus Instruments, США).

Статистический анализ результатов проводили с использованием программы STATISTICA 6.0, применяя дисперсионный анализ One-way ANOVA с оценкой достоверности различий по критерию Newman-Keuls в дальнейшем. Выживаемость животных анализировали по методу Каплана–Майера с определением достоверности различий между группами по F-критерию Кокса.

МФА представляет собой нетоксичный препарат на основе компонентов экстрактов 40 растений, включенных в Госфармакопею РФ, в том числе известных адаптогенов женьшеня, родиолы розовой, элеутерококка, лимонника, аралии. В составе МФА определены гинзенозиды, аралозиды, элеутерозиды, флавоноиды, полифенолы, витамины, аминокислоты и др. Разработаны способы его биологической и химической стандартизации [8–11]. В ранее проведенных исследованиях показаны иммуномодулирующие, в том числе интерферогенные и адгезиогенные,

Таблица 1. Средняя продолжительность жизни (СПЖ) и медиана выживаемости мышей-самцов линии СВА при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе

Показатель	Группа		p
	контрольная	опытная	
Количество животных	83	48	
СПЖ (M ± m), день (мес)	662,0 ± 16,5 (21,7)	775,1 ± 21,3 (25,4)	$p_{1-2} < 0,001$
Медиана выживаемости, день (мес)	631,4 (20,7)	793 (26,0)	$p_{1-2} < 0,001$
Выживаемость > 1000 дней, %	0	4,2 ± 0,3 (n = 2)	

антиоксидантные, антимуtagenные, радиопротекторные, противоопухолевые свойства МФА [12–20].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты определения СПЖ и медианы выживаемости мышей-самцов высококорактовой линии СВА под воздействием МФА в раннем постнатальном онтогенезе. СПЖ мышей контрольной группы в среднем составила $662,0 \pm 16,5$ дня (21,7 мес), едва не достигнув 2 лет. Использование МФА способствовало продлению жизни опытных мышей на 17,1 % (до $775,1 \pm 21,3$ дня, или 25,4 мес). На основании кривых выживаемости (рис. 1), построенных по методу Каплана–Майера, было выявлено, что медиана выживаемости мышей опытной группы увеличилась на 25,6 % по сравнению с мышами контрольной группы и составила 26,0 мес (793 дня) и 20,7 мес (631,4 дня) соответственно. Полученные результаты, вероятно, имеют существенное значение, учитывая тот факт, что профилактическое воздействие МФА снижало уровень наследственного опухолеобразования, а именно количество мышей с опухолями, число и объем опухолей у 1 животного [7].

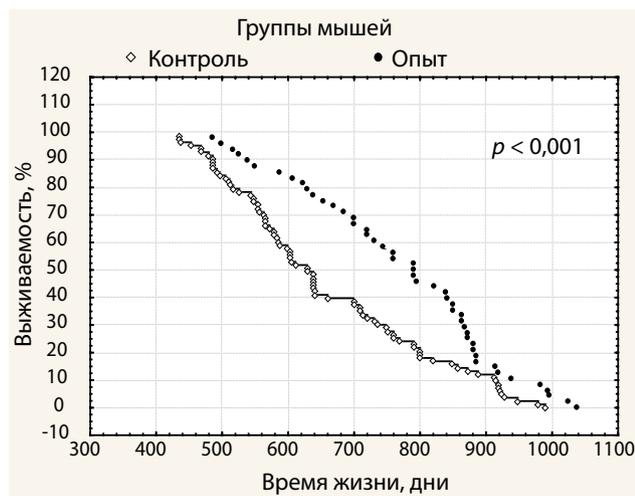


Рис. 1. Кривые выживаемости мышей-самцов линии СВА при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе ($p \leq 0,001$)

По соматическому состоянию опытные животные имели преимущество перед контрольными мышами. В возрасте 22 мес среднее значение массы тела опытных животных было достоверно выше, чем контрольных (рис. 2). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что у контрольных животных в той или иной степени выражены кахектические явления, очевидно, связанные как с возрастными изменениями, так и с опухолевым процессом. Вместе с тем в сыворотке крови мышей контрольной группы выявлена повышенная концентрация ИЛ-6 и ИЛ-10, участвующих в патогенезе кахексии, в частности способствующих повышению сывороточного уровня С-реактивного белка и расщеплению мышечных белков [21, 22]. У животных опытной группы сохранение массы тела и отсутствие кахектических явлений сочетались с уменьшением сывороточного уровня ИЛ-6 и ИЛ-10 [6]. Вероятно, снижая воспалительную реакцию, МФА препятствует распаду белков и, соответственно, потере мышечной массы.

У мышей опытной группы шерстный покров был полноценным. У 5 (16,7 %) из 30 мышей контрольной группы мы наблюдали признаки алопеции (рис. 3). Полноценный шерстный покров мышей опытной группы сочетался со снижением сывороточного уровня ИЛ-6. Последнее может препятствовать потере шерсти в результате стимуляции функциональной

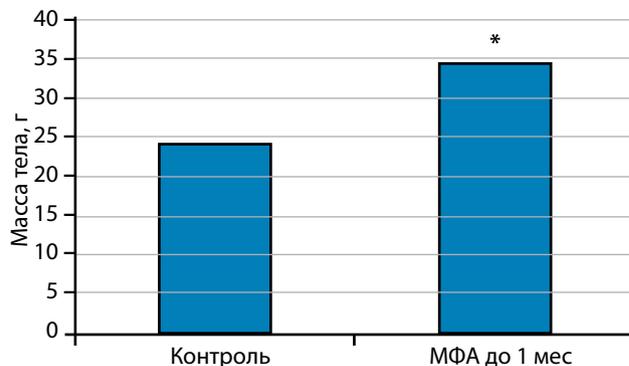


Рис. 2. Масса тела мышей-самцов линии СВА в возрасте 22 мес при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе ($*p < 0,01$)

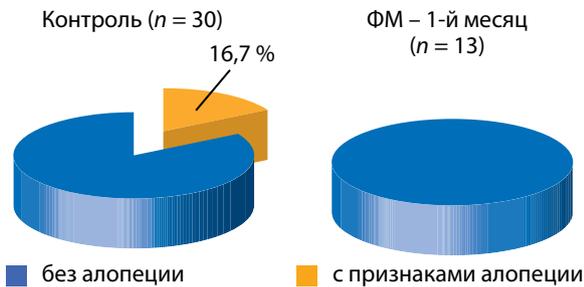


Рис. 3. Характер шерстного покрова мышей-самцов СВА в возрасте 22 мес при воздействии МФА в раннем постнатальном онтогенезе

активности волосяных фолликулов при подавлении воспалительного процесса в кожном покрове [23, 24].

На рис. 4 в качестве примера представлен самец контрольной группы в возрасте 23 мес. Как видно, шерстный покров имеет участки алопеции с признаками седины. Кроме того, у животного снижен вес, что характерно при кахексии. Аналогичный внешний вид в позднем онтогенезе имели 16,7 % животных контрольной группы. На рис. 5 в качестве примера представлено животное опытной группы. Похожее состояние шерстного покрова без дефектов мы наблюдали и у других опытных мышей.

Показатели двигательной активности мышей-самцов линии СВА представлены в табл. 2. Практически по всем изученным параметрам мы не получили достоверных различий между группами, хотя на момент измерений средний возраст контрольных мышей ($23,9 \pm 0,1$ мес) оказался на 6–7 мес меньше по сравнению с опытными животными ($30,1 \pm 0,3$ мес). Иными словами, состояние двигательной активности сравнительно старых животных опытной группы, получавших МФА в течение 1 мес постнатального онтогенеза, практически не уступало аналогичным показателям более молодых контрольных мышей. Вместе с тем, несмотря на более молодой возраст, в контрольной группе мы наблюдали мышей с признаками алопеции, с обесцвеченным шерстным покровом, чего не встречалось у опытных животных.

В конечном итоге при профилактическом воздействии МФА хорошее соматическое состояние



Рис. 4. Внешний вид самца контрольной группы в возрасте 23 мес (16,7 % мышей с признаками алопеции)



Рис. 5. Внешний вид самца опытной группы в возрасте 33 мес (100 % животных без признаков алопеции)

мышей высококорактовой линии сочеталось с увеличением продолжительности жизни по сравнению с контрольными животными.

Следует отметить, что в литературе отмечено увеличение продолжительности жизни мышей без опухолевых патологий до 1356 дней при использовании низкокалорийной диеты, снижающей массу тела животного, начиная с раннего онтогенеза [25]. Механизм действия ограничения калорийности питания

Таблица 2. Параметры двигательной активности в позднем онтогенезе у мышей линии СВА при профилактическом воздействии МФА

Показатель	Группа		P_{1-2}
	Контроль (n = 16)	Прием МФА в течение 1 мес (n = 7)	
Возраст, мес	$23,9 \pm 0,1$	$30,1 \pm 0,3$	$\leq 0,001$
Пройденный путь, см	$1089,6 \pm 74,8$	$933,7 \pm 150,2$	0,12
Время без движения, с	$82,5 \pm 7,6$	$109,3 \pm 16,7$	0,07
Число стоек	$10,0 \pm 1,8$	$5,5 \pm 1,3$	0,31
Число мелких движений	$220,5 \pm 21,0$	$195,5 \pm 20,0$	0,02

включает в себя, например, подавление TOR-сигнального пути регуляции роста и метаболизма, ассоциированного со старением.

Сопоставление с данными других исследователей показывает преимущество полученных нами результатов. Действительно, не обладая токсичностью и проявляя иммуномодулирующие свойства, МФА, применяемый в раннем постнатальном онтогенезе, увеличивал выживаемость мышей, сохраняя удовлетворительный уровень их соматического статуса несмотря на возраст, в том числе без существенного снижения массы тела.

В связи с вышеизложенным полученные результаты значимы для обсуждения механизмов противо-

опухолевых и геропротекторных эффектов нетоксичного препарата иммуномодулирующего действия.

Выводы

Воздействие МФА в раннем онтогенезе, включая завершающий период дифференцировки нормальной ткани печени, увеличивало СПЖ мышей-самцов высокоракковой линии СВА на 17,1 % и медиану выживаемости на 25,6 % по сравнению с контрольными животными.

Лучшую выживаемость мышей-самцов линии СВА, получавших МФА в качестве профилактики, сопровождала удовлетворительная двигательная активность без признаков похудения и алопеции.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Медведев Н. Н. Линейные мыши. Л.: Медицина, 1964. 230 с.
2. Sharp J., Riches A., Littlewood V., Thomas D. The incidence, pathology and transplantation of hepatomas in CBA mice. *J Pathol* 1976;119(4):211–20. DOI: 10.1002/path.1711190405. PMID: 182943.
3. Бочарова О. А., Модянова Е. А. Изменение межклеточных контактов гепатоцитов в онкогенезе у мышей инбридных линий с высокой и низкой частотой спонтанных гепатом. *Онтогенез* 1982;13(4):427–9.
4. Модянова Е. А., Бочарова О. А., Маленков А. Г. Профилактическое действие контактинов-кейлонов на спонтанный канцерогенез у линейных мышей. *Experimental oncology* 1983;5(3):39–42.
5. Бочаров Е. В., Карпова Р. В., Вершинская А. А. и др. Лимфоцитарная инфильтрация гепатокарцином мышей высокоракковой линии СВА при воздействии мультифитоадаптогена в раннем постнатальном онтогенезе. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):85–90.
6. Бочарова О. А., Карпова Р. В., Ильенко В. А. и др. Лейкоцитарные интегрин при гепатоканцерогенезе мышей высокоракковой линии СВА. *Российский биотерапевтический журнал* 2013;12(3):53–6.
7. Бочарова О. А., Бочаров Е. В., Карпова Р. В. и др. Снижение возникновения гепатом при воздействии фитоадаптогена у высокоракковых мышей СВА. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(2):73–6.
8. Шейченко О. П., Бочарова О. А., Шейченко В. И. и др. Возможность использования электронных спектров поглощения для стандартизации многокомпонентного препарата «Фитомикс-40». *Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии* 2007;5(2):20–5.
9. 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.
10. Карпова Р. В., Шевченко В. Е., Бочаров Е. В. и др. Возможности использования высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией для количественного и качественного определения биологически активных веществ женьшеня в фитоэкстрактах. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(2):36–46.
11. 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.
12. Бочарова О. А., Пожарицкая М. М., Чекалина Т. Л. и др. Роль адгезионных нарушений в патогенезе лейкоплакии и возможности их коррекции специфическим иммуномодулятором. *Иммунология* 2004;25(1):36–43.
13. Бочарова О. А., Барышников А. Ю. Фитоадаптогены в онкологии. М.: ЗооМедВет, 2004. 138 с.
14. Пожарицкая М. М., Бочарова О. А., Чекалина Т. Л., Воронин В. Ф. Современные аспекты патогенеза и лечения лейкоплакии слизистой оболочки полости рта. *Методическое пособие для врачей*. М.: ГОУ ВУНМЦ, 2004. 46 с.
15. Бочарова О. А., Карпова Р. В., Матвеев В. Б. и др. Иммуномодулирующий и интерферогенный эффекты комплексного фитоадаптогена при доброкачественной гиперплазии предстательной железы. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(1):90–5.
16. 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.
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. Куренная О. Н., Карпова Р. В., Бочарова О. А. и др. Антимутагенез мультифитоадаптогена в клетках дрожжей-сахаромицетов. *Генетика* 2013;49(12):1364–9.
19. 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(3):55–8.
20. 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(4):51–4.

21. Deans D., Tan B., Ross J. et al. Cancer cachexia is associated with the IL10–1082 gene promoter polymorphism in patients with gastroesophageal malignancy. *Am J Clin Nutr* 2009;89(4):1164–72. DOI: 10.3945/ajcn.2008.27025. PMID: 19244371.
22. Krzystek-Korpacka M., Matusiewicz M., Diakowska D. et al. Acute-phase response proteins are related to cachexia and accelerated angiogenesis in gastroesophageal cancers. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46(3):359–64. DOI: 10.1515/CCLM.2008.089. PMID: 18303990.
23. Biswas S., Pinson D., Bronshteyn I.G., LeVine S. IL-6 deficiency allows for enhanced therapeutic value after bone marrow transplantation across a minor histocompatibility barrier in the twitcher (globoid cell leukodystrophy) mouse. *J Neurosci Res* 2001;65(4):298–307. DOI: 10.1002/Jnr.1154. PMID: 11494365.
24. Yu M., Kissling S., Freyschmidt-Paul P. et al. Interleukin-6 cytokine family member oncostain M is a hair-follicle-expressed factor with hair growth inhibitory properties. *Exp Dermatol* 2008;17(1):12–19. DOI: 10.1111/j.1600–0625.2007.00643.x. PMID: 17979974.
25. Schumacher B., van der Pluijm I., Moorhouse M. et al. Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms. *PLoS Genet* 2008;4 (8):e1000161. PMID: PMC2493043.

ФУКОИДАН ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *FUCUS EVANESCENS*: НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ В ЛЕЧЕНИИ АТЕРОСКЛЕРОЗА

С.П. Крыжановский¹, Т.А. Кузнецова^{2,3}, Б.И. Гельцер³, Т.С. Запорожец^{1,2},
С.П. Ермакова⁴, Н.Н. Беседнова²

¹ФГБУЗ Медицинское объединение ДВО РАН; Россия, 690022 Владивосток, ул. Кирова, 95;

²ФГБУН «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова»;
Россия, 690087 Владивосток, ул. Сельская, 1;

³Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета; Россия, 690922 Владивосток,
о. Русский, п. Аякс, Кампус ДВФУ, корп. М25;

⁴ФГБУН Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН; Россия, 690022 Владивосток,
просп. 100-летия Владивостока, 159

Контакты: Татьяна Алексеевна Кузнецова takuznets@mail.ru

Цель исследования — экспериментальное изучение возможности коррекции нарушений липидного обмена, системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ), структуры печени на модели алиментарной гиперлипидемии фукоиданом.

Материалы и методы. Фукоидан, сульфатированный полисахарид с молекулярной массой 160 кДа, выделенный из бурой водоросли *Fucus evanesceus*. Модель алиментарной гиперлипидемии воспроизводили у мышей. Исследовали биохимические показатели липидного обмена, состояние системы ПОЛ-АОЗ и состояние печени методом магнитно-резонансной томографии.

Результаты. На фоне перорального приема фукоидана у животных наблюдалось снижение уровня общего холестерина и его фракций низкой плотности, восстановление сниженных показателей ПОЛ и увеличение показателей системы АОЗ крови, нормализация анатомо-топографических показателей печени.

Заключение. Способность фукоидана нормализовать ключевые показатели липидного обмена, показатели системы ПОЛ-АОЗ, оказывать гепатопротекторное действие позволяет рассматривать его в качестве основы при разработке новых биопрепаратов для лечения атеросклеротических нарушений.

Ключевые слова: фукоиданы, сульфатированные полисахариды, атеросклероз, липиды крови, антиоксиданты

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-82-87

FUCOIDAN FROM BROWN ALGAE *FUCUS EVANESCENS*: NEW PERSPECTIVES IN THE TREATMENT OF ATHEROSCLEROSIS

S.P. Krizhanovsky¹, T.A. Kuznetsova^{2,3}, B.I. Geltser³, T.S. Zaporozhets^{1,2},
S.P. Ermakova⁴, N.N. Besednova²

¹Medical Association of Far East Branch of Russian Academy of Science; 95 Kirova St., Vladivostok 690022, Russia;

²G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 1 Selskaya St., Vladivostok 690087, Russia;

³Far Eastern Federal University, School of Biomedicine; M25, Ayaks, Russian Island, OPS, Vladivostok 699922, Russia;

⁴G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry; 159 100-letia Vladivostoka Ave., Vladivostok 690022, Russia

Objective. The purpose of the research is the experimental study of the possibility of correction of disorders of lipid metabolism, lipid peroxidation and antioxidant protection (POL-AOP), liver structure on the model of alimentary hyperlipidemia in mice.

Materials and methods. Fucoidan, a sulfated polysaccharide with a molecular weight of 160 kDa, derived from brown algae *Fucus evanesceus*. The alimentary hyperlipidemia model was reproduced in mice. The biochemical parameters of lipid metabolism, state of POL-AOP system and the liver structure by MRT were studied.

Results. We revealed the ability of fucoidan at per os administration to animals to normalize the key parameters of lipid metabolism, indicators of POL-AOP system, liver anatomic-topographic structure.

Conclusion. The ability of fucoidan to correct these parameters allows us to consider it as a basis for the development of new biological medicines for the treatment of atherosclerotic disorders.

Key words: fucoidans, sulfated polysaccharides, atherosclerosis, blood lipids, antioxidants

Введение

Атеросклероз — хроническое системное заболевание, характеризующееся поражением крупных сосудов, образованием атеросклеротических бляшек, сужением просвета артерий и, как следствие, нарушением кровоснабжения органов и тканей. Согласно данным статистики атеросклероз — наиболее частая причина заболеваемости и общей смертности населения по всему миру. Одним из ключевых механизмов патогенеза атеросклероза является нарушение обмена липидов в организме, сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеинов в интиму сосудов. Общеизвестной считается теория воспалительного генеза атеросклероза, в соответствии с которой основным звеном его патогенеза выступает иммуноопосредованное повреждение артерий с аутоиммунным компонентом [1, 2].

Для медикаментозного лечения атеросклероза наиболее перспективными препаратами являются статины. Их действие заключается в угнетении функций печени по выработке холестерина. Особого внимания заслуживают положительные эффекты статинов, не связанные с гипوليцидемическим действием, определяющие во многом их антиатерогенную и антиишемическую активность. Кроме того, лечение предполагает назначение сосудорасширяющих препаратов, антиоксидантов, а также витаминотерапию.

Однако, несмотря на все положительные характеристики статинов, эти препараты относятся к дорогостоящим и при длительном применении способны вызывать ряд достаточно серьезных побочных эффектов. В связи с этим актуальной проблемой остается разработка новых лекарственных препаратов антидислипидемического и противовоспалительного действия. Перспективными в этом плане являются препараты на основе биологически активных веществ, в том числе сульфатированные полисахариды морских бурых водорослей. К их числу относятся фукоиданы, несущие огромный потенциал фармакологической активности, в том числе антидислипидемический, противовоспалительный и антиоксидантный, и характеризующиеся биосовместимостью и отсутствием токсичности [3–5]. Отдельные участки полисульфатированных цепей фукоиданов могут выступать в качестве миметиков природных лигандов рецепторов и благодаря этому взаимодействовать с различными факторами роста, цитокинами, хемокинами, протеазами и др., тем самым обеспечивая регуляцию функций разных систем макроорганизма [4].

Цель настоящей работы — экспериментальное обоснование возможности коррекции нарушений липидного обмена, системы перекисного окисления липидов (ПОЛ) и антиоксидантной защиты (АОЗ), анатомо-топографического состояния печени на мо-

дели алиментарной гиперлипидемии у мышей фукоиданом из бурой водоросли *Fucus evanescens*.

Материалы и методы

В работе использовали фукоидан, сульфатированный полисахарид, выделенный в ТИБОХ ДВО РАН из бурой водоросли *F. evanescens* Охотского моря. По химической структуре это 1,3;1,4- α -L-фукан с молекулярной массой 160 кДа, его моносахаридный состав представлен фукозой, галактозой, ксилозой соответственно 88,4; 6,0; 1,8 моль % [6].

Экспериментальные исследования проведены на 105 неинбредных белых мышах и 30 мышах (СВА \times С57Bl/6) F1 массой 18–20 г. Работа выполнена с соблюдением правил и международных рекомендаций Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Выведение животных из опыта осуществляли с использованием эфирного наркоза.

Животных рандомизировали на 3 группы: 1-я группа — животные с экспериментальной гиперлипидемией (атерогенный рацион); 2-я группа — мыши, получавшие *per os* фукоидан в дозе 50 мг/кг массы тела (5 мг на мышью) до и на фоне атерогенной диеты в течение 2 мес; 3-я группа — интактные мыши (контроль), которые находились на стандартном рационе вивария. Для воспроизведения модели алиментарной гиперхолестеринемии мыши получали атерогенную диету и эмульсию холестерина в растительном масле в течение 30 дней. Диета включала пшеничную кашу, сливочное масло (5 %), свиное сало (25 % от веса суточного рациона). Эмульсию холестерина вводили внутривентрикулярно через зонд ежедневно из расчета 0,4 г/кг массы тела животного.

Показатели липидного обмена оценивали с помощью автоматического анализатора ChemWell 2910 (Combi, США). В сыворотке крови определяли содержание общего холестерина (ОХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицеридов (ТГ) с использованием наборов фирмы Analyticon (Германия). Содержание холестерина в липопротеинах низкой (ХС ЛПНП) и очень низкой плотности (ХС ЛПОНП) рассчитывали по формуле Фридвальда (1972) при концентрации триглицеридов не выше 4,5 ммоль/л: $\text{ХС ЛПНП} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП} - \text{ХС ЛПОНП}$, ммоль/л; $\text{ХС ЛПОНП} = \text{ТГ}/2,2$, ммоль/л. Коэффициент атерогенности (КА) рассчитывали по формуле: $\text{КА} = (\text{ОХС} - \text{ХС ЛПВП}) / \text{ХС ЛПВП}$.

Состояние системы ПОЛ оценивали по содержанию в ткани печени животных продуктов перекисидации липидов — диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА), систему АОЗ характеризовали по уровню активности ферментов — глутатионпероксидазы (ГП), глутатионредуктазы (ГР), каталазы и супероксиддисмутазы (СОД). Исследования проводили

с использованием микропланшетного фотометра μ Quant (Bio-Tek, США) и биохимического анализатора Stat Fax 450 (Awareness Technology, США).

Анатомо-топографическое исследование печени проводили методом магнитно-резонансной томографии на базе ТИБОХ ДВО РАН с использованием томографа высокого разрешения PharmaScan 70/16 US@ фирмы Bruker (Германия) с напряженностью магнитного поля 7 Тл, частотой 300 МГц, программным обеспечением Para Vision 3.0.2, позволяющим получить прижизненную количественную и качественную оценку состояния органов у исследуемых животных. Для визуализации и идентификации патологических изменений использовали 2 основных режима: T1-ВИ и T2-ВИ, взвешенные послойные изображения печени в режиме RARE_8 FLFSH в аксиальной и корональной проекциях.

Цифровые данные подвергались статистической обработке с помощью пакета программы Statistica-7. Показатели представлены в виде $M \pm m$. Критическое значение уровня значимости принималось равным 5 % ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

При исследовании показателей липидного обмена у мышей 1-й группы с алиментарной гиперлипидемией выявлено нарушение липидного обмена. Так, в сыворотке уровни ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПОНП и ТГ статистически значимо превышали таковые показатели в контрольной, 3-й группе, что приводило к увеличению КА до $1,9 \pm 0,2$ ($p < 0,05$). На фоне перорального приема фукоидана во 2-й группе у животных наблюдалось статистически значимое снижение уровня ОХС, ХС ЛПНП, ХС ЛПОНП, ТГ и КА по сравнению с 1-й группой и повышение ЛПВП. При этом показатели ХС ЛПОНП и ТГ статистически значимо не отличались от показателей у животных 3-й, контрольной группы (табл. 1).

Результаты исследования системы ПОЛ-АОЗ у животных 1-й группы с алиментарной гиперлипидемией свидетельствуют о развитии окислительного стресса с нарушением физиологического баланса между интенсивностью свободнорадикального окисления липидов и функциональной активностью антиоксидантной системы, проявляющимся высокой активностью ПОЛ и сниженной активностью ферментов АОЗ. Содержание ДК в ткани печени животных возросло на 70,2 % ($p < 0,01$), уровень МДА – на 112 % ($p < 0,01$) по сравнению с таковыми показателями у мышей контрольной, 3-й группы. Под действием атерогенной диеты также отмечено статистически значимое снижение по сравнению с контролем показателей антиоксидантной защиты печени, о чем свидетельствует активность ферментов ГП, ГР, каталазы и СОД (табл. 2).

Под влиянием фукоидана у животных 2-й группы наблюдалось восстановление показателей ПОЛ: содержание ДК снижалось на 39,6 % ($p < 0,01$), МДА – на 48,3 % ($p < 0,01$), эти показатели значимо не отличались от таковых в группе контроля. Коррекция окислительного стресса фукоиданом сопровождалась увеличением уровня ГП на 28,5 % ($p < 0,05$) и ГР – на 59,7 % ($p < 0,01$), однако эти показатели не достигали величин, характерных для животных контрольной группы. Что касается каталазы и СОД, то их уровень восстанавливался под влиянием фукоидана до контрольных значений (см. табл. 2).

По данным МРТ у мышей 3-й (контрольной) группы не выявлено анатомо-топографических нарушений печени. Края обеих долей печени у всех животных просматривались четко (рис. а). У животных 1-й группы с экспериментальной гиперлипидемией выявлено увеличение обеих долей печени. Края долей были неровными и просматривались нечетко. Строма и паренхима печени деформированы, в них преобладали воспалительные изменения, что не позволяло

Таблица 1. Влияние фукоидана *F. evanescens* на показатели липидного обмена у мышей с экспериментальной гиперлипидемией

Показатели	Значения		
	1-я группа (атерогенная диета), <i>n</i> = 20	2-я группа (атерогенная диета на фоне фукоидана), <i>n</i> = 20	3-я группа (контроль – интактные), <i>n</i> = 20
ОХС, ммоль/л	$5,0 \pm 0,21^{**}$	$3,7 \pm 0,22^*$	$2,9 \pm 0,1$
ЛПНП, ммоль/л	$1,95 \pm 0,27^{**}$	$1,02 \pm 0,1^{**}$	$0,59 \pm 0,06$
ЛПОНП, ммоль/л	$0,58 \pm 0,03^*$	$0,39 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,02$
ЛПВП, ммоль/л	$1,6 \pm 0,12$	$2,20 \pm 0,24^*$	$1,69 \pm 0,1$
ТГ, ммоль/л	$1,26 \pm 0,06^*$	$0,85 \pm 0,24$	$0,83 \pm 0,06$
КА	$1,9 \pm 0,2^*$	$1,2 \pm 0,11$	$1,36 \pm 0,09$

*Значимость различий показателей 1-й группы по сравнению с 3-й группой, где: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. *Значимость различий показателей 2-й группы по сравнению с 1-й группой (слева), с 3-й группой (справа), где: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Таблица 2. Влияние фукоидана *F. evanescens* на систему ПОЛ-АОЗ в печени мышей с экспериментальной гиперлипидемией

Показатель	Значения		
	1-я группа (атерогенная диета), <i>n</i> = 15	2-я группа (атерогенная диета на фоне фукоидана), <i>n</i> = 15	3-я группа (контроль – интактные), <i>n</i> = 15
Содержание ДК, нмоль/мг белка	8,31 ± 0,23 ^{##}	**5,02 ± 0,2	4,88 ± 0,07
Содержание МДА, нмоль/мг белка, мкмоль/л	4,22 ± 0,2 ^{##}	**2,04 ± 0,2	1,99 ± 0,08
Активность ГП, нмоль/л / (мин × мг белка) мкмоль*мин/мл	0,85 ± 0,02 ^{##}	*1,09 ± 0,01*	1,18 ± 0,01
Активность ГР, нмоль НАДФН / (мин × мг белка)	0,65 ± 0,04 ^{##}	**1,03 ± 0,02*	1,68 ± 0,11
Каталаза, ммоль/ мг белка мин, моль/ (мин × л)	8,4 ± 1,3 [#]	*16,6 ± 1,2	16,2 ± 1,8
СОД, у. е. / мг белка % торможения	0,43 ± 0,26 [#]	*0,71 ± 0,03	0,75 ± 0,16

[#]Значимость различий показателей 1-й группы по сравнению с 3-й группой, где: ^{##}*p* < 0,01; [#]*p* < 0,05. *Значимость различий показателей 2-й группы по сравнению с 1-й группой (слева), с 3-й группой (справа), где: ***p* < 0,01; **p* < 0,05.

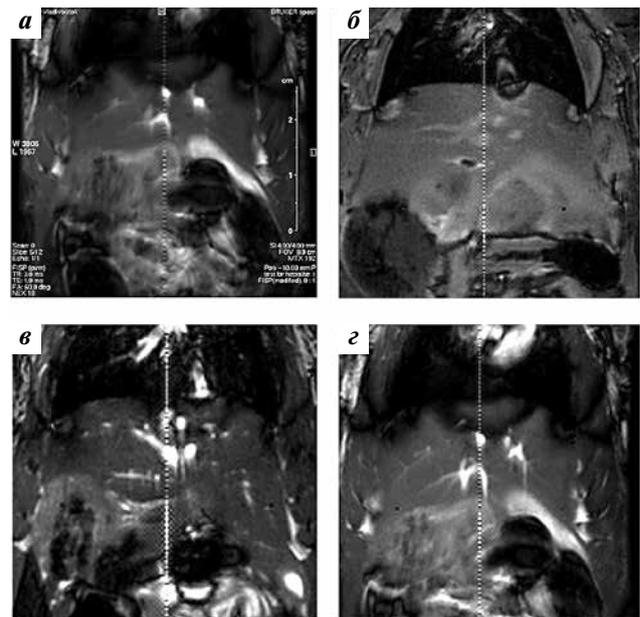
четко выделить структурно-функциональную единицу печени – печеночную дольку (рис. б). О воспалительных изменениях в паренхиме печени свидетельствует гипоинтенсивность при T1-ВИ (149 относительных единиц (отн. ед.)) по сравнению с интактным контролем – 225 отн. ед. (рис. а), и гиперинтенсивность сигнала от паренхимы при T2-ВИ составляет 105 отн. ед. по сравнению с 52 отн. ед. в интактном контроле (рис. б).

На фоне применения фукоидана у животных 2-й группы отмечена тенденция к нормализации линейных размеров печени (рис. в, г). На рис. (а–г) показана нормализация интенсивности сигнала от паренхимы печени при T1-ВИ и T2-ВИ, при этом лечебный эффект фукоидана составил 26 %. У животных этой группы структура печени частично восстановлена. Большая часть гепатоцитов формировала нормальные печеночные дольки. Печеночная долька, основная структурно-функциональная единица печени, мало отличалась по форме и размерам от таковой у интактных мышей, на изображении просматривается четко. Паренхима и строма печени не деформированы, желчные протоки не изменены (рис. в, г).

Таким образом, на модели алиментарной гиперлипидемии нами выявлена способность фукоидана при пероральном применении корректировать основные показатели липидного обмена, оказывать стабилизирующее действие на состояние окислительного метаболизма и активность ферментов антиоксидантной защиты, а также нормализующее влияние на анатомо-топографическую структуру печени.

Способность сульфатированных полисахаридов снижать интенсивность гиперлипидемии показана в ряде работ [7, 8]. Учитывая полученные нами сведения и данные литературы по механизмам гипопо-

пидемического действия фукоиданов, можно предполагать их способность ингибировать аккумуляцию липидов путем стимуляции липолиза в клетках жировой ткани адипоцитах, ингибировать адипогенез и дифференцировку адипоцитов, либо стимулировать внутриклеточный транспорт липопротеинлипазы и уменьшать деградацию этого фермента в адипоцитах [8, 9]. Возможно, имеет место способность фукоиданов связывать холестерин и желчные кислоты, участвующие в транспорте жиров из кишечника в кровь [7, 8]. Следует отметить снижение уровня ТГ



Томограммы печени мышей (СВА × С57В1/6) F₁; а – 3-я группа (контрольная); б – 1-я группа (атерогенная диета); в, г – 2-я группа (атерогенная диета на фоне фукоидана)

под влиянием фукоидана, поскольку, как известно, при жировой инфильтрации печени макровезикулярного типа ТГ обычно выступают в качестве аккумулируемых липидов. Можно предположить, что этот эффект фукоидана реализуется путем влияния на активность фермента триглицеридсинтетазы, участвующего в синтезе ТГ.

Установлено, что при атеросклерозе на фоне дислипидемии наблюдается снижение активности естественных антиоксидантных ферментов, дефицит эндогенных антиоксидантов, при котором содержащиеся в крови атерогенные липиды служат легким субстратом для перекисного окисления [10]. В связи с этим в комплексе его лечения показано применение антиоксидантных препаратов. Антиоксидантное действие сульфатированных полисахаридов описано в работах [11–14].

С учетом представленных и полученных нами ранее результатов фукоидан из бурой водоросли *F. evanescens*, как и статины, не только обладает липидкорректирующим действием, но и оказывает плейотропные эффекты, непосредственно связанные с печенью, играющей центральную роль в метаболических процессах организма. В частности, этот полисахарид уменьшает интенсивность воспалительного процесса [15], повышает антиоксидантный потенциал крови [13, 16], оказывает гепатопротекторное [17], гипогликемическое [16], детоксикационное [18], противовоспалительное [19] действие и другие эффекты.

К сожалению, пока не разработаны лекарственные препараты на основе этих соединений в связи с трудностями, связанными с получением стандартных образцов полисахарида. Однако за рубежом для коррекции липидного обмена активно используют экстракты водорослей, содержащие комплекс биологически активных добавок, а также фукоиданы с определенной структурой. Такие экстракты и полисахариды в настоящее время позиционируются в качестве основы для создания биологически активных добавок к пище, продуктов функционального питания, а в дальнейшем — лекарственных препаратов нового поколения для нормализации липидного профиля крови, предотвращения развития ожирения,

улучшения состояния сердечно-сосудистой системы, а также в качестве антигипертензивных, противовоспалительных, гепатопротекторных, иммуномодулирующих средств, антиоксидантов, антикоагулянтов и спазмолитиков.

К настоящему времени фукоидан из водоросли *F. evanescens* стандартизован, получен в достаточном количестве для производства биологически активных добавок, научных исследований и предклинических испытаний. Следует отметить, что бурая водоросль *F. evanescens* имеет широкий ареал распространения на Дальнем Востоке России и содержит наибольшее количество фукоидана при практически полном отсутствии ламинарана, что значительно упрощает процедуру его выделения и стандартизации. Полисахарид обладает низкой токсичностью, хорошей растворимостью в воде и кислых растворах. В экспериментальных и клинических условиях проведено изучение его противовирусной, антикоагулянтной, тромболитической, гепатопротекторной, иммуномодулирующей, антиоксидантной, противоопухолевой активности [13, 16–20]. Представляет интерес дальнейшее исследование этого полисахарида.

Заключение

На модели алиментарной дислипидемии у мышей выявлена способность фукоидана из бурой водоросли *F. evanescens* при пероральном применении нормализовать основные показатели липидного обмена, показатели системы ПОЛ-АОЗ, анатомо-топографическую структуру печени.

Выявленные в экспериментах эффекты фукоидана позволяют рассматривать этот полисахарид в качестве основы при разработке новых биопрепаратов для лечения атеросклеротических нарушений и рекомендовать его к дальнейшему изучению в экспериментальных и клинических условиях.

Работа выполнена в рамках проекта 15-1-5-011 – Сульфатированные полисахариды бурых водорослей как основа для создания мишень-ориентированных лекарственных средств терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Бобрышев Ю.В. Клеточные механизмы атеросклероза: врожденный иммунитет и воспаление. *Фундаментальные науки и практика* 2010;1(4):54–9.
2. Anogeanaki A., Angelucci D., Cianchetti E. et al. Atherosclerosis: a classic inflammatory disease. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2011;24(4):817–25. PMID: 22230389.
3. Fitton J.H., Stringer D.N., Karpiniec S.S. Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs* 2015;13:5920–46. DOI: 10.3390/md13095920. PMID: 26389927.
4. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H.S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs* 2011;9:196–223. DOI: 10.3390/md9020196. PMID: 21566795.
5. Raposo M.F.J., Morais A.M.M.B., Morais R.M.S.C. Marine

- polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Mar Drugs* 2015;13(5):2967–3028. DOI: 10.3390/md13052967. PMID: 25988519.
6. Anastyuk S.D., Shevchenko N.M., Dmitrenok P.S., Zvyagintseva T.N. Structural similarities of fucoidans from brown algae *Silvetia babingtonii* and *Fucus evanescens*, determined by tandem MALDI-TOF mass spectrometry. *Carbohydr Res* 2012;358:78–81. DOI: 10.1016/j.carres.2012.06.015. PMID: 22824505.
 7. Li D.Y., Xu Z., Huang L.M. et al. Effect of fucoidan of *L. japonica* on rats with hyperlipidemia. *Food Sci* 2001;22:92–5.
 8. Park M.K., Jung U., Roh C. Fucoidan from marine brown algae inhibits lipid accumulation. *Mar Drugs* 2011;9:1359–67. DOI: 10.3390/md9081359. PMID: 21892350.
 9. Kim K.J., Lee O.H., Lee B.Y. Fucoidan, a sulfated polysaccharide, inhibits adipogenesis through the mitogen-activated protein kinase pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Life Sci* 2010;22:791–7. DOI: 10.1016/j.lfs. PMID: 20346961.
 10. Chen A.F., Chen D.D., Daiber A. et al. Free radical biology of the cardiovascular system. *Clinic Sci* 2012;123(2):73–91. DOI: 10.1042/CS20110562. PMID: 22455351.
 11. Hu T., Liu D., Chen Y. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. *Int J Biol Macromolecules* 2010;46(2):193–8. DOI: 10.1016/j.ijbiomac. PMID: 20025899.
 12. Hwang P., Wu C.H., Gau S.Y. et al. Antioxidant and immune-stimulating activities of hot-water extract from seaweed *Sargassum hemiphyllum*. *J Marine Sci Technology* 2010;18(1):41–6.
 13. Imbs T.I., Skriptsova A.V., Zvyagintseva T.N. Antioxidant activity of fucoise-containing sulfated polysaccharides obtained from *Fucus evanescens* by different extraction methods. *J Appl Phycol* 2015;27(1):545–53. DOI: 10.1007/s10811-014-0293-7.
 14. Kim S., Choi D.S., Jeon T.J. et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharides isolated from *Sargassum fulvellum*. *JFSN* 2007;12(2):65–73. DOI: 10.3746/jfn.2007.12.2.065.
 15. Беседнова Н.Н., Запорожец Т.С., Макаренкова И.Д. и др. Противовоспалительные эффекты сульфатированных полисахаридов из морских бурых водорослей. *Успехи современной биологии* 2012;132(3):312–20.
 16. Майстровский К.В., Запорожец Т.С., Федянина Л.Н. и др. Влияние иммуномодулятора фукоидана из бурых водорослей *Fucus evanescens* на показатели антиоксидантной системы, липидного и углеводного обмена у мышей. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2009;3:103–5.
 17. Кузнецова Т.А., Агафонова И.Г., Крохмаль Т.С. и др. Гепатопротекторные свойства фукоидана из бурой водоросли *Fucus evanescens*. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2010;4:26–9.
 18. Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Somova L.M., Plekhova N.G. Fucoidan extracted from *Fucus evanescens* prevents endotoxin-induced damage in a mouse model of endotoxemia. *Mar Drugs* 2014;12:886–98. DOI: 10.3390/md12020886/ PMID: 24492521.
 19. Алексеевко Т.В., Жанаева С.Я., Венедиктова А.А. и др. Противоопухолевая и антиметастатическая активность сульфатированного полисахарида фукоидана, выделенного из бурой водоросли Охотского моря *Fucus evanescens*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2007;143(6):675–7.
 20. Menshova R.V., Shevchenko N.M., Imbs T.I. Fucoidans from brown alga *Fucus evanescens*: structure and biological activity. *Fron Mar Sci* 2016;3:1–9. DOI: 10.3389/fmars.2016.00129.



ФОТОДИТАЗИН® [fotoditazin]

фотосенсибилизатор хлоринового ряда

«ФОТОДИТАЗИН®» гель - РУ № ФСР 2012/130043 от 03.02.2012 г.

«ФОТОДИТАЗИН®» концентрат для приготовления раствора для инфузий - РУ № ЛС 001246 от 18.05.2012 г.



«ФОТОДИТАЗИН®» применяется для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний различных нозологических форм, а так же патологий не онкологического характера в следующих областях медицины:

- ▶ дерматология
- ▶ гинекология
- ▶ урология
- ▶ торакальная хирургия
- ▶ стоматология
- ▶ нейрохирургия
- ▶ офтальмология,
- ▶ травматология и ортопедия
- ▶ комбустиология
- ▶ гнойная хирургия
- ▶ ангиология

В соответствии с приказами МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ:

Приказ № 1629н от 29 декабря 2012 г.

«Об утверждении перечня видов высокотехнологичной медицинской помощи»

Приказ № 915н от 15 ноября 2012 г. «Об утверждении порядка оказания медицинской помощи взрослому населению по профилю «онкология»

ООО «ВЕТА-ГРАНД» €

123056, Россия, г.Москва, ул. Красина, д.27, стр.2

тел.: +7(499)253-61-81, +7(499)250-40-00

e-mail: fotoditazin@mail.ru

 www.fotoditazin.com
www.фотодитазин.рф