



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

4

**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.
С 2016 года журнал зарегистрирован в CrossRef, статьи индексируются с помощью цифрового идентификатора DOI.

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Научно-исследовательский институт 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 мед. 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); **И.В. Уласов**, д-р биол. наук (Сиэтл, США); **Р.И. Якубовская**, д-р биол. наук, проф. (Москва, Россия)

ОСНОВАН В 2002 Г.

4^{ТОМ 16}
'17

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

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «НМИЦ онкологии
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

Редакторы Н.В. Жукова, А.В. Лукина
Корректор М.А. Андросова
Дизайн Е.В. Степанова
Верстка Е.А. Прокофьева

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

ISSN 1726-9784
Российский биотерапевтический
журнал. 2017. Том 16. № 4. 1–88
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» — 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»
Тираж 1000 экз.
<http://www.ronc.ru/node/1877>
bioterapy_rbj@ronc.ru

Мероприятия в 2018 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения
Российской Федерации,

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,

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

29—30
марта
2018 г.
Москва

XV ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ИМЕНИ А.Ю. БАРЫШНИКОВА «НОВЫЕ ОТЕЧЕСТВЕННЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ И МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ: ПРОБЛЕМЫ, ДОСТИЖЕНИЯ, ПЕРСПЕКТИВЫ»

Место проведения: г. Москва

- регистрационную форму высылать на электронную почту:
conference-edito@mail.ru
- тезисы докладов – на biotherapy_rbj@mail.ru!
- срок подачи заявки для участия с докладом – 25 января 2018 г.
- срок подачи тезисов (для публикации) – 25 января 2018 г.
- регистрация участников – до 1 марта 2018 г.
- по всем вопросам, связанным с участием в конференции,
обращаться к секретарю Оргкомитета
Решетниковой Вере Владимировне
по тел. +7 (499) 324 55 85, +7 (926) 505 72 55
или по электронной почте conference-edito@mail.ru

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

Оргкомитет оставляет за собой
право отбора докладов.

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). In 2016, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

FOUNDERS

Federal State Budgetary Scientific Institution "N.N. Blokhin National Medical Research Oncology 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 Director for Research Work of N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors (Moscow, Russia)

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.Yu. Kubasova**, PhD (Moscow, Russia); **I.G. Meerovich**, PhD (Omaha, Nebraska, USA); **A.V. Misyurin**, PhD (Moscow, Russia); **V.V. Novikov**, PhD, DSc, Professor (Nizhny Novgorod, Russia); **I.R. Nabiev**, PhD, DSc, Professor (Reims, France); **N.A. Oborotova**, PhD, DSc, Professor (Moscow); **N.Ya. Rapoport**, PhD, DSc, Professor (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); **I.V. Ulasov**, PhD (Seattle, USA); **R.I. Yakubovskaya**, PhD, DSc, Professor (Moscow, Russia)

FOUNDED IN 2002

4^{VOL. 16}
'17

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

FSBI "N.N. Blokhin National Medical Research Oncology 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
biotherapy_rbj@ronc.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

Editors N.V. Zhukova, A.V. Lukina
Proofreader M.A. Androsova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up E.A. Prokofieva

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

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

ISSN 1726-9784

Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal. 2017. Volume 16. No 4. 1–88

© PH "ABV-Press", 2017

Rospechat' catalogue index: 81679

Printed at the Mediacolor LLC
1,000 copies

<http://www.ronc.ru/node/1877>
biotherapy_rbj@ronc.ru

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Н.А. Лыжко

Молекулярно-генетические механизмы инициации, промоции и прогрессии опухолей 7

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова, А.В. Попа, М.А. Шервашидзе, И.Н. Серебрякова, Н.Н. Тупицын

Подходы к оценке минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах в условиях таргетной терапии 18

Ф.М. Кипкеева, Т.А. Музаффарова, М.Н. Нариманов, О.А. Малехова, Т.А. Богуш, А.В. Карпунин

Профили экспрессии потенциальных генов-мишеней при диссеминированном раке желудка 25

Т.А. Богуш, А.А. Арефьева, С.А. Калужный, Е.А. Богуш,

С.А. Тюляндин, Б.Е. Полоцкий, М.М. Давыдов

Количественная оценка коэкспрессии цитокератинов и маркера мезенхимальных клеток виментина в ткани серозного рака яичников. 29

Т.А. Богуш, А.А. Башарина, Е.А. Богуш, А.С. Тюляндина, С.А. Тюляндин, М.М. Давыдов

Коэкспрессия эстрогеновых рецепторов альфа и бета в ткани серозного рака яичников 34

Д.А. Рябчиков, И.К. Воротников, Т.П. Казубская, С.С. Лукина,

Е.А. Филиппова, А.М. Бурденный, В.И. Логинов

Клиническая оценка профиля метилирования промоторных областей 8 генов хромосомы 3 и гена *MGMT* при люминальном типе рака молочной железы. 38

Г.Н. Апрышко, О.С. Жукова, Л.В. Фетисова, Н.К. Власенкова, Р.Б. Пугачева, О.В. Горюнова

Изучение свойств потенциальных противоопухолевых аминокислотных производных гликозидов индолокарбазолов *in silico* и *in vitro* 46

Н.С. Сапрыкина, Л.М. Борисова, М.П. Киселева, В.П. Краснов,

Г.Л. Левит, В.В. Мусияк, М.А. Барышникова, В.М. Бухман, З.С. Шпрах

Противоопухолевая активность ормустина на перевиваемых солидных опухолях мышей. Часть I 55

Э.Р. Переверзева, В.А. Голибродо, М.И. Трещалин, Н.В. Еремкин, С.А. Цуркан, И.Д. Трещалин

Экспериментальная оценка токсических свойств таргетного препарата аймпила. 61

З.С. Шпрах, Е.В. Игнатьева, И.В. Ярцева, С.А. Сасов, О.Л. Орлова,

А.П. Полозкова, Д.А. Хоченков, А.М. Королев, Н.М. Малютина

Стандартизация лиофилизированной лекарственной формы димерного макроциклического танина 67

Г.А. Меерович, Л.М. Борисова, А.П. Будько, М.П. Киселева, Л.Л. Николаева,

И.Г. Меерович, А.В. Ланцова, С.В. Чернова, Н.А. Оборотова

Исследование уровня и селективности накопления липосомальной формы фотосенсибилизатора тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия на опухолевых моделях мышей при разных способах перевивки 74

Э.Р. Переверзева, М.И. Трещалин, Н.В. Еремкин, А.Е. Щекотихин, И.Д. Трещалин

Токсикологическая характеристика нового противоопухолевого мультитаргетного препарата антрафуран 80

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

И.С. Голубева, Н.П. Яворская, О.В. Горюнова

Изучение *in vivo* потенциальных противоопухолевых свойств аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола. 85

REVIEWS

N.A. Lyzhko

Molecular-genetic mechanisms of initiation, promotion and progression of tumors 7

ORIGINAL REPORTS

O.A. Beznos, L.Yu. Grivtsova, A.V. Popa, M.A. Shervashidze, I.N. Serebryakova, N.N. Tupitsyn

Approaches to the assessment of minimal residual disease in B-cell acute lymphoblastic leukemias in conditions of target therapy 18

F.M. Kipkeeva, T.A. Muzaffarova, M.N. Narimanov, O.A. Malekhova, T.A. Bogush, A.V. Karpukhin

Expression profiles of potential target genes in disseminated gastric cancer. 25

T.A. Bogush, A.A. Arefieva, S.A. Kaliuzhny, E.A. Bogush,

S.A. Tjulandin, B.E. Polotsky, M.M. Davydov

Quantitative assesment of coexpression of cytokeratins and mesenchimal cells marker vimentin in serous ovarian cancer 29

T.A. Bogush, A.A. Basharina, E.A. Bogush, A.S. Tyulyandina, S.A. Tyulyandin, M.M. Davydov

Coexpression of estrogen receptors alpha and beta in serous ovarian cancer 34

D.A. Ryabchikov, I.K. Vorotnikov, T.P. Kazubskaya, S.S. Lukina,

E.A. Filippova, A.M. Burdenny, V.I. Loginov

Clinical assesment of the 8 genes on chromosome 3 with also *MGMT* gene promoter regions methylaton status in patients with breast cancer luminal hystotype 38

G.N. Apryshko, O.S. Zhukova, L.V. Fetisova, N.K. Vlasenkova, R.B. Pugacheva, O.V. Goryunova

***In silico* and *in vitro* research of potential antineoplastic amino acid derivatives of indolocarbazol glycosides properties. 46**

N.S. Saprykina, L.M. Borisova, M.P. Kiseleva, V.P. Krasnov, G.L. Levit, V.V. Musiyak,

M.A. Baryshnikova, V.M. Bukhman, Z.S. Shprakh

Antitumor activity of ormustine against transplantable solid murine tumors. Part I 55

E.R. Pereverzeva, V.A. Golibrodo, M.I. Treshchalin, N.V. Eremkin, S.A. Tsurkan, I.D. Treshchalin

Experimental evaluation of toxic properties of target antitumor drug aimpila 61

Z.S. Shprakh, E.V. Ignat'eva, I.V. Yartseva, S.A. Sasov, O.V. Orlova,

A.P. Polozkova, D.A. Hochenkov, A.M. Korolev, N.M. Malyutina

Standardization of lyophilized dosage form of dimeric macrocyclic tannin 67

G.A. Meerovich, L.M. Borisova, A.P. Bud'ko, M.P. Kiseleva, L.L. Nikolaeva,

I.G. Meerovich, A.V. Lantsova, S.V. Chernova, N.A. Oborotova

Study of level and selectivity of liposomal form of photosensitiser hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine accumulation on transplantable mice tumor models at different ways of transplantation 74

E.R. Pereverzeva, M.I. Treschalin, N.V. Eremkin, A.E. Shchekotikhin, I.D. Treschalin

Toxicological characteristic of novel antitumour multitargeted agent anthrafuran 80

BRIEF REPORT

I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, O.V. Goryunova

Research *in vivo* the qualities of potential antitumor amino-acid derivatives of glycosides of indolocarbazol 85

К 70-летию со дня рождения Михаила Ивановича Давыдова

11 октября 2017 года исполнилось 70 лет выдающемуся хирургу, академику РАН, заслуженному деятелю науки РФ, директору ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России Михаилу Ивановичу Давыдову.

М.И. Давыдов – блистательный хирург-онколог с мировым именем, известный ученый, профессор, главный внештатный онколог Минздрава России, главный онколог медицинского центра Управления делами Президента РФ, заведующий кафедрой онкологии Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, член Европейского и Американского общества хирургов, Международного общества хирургов и Нью-Йоркской академии наук.

Михаил Иванович родился 11 октября 1947 г. в г. Конотопе Сумской области Украинской ССР, закончил Киевское Суворовское училище, затем был призван в воздушно-десантные войска. После окончания срочной службы поступил в I Московский медицинский институт им. И.М. Сеченова. Рано проснувшийся интерес к хирургии привел Михаила Ивановича на кафедру оперативной хирургии. Вся профессиональная жизнь академика М.И. Давыдова связана с Онкологическим центром им. Н.Н. Блохина. Здесь он прошел путь от ординатора до директора центра. Под руководством М.И. Давыдова Онкологический центр получил мировое признание, в его стенах проведены тысячи уникальных операций, которые и по сей день не выполняются нигде в мире. Большая часть таких операций разработана М.И. Давыдовым.



Михаил Иванович является признанным лидером не только отечественной, но и мировой онкохирургии, он входит в пятерку лучших хирургов мира, является идеологом и разработчиком многих уникальных методов оперативного лечения опухолей легкого, пищевода, желудка, средостения, автором принципиально новых методик хирургии, отличающихся оригинальностью технического выполнения, безопасностью и высокой физиологичностью. М.И. Давыдов – создатель школы торакоабдоминальной хирургии, которая и по сей день является основой для развития хирургических и комбинированных методов лечения злокачественных опухолей грудной и брюшной полостей. Под руководством М.И. Давыдова защищено 57 докторских и 50 кандидатских диссертаций. Он автор и соавтор более 900 научных работ, включая 34 монографии и 9 научно-методических фильмов, 20 изобретений и рационализаторский предложений.

Михаил Иванович – вдохновитель приоритетных направлений фундаменталь-

ных медицинских исследований в онкологии, инициатор и организатор широкой образовательной программы послеузовского образования. Академик М.И. Давыдов – действующий Президент Ассоциации онкологов России, деятельность которой направлена на улучшение методов и качества профилактики, диагностики и лечения онкозаболеваний в РФ и под эгидой которой происходят крупнейшие научные и организационные события в онкологии.

Велики заслуги Михаила Ивановича и в детской онкологии. Он не раз спасал жизни совсем маленьких пациентов НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина».

Многолетняя плодотворная научная, клиническая, организационная работа М.И. Давыдова, его огромный вклад в российскую медицинскую науку отмечены многочисленными высокими наградами. Выдающийся врач, первоклассный клиницист, высококвалифицированный хирург-онколог, новатор, широко образованный ученый и требовательный принципиальный организатор, Михаил Иванович пользуется непререкаемым авторитетом в медицинских кругах России и среди мировых экспертов онкологии. Его многолетний самоотверженный труд на благо онкологических больных, умение увлечь единомышленников личным примером беззаветного служения людям и отечественной медицинской науке, постоянная готовность оказать помощь снижали Михаилу Ивановичу профессиональный авторитет, огромное уважение коллег, сотрудников и учеников, безграничную любовь и благодарность пациентов.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИНИЦИАЦИИ, ПРОМОЦИИ И ПРОГРЕССИИ ОПУХОЛЕЙ

Н.А. Лыжко

ФГБУ «НМИЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Наталья Александровна Лыжко natalapsh@yandex.ru

Канцерогенез — процесс превращения нормальной клетки в опухолевую под влиянием мутаций, которые в ней накапливаются. Причиной возникновения опухолевых клеток является накопление ею мутации, которое происходит в результате возникновения генетической нестабильности. Процесс развития опухоли разделяют на 3 основных этапа: инициацию, промоцию и прогрессию. На этапе инициации клетка получает первый мутационный удар, который приводит к нарушению ее генетической стабильности. Чаще всего мутациям подвергаются протоонкогены, гены-супрессоры опухолевого роста, а также гены, регулирующие процесс репарации ДНК. На данном этапе происходит накопление в клетке генетических поломок, которые ведут к повышению степени ее злокачественности. На этапе промоции уже трансформированные в результате мутации клетки приобретают ряд свойств, помогающих им выжить в окружающей среде. Они перестают реагировать на сигналы, поступающие из окружающей среды, приобретают ауто- и паракринную стимуляцию сигналов пролиферации, происходят торможение процесса апоптоза, генетическая нестабильность, изменение морфологии клетки и наблюдается отсутствие репликативного старения. Клетки опухолевого клона постоянно мутируют под давлением отбора со стороны иммунной системы организма. Это ведет к качественным изменениям фенотипа опухолевых клеток, возникновению вместо одного множества опухолевых клонов. Данный этап называется опухолевой прогрессией. В результате увеличения массы опухоли ей требуется все большее количество питательных веществ. Происходит стимуляция ангиогенеза. Из-за снижения степени родства клетки к субстрату и увеличения ее подвижности возникают вторичные очаги, метастазы. Развитие опухолевого процесса захватывает все новые участки в организме. Несмотря на постоянное совершенствование методов терапии опухолей, число пациентов, которые достигают длительной ремиссии, невелико. Поэтому исследователи ищут пути для более полного и глубокого изучения патогенеза опухолей, поскольку это будет способствовать разработке эффективных подходов к терапии. В данной статье кратко описываются основные стадии развития опухоли.

Ключевые слова: экспрессия, протоонкоген, ген-супрессор, мутация, канцерогенез

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-7-17

MOLECULAR-GENETIC MECHANISMS OF INITIATION, PROMOTION AND PROGRESSION OF TUMORS

N.A. Lyzhko

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Carcinogenesis — the process of turning a normal cell into a tumor cell under the influence of the mutations that accumulate in the cell. The cause of tumor cells is the accumulation of her mutation. The accumulation of cell mutations occurs as a result of the occurrence of genetic instability. The process of tumor development is divided into 3 main stages: initiation, promotion and progression. At the stage of initiation of cell receives the first mutational hit, which leads to disruption of its genetic stability. Most often, mutations are subjected to proto-oncogenes, genes-tumor suppressors, and genes governing DNA repair processes. At this stage there is an accumulation in the cell genetic damage that lead to an increase of the degree of malignancy. The next step in the transformation of cells in a tumor is promoted. This period has transformed as a result of mutations cells acquire a number of properties that help it to survive in the environment. They no longer respond to signals from the environment, acquire, auto- and paracrine stimulation signals of proliferation, the inhibition of apoptosis, genetic instability, changes in the morphology of the cells, the lack of replicative aging. Cells of tumour clone is constantly mutating under the pressure of selection by the immune system of the body. This leads to qualitative changes of the phenotype of tumor cells, the emergence is one of many tumor clones. This stage is called "tumor progression". As a result of increasing tumor mass requires greater amount of nutrients. The stimulation of angiogenesis. By reducing the degree of affinity of the cells to the substrate and increase its mobility, there are secondary foci, metastases. The development of tumor process captures new areas in the body in Spite of the constant improvement of methods of therapy of tumors, the number of patients who achieve long-term remission is not great. So researchers are looking for ways for more complete and in-depth study of the pathogenesis of tumors, since this will facilitate the development of more effective approaches to therapy of tumors. This article briefly describes the main stages of tumor development.

Key words: expression, proto-oncogene, gene-suppressor, mutation, carcinogenesis

Введение

В настоящее время в условиях урбанизации жизни человека возникает все больше угроз для его здоровья. Смертность населения в России от рака занимает 2-е место после сердечно-сосудистых заболеваний. Причин, которые способствуют возникновению опухоли, множество. К ним относятся как факторы внешней среды (ультрафиолетовое облучение, ионизирующая радиация, действие канцерогенных веществ, вирусы и т.д.), так и состояние здоровья самого человека (возникновение гормонального дисбаланса, присутствие очагов хронического воспаления, наличие вредных привычек и т.д.). Однако иницилирующим фактором, который запускает процесс клеточной трансформации, является возникновение в клетке генетической нестабильности. Ее следствие — появление мутаций, которые закрепляются в новых клеточных генерациях. Это приводит к дальнейшему развитию опухоли и приобретению ею все более злокачественного фенотипа. Кроме того, со стороны иммунной системы происходит отбор клонов, наиболее приспособленных к выживанию в окружающей их среде. Активная пролиферация этих клеток ведет к дальнейшему накоплению мутации и в конечном итоге к полной клеточной трансформации. Опухоль из моноклональной превращается в поликлональную, клетки изменяют свою морфологию, становятся атипичными. Далее следуют захват опухолью все новых территорий, возникновение метастаз и стимуляция ангиогенеза. Таким образом, происходит генерализация процесса, когда опухоль захватывает весь организм человека. Получение исследователями все новых данных о поведении опухолевых клеток в организме человека, изучение их свойств способствуют разработке новых методологических подходов к терапии опухолей. Это может привести к разработке новых препаратов и, следовательно, к улучшению качества жизни онкологических больных.

Инициации опухоли

Канцерогенез — многоступенчатый процесс накопления мутаций и других генетических изменений, приводящих к нарушениям регуляции клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки, движения и морфогенетических реакций клетки, а также контроля целостности генома. Все это, в свою очередь, обеспечивает приобретение клеткой и ее потомками ряда свойств, таких как самодостаточность в пролиферативных сигналах, повышение миграционной способности, нечувствительность к рости́нгирующим воздействиям, отсутствие репликативного старения, увеличение жизнеспособности при неблагоприятных условиях окружающей среды или внутриклеточных повреждениях, генетическая

нестабильность и др., которые детерминируют неопластическую трансформацию и дальнейшую опухолевую прогрессию. Ключевую роль в возникновении указанных свойств неопластической клетки играют нарушения функции протоонкогенов и опухолевых супрессоров [1].

К генетическим детерминантам клетки, вовлеченным в канцерогенез, можно отнести:

- протоонкогены — нормальные клеточные гены, участвующие в ключевых процессах жизнедеятельности клетки (регуляции транскрипции, роста, клеточного цикла, передачи сигнала и т.д.). В случае структурных изменений или повышения уровня экспрессии этих генов нарушается контроль нормального клеточного роста и дифференцировки, что приводит к трансформации клетки. Такие активированные протоонкогены называют онкогенами;
- гены-супрессоры (антионкогены) — гены, кодирующие ключевые регуляторные белки, потеря которых влечет за собой нарушение контроля пролиферации;
- гены-модуляторы — гены, способствующие распространению опухоли в организме, но не отвечающие за злокачественную трансформацию клетки непосредственно.

Протоонкогены. Известны 3 основных механизма активации протоонкогенов, которые обнаруживаются в опухолях человека.

1. Мутации в первичной структуре протоонкогена. В результате мутации в структуре гена изменяется кодирующий белок, что отражается на его свойствах. Активирующие мутации в протоонкогенах семейства *RAS* обнаруживаются в широком спектре опухолей человека. Специфические изменения в структуре *HARAS* зарегистрированы при остром лимфобластном лейкозе. Мутации *NRAS* обнаружены при Т-клеточной лимфопротиперации, хроническом миелолейкозе и остром миелобластном лейкозе.
2. Амплификация (увеличение числа копии гена в ДНК клетки). В большинстве случаев в опухолях человека в амплифицированном состоянии встречаются онкогены семейства *MYC*. В гематогенных опухолях чаще всего наблюдаются амплификация и связанное с ней повышение активности онкогена *MYB*. Белковый продукт гена *MYB* (*p57 MYB*) может взаимодействовать с двуспиральной ДНК клетки и является регулятором транскрипции ряда генов, в частности протоонкогенов [2]. Высокий уровень экспрессии протоонкогена *MYB* проявляется в незрелых

кроветворных клетках. Активность этого гена необходима для нормального гемопоэза. В дифференцированных клетках экспрессия гена *MYB* связана с пролиферацией. Умножение числа копии онкогена *MYB* зарегистрировано при остром миелобластном лейкозе, хроническом миелолейкозе, остром лимфобластном лейкозе и Т-клеточных лейкозах [3–5].

3. Перестройка ДНК клетки, затрагивающая структуру протоонкогена. Превращение протоонкогена в активированный онкоген может быть следствием структурных перестроек клеточного генома. Обмен генетическим материалом осуществляется между как гомологичными, так и негомологичными хромосомами. Как правило, этот процесс представляет собой сбалансированный реципрокный механизм (взаимный равноценный обмен фрагментами генома), но возможна и потеря ДНК в одной или обеих точках рекомбинации. В результате подобных событий структура генов (в частности, протоонкогенов), локализованных в зоне реаранжировки генома, может претерпевать драматические изменения (утрату части генетической информации, образование химерных генов, кодирующих гибридные белки, попадание в зону регуляторных элементов других генов с последующим нарушением нормальной регуляции экспрессии). Практически все упомянутые механизмы качественного изменения онкогенов в результате перестройки клеточной ДНК описаны при опухолях человека. Ярким примером специфической генной транслокации является лимфома Беркита (ЛБ). В случае эндемической формы ЛБ опухолевые клетки содержат ДНК вируса Эпштейна–Барр. При спорадических формах этого заболевания вирусный геном выявляется в 25 % случаев, хотя 75 % больных сероположительны по вирусу Эпштейна–Барр. Хромосомные перестройки в основном являются реципрокными транслокациями между хромосомами 8 и 14, но примерно в 10 % случаев наблюдаются альтернативные транслокации — $t(2;8)$ или $t(8;22)$ [6]. На генном уровне указанные изменения в ДНК клеток выражаются в перемещении протоонкогена *MYC*, локализованного на хромосоме 8, в область генов, кодирующих тяжелые цепи иммуноглобулинов, Λ -легкие цепи и γ -легкие цепи на хромосомах 14, 2 и 22 соответственно [7]. В большинстве исследованных

случаев основной транслокации $t(8;14)$ происходят изменения гена *MYC*, не затрагивающие его кодирующую область: утрачиваются или нарушаются регуляторные структуры гена. Экспрессия функционального белка *MYC* является обязательным признаком клеток ЛБ [8]. Белки, кодируемые группой генов-супрессоров (*p53*, *RB*, *WAR (p21)*, *p15*, *p16* и др.), принимают непосредственное участие в процессе деления клеток, контролируя их вступление в ту или иную фазу клеточного цикла. Утрата активности таких генов в конечном счете провоцирует нерегулируемую пролиферацию клеток.

Гены-супрессоры опухолевого роста. Если большинство измененных протоонкогенов с генетической точки зрения действуют как доминантные факторы, то гены-супрессоры опухолевого роста действуют обычно рецессивно [9–11]. Структурные и функциональные изменения в онкосупрессорах, как и в онкогенах, могут быть следствием точечных мутаций в кодирующих и регуляторных областях гена, вставок и делеций, вызывающих нарушение процесса считывания белков, изменения их конфигурации или модуляцию белковой экспрессии (образования продукта при клеточных синтезах). Потеря функции антионкогенов в опухолевых клетках происходит, как правило, в результате инактивации обеих аллелей. Но для гена *p53* потеря его функции характерна уже при инактивации только одного аллеля. Предполагается, что утрата одного аллеля в результате делеций создает возможность проявления фатальных рецессивных мутаций в оставшемся (теория Кнадсена) [12]. Герминальные (наследуемые) рецессивные мутации одного из двух аллелей антионкогена могут быть основой наследственной предрасположенности к заболеванию раком [13].

Помимо утраты функции гена в результате мутаций или делеций инактивация гена-супрессора может происходить вследствие гиперметилирования последовательности ДНК, кодирующей данный ген. Мультипатентный ген *p53* участвует в ряде важнейших процессов в жизнедеятельности клетки. Он локализован на хромосоме 17 (17p13) и кодирует фактор транскрипции, который обеспечивает продукцию и функционирование белков, контролирующих клеточное деление [14]. Индукция *p53* вызывает задержку клеточного цикла с последующей репарацией повреждений или естественную гибель клеток, препятствуя таким образом нарушению целостности генома и приобретению опухолевого фенотипа. Ген *p53* активирует транскрипцию белка *p21*, являющегося одним из ингибиторов комплексов циклинзависимых киназ (*cdk*) — регуляторов прохождения клеточного цикла. При этом *p53*

не только вовлечен в регуляцию фазы G1, но также принимает участие в регуляции фазы G2 и непосредственно митоза. В ответ на нарушение процесса удвоения ДНК в контрольной точке вхождения в фазу G2 или в ответ на нарушение образования митотического веретена в митотической точке контроля происходит индукция p53 [14].

Характерные для опухолевых клеток миссенс-мутации приводят к резкому изменению конформации молекулы, что в значительной степени затрагивает все из вышеуказанных его активностей: происходит потеря или ослабление способности связывать и активировать гены с p53-респонсивными элементами, репрессировать другие специфические гены-мишени, ингибировать репликацию ДНК и стимулировать репарацию ДНК. При этом в связи с тем, что p53 образует тетрамерные комплексы, мутации в одном аллеле гена p53 вызывают инактивацию и продукта второго, неповрежденного аллеля. Дело в том, что коэкспрессирующиеся нормальный и мутантные белки p53 образуют неактивные гетеромерные комплексы. Таким образом, мутантный белок ингибирует функции нормального белка p53 по доминантно-негативному механизму [1]. Инактивация p53 дает клеткам большие селективные преимущества в пролиферации. Нарушение функции p53 в результате точечных мутаций, делеций, образования комплекса с другим клеточным регулятором или изменение внутриклеточной локализации приводят к утрате супрессивных свойств и стимулируют опухолевый процесс. Известно, что потеря p53 в результате биаллельной инактивации гена ассоциируется с прогрессированием миелоидных пролиферативных заболеваний, в частности острого миелобластного лейкоза [15], и с развитием бластных кризов у 25 % больных хроническим миелолейкозом. Частые изменения как в локусе 17p13 (зоне локализации гена), так и непосредственно в структуре p53, фиксируются также и при миелодиспластическом синдроме и ЛБ [16, 17].

Ген ретинобластомы (*RB*) — первый из идентифицированных генов-супрессоров, открытых при генетических исследованиях ретинобластомы у детей. В норме он кодирует ядерный белок, фосфорилирование которого приводит к быстрому переходу клеток из фазы G1 в S-фазу и началу нового репликативного цикла. Инактивация или отсутствие белка *RB* может быть ассоциирована с неконтролируемым ростом опухолевых клеток [18]. Клетки млекопитающих, входящие в фазу G1 митоза, требуют постоянной стимуляции митогенами сыворотки. Однако за несколько часов до начала S-фазы такая зависимость теряется. Момент перехода клетки от митогенозависимого к митогенонезависимому состоянию является одной из точек контроля

(или рестрикции) в регуляции клеточного цикла. Пройдя точку рестрикции, клетки становятся независимыми от внешних сигналов и проходят оставшуюся часть клеточного цикла, включая митоз, если нет каких-либо значительных нарушений [18]. В моменты времени, предшествующие точке рестрикции, белок *RB* обнаруживается в клетке в гипофосфорилированном состоянии. При наличии определенных условий, позволяющих прохождение следующего раунда клеточного цикла, *RB* подвергается фосфорилированию и инактивируется, разрешая вхождение клетки в позднюю фазу G1 [18]. В конечном счете повреждение *RB* и/или его партнеров ведет к неконтролируемой пролиферации клеток. Важность гена *RB* подчеркивается и нарушением его функции при многих типах рака, в том числе при некоторых видах лейкозов.

Мутаторными (или генами-модуляторами) называют гены, нарушение функции которых тем или иным способом увеличивает темп возникновения мутаций и/или других генетических изменений. Следует заметить, что многие из опухолевых супрессоров являются одновременно и мутаторными генами. Инактивация таких генов столь сильно увеличивает вероятность появления различных онкогенных мутаций, что образование опухоли становится лишь делом времени. Нарушения функций рассмотренных выше белков, контролирующих апоптоз и/или клеточный цикл (p53, pRb, p16^{Ink4a}, pARF и др.), отменяют запрет на пролиферацию клеток с различными аномалиями, в том числе и с генетическими изменениями, что увеличивает вероятность появления онкогенных клеточных клонов. Данную группу белков принято называть gatekeepers — «сторожа». Наряду с этим идентифицирован ряд компонентов специализированных систем распознавания и репарации повреждений ДНК, дисфункция которых также вызывает генетическую нестабильность, предопределяющую развитие новообразований. Они получили название caretakers — «смотрители». Эта вторая группа белков и является предметом рассмотрения данного раздела. В зависимости от типа повреждений ДНК могут активироваться 3 типа репарационных систем:

- системы репарации двунитевых разрывов ДНК;
- системы репарации неспаренных оснований (mismatch repair);
- системы эксцизионной репарации.

Ключевую роль в интеграции сигналов от поврежденной ДНК и их дальнейшей передаче к разнообразным эффекторам играют специфические протеинкиназы ATM (ataxia-telangiectasia mutated), ATR (ATM related), NBS1, CHK1 и CHK2 (чекпойнткиназы 1 и 2). Белок ATM, имеющий структурное сходство

с фосфатидилинозит-3-киназой (PI3K), накапливается в местах повреждений и приобретает киназную активность, связывая фосфорилированные белки хроматина (H2AX и др.) и белки — сенсоры нарушений структуры ДНК. При этом ATM активируется в ответ на возникновение двунитевых разрывов ДНК (вызываются гамма-облучением, ингибиторами топоизомераз и т.д.), тогда как другие нарушения структуры ДНК (например, сшивки оснований, вызываемые ультрафиолетовым облучением, или повреждения, индуцируемые алкилирующими соединениями) не активируют ATM. В этих случаях, как и при ингибировании синтеза ДНК, наблюдается функциональная активация гомолога ATM, белка ATR. Активированные формы ATM и ATR фосфорилируют ряд своих мишеней, в частности *p53*, Mre11, NBS1, CHK1, CHK2 и *BRCA1*. Для фосфорилирования CHK2 необходимо предварительное фосфорилирование белков комплекса Mre11/NBS1/Rad50, который, локализуясь в местах повреждений, рекрутирует к ним различные молекулы, в том числе CHK2, BRCA1, E2F и PCNA (привлечение PCNA вызывает переключение с репликативного синтеза ДНК на репарационный и остановку клеточного цикла в S-фазе; к блокированию входа и продвижению по S-фазе ведет также подавление функции E2F). Фосфорилированные CHK1 и CHK2, в свою очередь, фосфорилируют и инактивируют белки семейства Cdc25, что вызывает подавление активности регулируемых ими циклинзависимых киназ и быструю остановку клеточного цикла в фазе G1 (если Cdc25A не активирует Cdk2) или G2 (когда Cdc25C не активирует Cdc2). Кроме того, CHK1 и CHK2 амплифицируют сигналы к *p53* и *BRCA1*, что способствует длительной задержке в фазе G1 или G2 и, кроме того, активизирует системы репарации ДНК.

Онкогенный потенциал мутаций *ATM* связан, очевидно, с нарушениями реакций клетки на повреждения ДНК и возникающей в связи с этим генетической нестабильностью. Потенциальным онкогенным эффектом обладают, по-видимому, и нарушения функции белка ATR. Гетерозиготный нокаут гена *ATR* у мышей приводит к увеличению частоты возникновения лимфосарком, фибросарком, рака печени и яичника (инактивация обеих аллелей гена *ATR* в отличие от гомозиготного нокаута гена *ATM* вызывает внутриутробную гибель). Наследственной предрасположенности к развитию каких-либо новообразований, связанной с врожденными мутациями *ATR*, у людей пока не выявлено, но соматические мутации этого гена нередко обнаруживают в клетках некоторых опухолей, в частности рака желудка.

Увеличение риска развития новообразований наблюдается и при врожденных мутациях CHK2. Оказалось, что у части пациентов с клиническими

проявлениями синдрома Ли—Фраумени, но не имеющих мутаций *p53*, выявляют терминальные гетерозиготные мутации гена *CHK2*. Этот факт свидетельствует о ключевой роли нарушений сигнального пути *CHK2—p53*, контролирующего реакции клетки на повреждения ДНК, в возникновении сильной предрасположенности к развитию различных новообразований. Соматические инактивирующие мутации CHK2 и CHK1 обнаруживаются в части случаев наиболее распространенных опухолей: рака легкого, толстой кишки, матки и др. [1].

Таким образом, наряду с активацией онкогенов, нарушения работы генов-супрессоров опухоли являются решающими в инициации туморогенных процессов, влияя на прохождение клеточного цикла, регулируя дифференцировку и запрограммированную гибель клеток, т.е. естественный процесс их отмирания (апоптоз).

Промоция опухоли

В процессе трансформации нормальной клетки в опухолевую она приобретает ряд новых свойств, которые дают ей селективные преимущества для выживания. Во-первых, это пониженная потребность во внешних сигналах для инициации и поддержания клеточной пролиферации — **самодостаточность в пролиферативных сигналах**. Связывание ростовых факторов со своими рецепторами инициирует передачу сигналов внутри клетки, приводящую к репликации ДНК и делению клетки. Такая пониженная потребность в растворимых ростовых факторах достигается изменениями в системах внутриклеточной сигнализации, которые либо вызывают секрецию необходимых факторов роста самими трансформированными клетками, либо резко увеличивают количество рецепторов для необходимых факторов роста, либо запускают в отсутствие ростового фактора каскад событий, аналогичный тому, который в норме инициируется связыванием ростового фактора со своим рецептором.

Другим важнейшим приобретенным свойством неопластических клеток является их **пониженная чувствительность к ростиингибирующим сигналам**. Такие сигналы генерируются как секретируемыми растворимыми факторами (цитокинами), так и взаимодействиями клеток с внеклеточным матриксом и друг с другом. «Мотором» клеточного цикла является активация последовательно сменяющих друг друга циклинзависимых киназ. Каждая из циклинзависимых киназ представляет собой холоферментный комплекс, состоящий из собственно каталитической субъединицы (cdk) и регуляторной субъединицы — циклина. Связывание с циклином увеличивает киназную активность cdk и, кроме того, определяет их локализацию и субстратную специфичность.

Уровень экспрессии каждого из циклинов и в меньшей степени cdk направленно изменяется в определенные фазы клеточного цикла, и активность cdk регулируется изменениями фосфорилирования их определенных аминокислотных остатков (за такую регуляцию ответственны фосфатазы Cdc25 и протеинкиназы САК, Weel) и связыванием с так называемыми SKI – ингибиторами cdk. Представители семейства Cip/Kip (p21^{WAF1/CIP1}, p27^{KIP1} и p57^{KIP2}) ингибируют различные комплексы cdk2, ответственные за вход и продвижение по S-фазе. С другой стороны, они не ингибируют, а даже активируют комплексы циклин D/cdk4(6), оперирующие в ранней фазе G1. Члены семейства Ink4 (p16^{Ink4a}, p15^{Ink4b}, p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}) непосредственно взаимодействуют с cdk4(6). При этом, связывая cdk4(6), находящиеся в составе активных комплексов с циклином D и белками Cip/Kip, они вытесняют белки Cip/Kip, направляя их на связывание с cdk2. Поэтому повышение активности белков Ink4, в частности опухолевого супрессора p16^{Ink4a}, вызывает как прямое ингибирование активности комплексов циклин D/cdk4(6), так и не прямое блокирование комплексов циклин E/cdk2 и циклин A/cdk2. Для опухолевых клеток характерны генетические изменения, вызывающие, с одной стороны, перманентную стимуляцию сигнальных путей, активирующих cdk4(6) и cdk2, с другой – нарушения в путях передачи сигналов, опосредующих активацию чекпойнтов в ответ на ростингибирующие сигналы. Первый тип изменений возникает в основном в результате активирующих мутаций так называемых протоонкогенов – нормальных компонентов путей передачи различных митогенных сигналов – и приводит к самодостаточности в пролиферативных сигналах, т.е. к способности неопластической клетки постоянно генерировать внутри себя сигналы к размножению, в норме исходящие от внешних стимулов.

Инактивация чекпойнтов, обеспечивающая нечувствительность к ростингибирующим сигналам и **генетическую нестабильность**, чаще всего обусловлена дисфункцией опухолевых супрессоров, к которым относятся и некоторые из SKI. Генетическая нестабильность – увеличение вероятности возникновения и закрепления в ряду клеточных поколений разнообразных изменений генома. Значение этого признака для образования злокачественной опухоли связано с тем, что именно генетическая нестабильность вместе с постоянно идущим отбором обеспечивают накопление в одной клетке сразу нескольких мутаций в онкогенах, опухолевых супрессорах и других генах, придающих клетке совокупность необходимых для образования опухоли свойств. Генетическая нестабильность популяций опухолевых клеток складывается из 4 основных типов нарушений: 1) уменьшения точности воспроизведения генетиче-

ской информации, а именно понижения точности репликации ДНК и сегрегации хромосом во время митоза; 2) нарушений в системах репарации повреждений ДНК или ошибок, возникших при ее репликации; 3) ослабления функции чекпойнтов клеточного цикла, активируемых в ответ на повреждения структуры ДНК или веретена деления в митотической клетке, в результате чего клетка, несмотря на разрывы ДНК или изменения числа хромосом, продолжает делиться и умножать число аномальных потомков; 4) ослабления индукции апоптоза, вследствие чего делящиеся клетки с генетическими нарушениями не погибают, а выживают.

Понижение точности репликации ДНК в неопластических клетках связано с повышением синтеза и активности в них так называемых низкоточных полимераз, в частности ДНК-полимеразы- β , которая в норме используется лишь для быстрой репарации массивных повреждений ДНК (основную роль в воспроизводстве ДНК играет высокоточная ДНК-полимераза- δ).

Повышение содержания низкоточных ДНК-полимераз- β , - ϵ и др. может быть вызвано экспрессией ряда онкогенов, например *BCR/ABL* и *RAS*. Нарушения правильной сегрегации хромосом во время митоза могут происходить вследствие изменения числа и структуры centrosom или центров организации микротрубочек: в опухолевых клетках нередко обнаруживается >2 centrosom, что ведет к многополярным митозам и возникновению анеуплоидных вариантов с неправильным числом хромосом. К увеличению числа centrosom в клетке приводит активация онкогена *RAS* и инактивация опухолевых супрессоров *p53*, *APC* или *BRCA1*.

С изменениями регуляции клеточного цикла связаны и **нарушения дифференцировки** неопластических клеток. Реализация большинства дифференцировочных программ требует выхода клетки из митотического цикла в стадию покоя (G0). Перманентная стимуляция размножения клеток и нечувствительность к действию ростингибирующих цитокинов, являющихся одновременно индукторами дифференцировки (таких как TGF- β), нередко приводят к блокированию или извращению процессов дифференцировки.

Апоптоз вызывается как физиологическими сигналами: экспрессией специальных киллерных цитокинов, изменениями гормонального статуса (циклическое ремоделирование эндометрия матки, возрастная инволюция тимуса и др.), так и нефизиологическими внутриклеточными повреждениями или неблагоприятными условиями: нехваткой факторов роста, повреждениями ДНК, гипоксией и т.д. В регуляции апоптоза выделяют 2 основные фазы: индукции (принятия решения) и экзекуции

(исполнения приговора). Последняя осуществляется путем активации каспаз — семейства цистеиновых протеиназ, расщепляющих свои субстраты по остаткам аспартаговой кислоты.

Существуют 2 принципиально разных сигнальных пути, приводящих к активации эффекторных каспаз 3, 6 и 7. Один из них инициируется связыванием специфических киллерных лигандов (Fas-лиганд, TNF- α (фактор некроза опухоли α) и др.) со своими рецепторами, так называемыми рецепторами смерти, что вызывает рекрутирование к ним адаптерных белков и прокаспаз, в частности прокаспазы 8. Агрегация молекул прокаспазы достаточна, чтобы инициировать их аутопроцессирование (расщепление) и образование активных форм каспазы 8, которая, в свою очередь, процессирует до активных форм эффекторные каспазы. При альтернативном пути индукции апоптоза ключевую роль играют митохондрии, поэтому его называют митохондриальным путем. Для опухолевых клеток характерны генетические изменения, ведущие к ослаблению обоих путей индукции апоптоза. Так, в них закономерно обнаруживаются: 1) потеря экспрессии на поверхности клетки рецептора смерти Fas; 2) нарушения проведения апоптогенного сигнала к митохондриям (например, при инактивации опухолевых супрессоров *p53* и *PTEN*); 3) ингибирование проницаемости митохондриальной мембраны для цитохрома C и AIF вследствие изменений экспрессии белков семейства *bcl-2*; 4) блокирование активации эффекторных каспаз (например, при потере экспрессии белка APAF-1 в результате метилирования его гена); 5) резкое уменьшение времени жизни каспаз ввиду их связывания с белками IAP (inhibitors of apoptosis), экспрессия которых повышается в результате активации протоонкогенов *RAS*, *PKB/Akt* или инактивации опухолевого супрессора *PTEN* [1].

Для образования из одной клетки-родоначальницы сначала опухоли, а затем метастаз требуется огромное число клеточных делений. При этом хорошо известно, что существует механизм, ограничивающий число делений большинства нормальных клеток (заведомое исключение составляют стволовые клетки). Так, в культурах *in vitro* фибробласты и эпителиальные клетки человека после 50–60 делений (число Хейфлика) необратимо останавливаются в фазе G1 или G2 клеточного цикла (этот феномен получил название репликативного старения). В основе работы такого счетно-ограничительного механизма лежит прогрессивное уменьшение длины теломер в результате неполной репликации концевых участков хромосом в каждом из митотических циклов. По существующим представлениям остановка клеточного цикла обусловлена образованием липких концов хромосом, что вызывает их соединение

и запуск реакций, аналогичных наблюдаемым при действии ДНК-повреждающих агентов. Однако в клетках с активной теломеразой — ферментом, осуществляющим элонгацию *de novo* теломерных повторов ДНК, или при активизации других так называемых альтернативных механизмов удлинения теломер, основанных, в частности, на нерцепиционной рекомбинации их участков, может происходить отмена ограничения на число делений — **иммортализация** (приобретение бессмертия). Об этом свидетельствуют 2 группы фактов: 1) в отличие от нормальных тканей человека в клетках большинства опухолей, как и в стволовых клетках, теломераза активна; 2) трансдукция векторов, экспрессирующих каталитическую субъединицу теломеразы (TERT), увеличивает продолжительность жизни нормальных человеческих клеток некоторых линий по крайней мере еще на 20 делений [19].

Важнейшим свойством опухолевых клеток являются **изменения морфологии и движения**. В основе морфологических нарушений лежат взаимосвязанные между собой изменения цитоскелета, адгезионных взаимодействий клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом. Они выражаются в нарушении формирования фокальных контактов и ухудшении прикрепления клеток к внеклеточному матриксу, дезорганизации системы актиновых микрофиламентов, что приводит к изменениям активности псевдоподий и подвижности клеток. Необходимо подчеркнуть, что именно эти нарушения вместе с некоторыми другими свойствами, в частности способностью секретировать протеолитические энзимы, определяют приобретение неопластическими клетками 2 свойств, лежащих в основе злокачественного роста: **способности к инвазии**, т.е. проникновению в окружающие здоровые ткани, и сопряженной с ней **способности к метастазированию** — образованию вторичных очагов опухолевого роста [1]. В основе биохимических особенностей опухолевой ткани лежат изменения генетической регуляции клетки. Как правило, репрессируется выработка ферментов и белков, позволяющих клетке выполнять специализированную функцию, и активируются путем дерепрессии ферменты, которые обеспечивают клеточное деление. Важной биохимической особенностью опухолевой клетки является активизация синтеза нуклеиновых кислот. В опухолевых клетках, по сравнению с нормальными, меняется набор ДНК-полимераз. В опухолевых клетках качественно и количественно меняется синтез белков. К белкам, синтез которых в опухолевых клетках резко увеличивается, относятся белки митотического аппарата, в том числе крупномолекулярный белок митотического веретена. Меняется метаболизм белков. Снижается способность опухолевых клеток

к переаминированию и дезаминированию аминокислот, иногда не образуются некоторые ферменты, участвующие в обмене аминокислот. В большинстве опухолей увеличиваются захват аминокислот из крови и синтез белка. Катаболизм белка снижается настолько, что даже в голодающем организме белок опухоли не принимает участия в общем обмене. В злокачественных образованиях нередко значительно увеличена скорость гликолиза. В них происходит аэробный гликолиз, т. е. распад углеводов до пирувата и превращение его в молочную кислоту в присутствии кислорода (отрицательный эффект Пастера). В опухолях также изменяется окисление (тканевое дыхание). В основном имеется тенденция к снижению интенсивности дыхания пропорционально степени дедифференцировки клеток [20].

Прогрессия опухоли

В процессе прогрессии опухолевая клетка изменяется качественно, приобретает новый фенотип. Причиной этого является активный мутационный процесс вследствие генетической нестабильности, который в ней постоянно происходит. Опухоль из моноклонального образования превращается в поликлональные, т. е. в ней одновременно существует множество клонов с различными наборами мутации. Под давлением отбора со стороны организма и его иммунной системы происходит постоянная выборка тех клонов опухолевых клеток, которые наиболее приспособлены к выживанию во «враждебной окружающей среде». Иммунная система противодействует развитию опухоли за счет активации натуральных киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, которые способны непосредственно убивать трансформированные клетки. Также помощниками в борьбе с опухолью являются антигенпрезентирующие клетки — макрофаги и дендритные клетки, которые помогают иммунным клеткам распознать своего «врага», раковую клетку. В то же время опухоль со своей стороны противодействует иммунной системе и защищается от «нападения». Она стимулирует выброс проопухолевого цитокина TGF- β (трансформирующий фактор роста β), индуцирует активацию Т-регуляторных клеток, защищает опухолевые клетки от распознавания за счет снижения антигенной нагрузки и уровня экспрессии генов МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости) класса I, использует различные механизмы, таким образом приводя к созданию проопухолевого микроокружения, которое подавляет развитие иммунной реакции.

Согласно теории иммунного надзора раковые клетки постоянно редактируют и модулируют противоопухолевый иммунный ответ хозяина, который формируется иммуногенностью опухоли и клональ-

ным отбором. Во время этого процесса баланс между противоопухолевым и способствующим росту опухоли иммунитетом может быть наклонен в пользу роста опухоли. До того как злокачественное образование подвергается иммунному бегству, оно может поддерживаться в «равновесии» между его ростом и разрушением, что объясняет десятилетия покоя опухоли [21]. Предполагается, что для изменения баланса в свою пользу раковая клетка редактирует репертуар опухолевых антигенов к снижению иммуногенности и преобразует микроокружение опухоли, которое становится иммуносупрессивным [22].

Растущая масса опухолевых клеток требует все большего количества питательных веществ, происходит стимуляция неоангиогенеза. Неоангиогенез — формирование сети капилляров из эндотелиальных клеток, выстилающих мелкие венулы, — необходимое условие для дальнейшего роста опухолевого узелка, достигшего в диаметре 2–4 мм. Приобретение неопластическими клетками способности стимулировать пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток связано, очевидно, с 2 основными процессами: прекращением секреции ими факторов, ингибирующих ангиогенез (тромбоспондины и др.), и увеличением продукции цитокинов (факторов роста для эндотелиоцитов), сопровождающимся повышением секреции и/или активности протеаз, обеспечивающих протеолиз внеклеточного матрикса и инвазию эндотелиоцитов в ткани новообразования. Ключевую роль в возникновении ангиогенного фенотипа неопластических клеток играет инактивация функции опухолевого супрессора p53, контролирующего экспрессию некоторых ингибиторов и стимуляторов ангиогенеза [19].

Увеличение степени подвижности раковых клеток, независимость их роста от субстрата ведут к дальнейшей прогрессии опухоли и развитию вторичных очагов, метастаз. С клинической точки зрения метастазирование является наиболее важным аспектом туморогенеза, поскольку >90 % смертности от рака вызвано метастазами. Результаты недавних исследований однозначно показывают, что метастазы требуют тесного сотрудничества с опухолевыми и иммунными клетками, а также с клетками, стимулируемыми воспалением и стромальными элементами. Процесс метастазирования может быть грубо разделен на 4 основных этапа. Первый представлен эпителиально-мезенхимальным переходом, при котором раковые клетки приобретают характеристики фибробластов, повышающие их подвижность и позволяющие им проникать в эпителиальную выстилку/базальные мембраны и достигать эфферентных кровеносных или лимфатических сосудов [23]. Потеря экспрессии Е-кадгерина предполагается как ключевое событие в эпителиально-мезенхимальном

переходе. На 2-м этапе опухолевые клетки проникают в кровеносные и лимфатические сосуды. Воспаление может содействовать этому через продукцию медиаторов, которые увеличивают проницаемость сосудов. На 3-м этапе клетки, инициирующие метастазы, выживают и путешествуют по всей циркуляции. Было подсчитано, что только около 0,01 % раковых клеток, которые попадают в циркуляцию, выживут и дадут начало развитию микрометастазов [22, 24]. Далее интегринапосредованная остановка позволяет осуществиться выходу из сосудов в ткани циркулирующих опухолевых клеток. На 4-м этапе единичные метастатические предшественники взаимодействуют с иммунными клетками, клетками, стимулируемыми воспалением и стромальными клетками, и начинают размножаться [22, 25]. Некоторые из этих клеток уже могут быть направлены в частично трансформированную нишу в ответ на опухоль, образуемую воспалительными сигналами, до появления инициирующих метастазы раковых клеток [22, 26]. Одним из этих воспалительных сигналов является внеклеточный компонент матрикса версикан, который ведет к активации макрофагов и производству содействующего метастазам цитокина TNF- α [22, 27]. TGF- β – противовоспалительный цитокин, продуцируемый опухолевыми, миелиоидными клетками и Т-лимфоцитами. TGF- β -сигналы являются важными регуляторами эпителиально-мезенхимального перехода и метастазирования, повышенный уровень TGF- β часто ассоциируется с плохим прогнозом [28]. Однако TGF- β также подавляет пролиферацию эпителиальных клеток и начальный рост опухоли, в результате чего некоторые злокачественные образования приобретают инактивирующие мутации в TGF- β -сигнальных компонентах [22, 28]. Несмотря на дефекты в TGF- β -сигналах, такие опухоли все еще могут метастазировать. Эти противоположные эффекты TGF- β на различных стадиях развития опухоли ждут механистического объяснения. Проникновение раковых клеток требует обширного протеолиза внеклеточного матрикса на фронте инвазии. Стимулируемые воспалением клетки являются важными источниками протеаз, которые разрушают внеклеточный матрикс. Когда метастатические клетки входят в циркуляцию, они должны выжить во взвешенном состоянии и сопротивляться индуцированной разьединением гибели или апоптозу. Выживание циркулирующих опухолевых клеток подвергается воздействию воспалительных медиаторов, высвобождаемых иммунными клетками в ответ на происходящие в опухоли стимулы или полученные от патогенов раздражители [27, 29]. Некоторые из этих эффектов зависят от активации *NF- κ B* в любых воспалительных или опухолевых клетках. Множество цитокинов, присутствующих

в микроокружении опухоли, в том числе TNF- α , интерлейкин 6 и эпирегулин, способствует выживанию циркулирующих метастатических источников [22, 30]. В дополнение к *NF- κ B* и активации *STAT3* некоторые из этих цитокинов могут физически связывать опухолевые клетки с TAMs (tumor-associated macrophages, связанные с опухолью макрофаги), позволяя им путешествовать вместе по всей кровеносной системе [31]. С другой стороны, единичные метастатические клетки, которые длительно не присутствуют в иммуносупрессивной окружающей среде, могут быть направлены снова на иммунный надзор. В самом деле, в некоторых случаях инфильтрация опухолей активированными Т-клетками снижает скорость метастазирования [22, 32, 33]. Взаимодействие циркулирующих опухолевых клеток с тромбоцитами или макрофагами может защитить их от смерти, опосредованной NK-клетками (natural killer, натуральными киллерами), тем самым преодолевая иммунный надзор [34]. Путешествие циркулирующих метастатических источников прекращается после интегринзависимой остановки на эндотелии, а затем выхода клеток из полости сосуда. Некоторые провоспалительные цитокины, уровень которых повышается в кровообращении больных раком, усиливают экспрессию молекул адгезии на эндотелии или органах-мишенях и тем самым увеличивают вероятность прикрепления метастатических клеток [22, 35].

Заключение

Хотелось бы отметить, что в настоящее время факторами риска развития онкологических заболеваний являются как условия жизни индивидуума (характер питания, употребление алкоголя, курение и т.д.), так и изменения, происходящие в окружающем его мире. К ним относят физические (ультрафиолетовое облучение, ионизирующая радиация) и биологические (вирусы) факторы, а также химические вещества (канцерогены). Из-за воздействия на организм человека всей совокупности вышеперечисленных факторов (в различных сочетаниях) его клетки могут подвергаться опухолевой трансформации в результате возникновения генетической нестабильности, которая приводит к мутациям. Процесс развития опухоли разделяют на 3 основных этапа: инициацию, промоцию и прогрессию.

На этапе инициации опухолевого процесса мутации чаще всего происходят в генах-супрессорах опухолевого роста, протоонкогенах и генах, ответственных за репликацию и репарацию генома клетки. Протоонкогены – нормальные гены клетки, которые отвечают за важнейшие процессы жизнедеятельности, такие как пролиферация, дифференцировка и др. В процессе активации они превращаются в онкогены. Активация протоонкогенов

происходит в результате: 1) мутаций в первичной структуре гена; 2) амплификации гена; 3) изменений в ДНК клетки, которые приводят к нарушениям структуры протоонкогена. В процессе инициации опухоли происходит инактивация генов-супрессоров опухолевого роста. Например, инактивация гена-супрессора *p53* ведет к значительному снижению апоптоза.

Также необходимо отметить мутации, которые могут возникнуть в генах, контролирующих процессы репликации и репарации ДНК. Это ведет к накоплению ошибок в процессе клеточного деления в дочерних клетках, возникновению мутаций. Так, соматические мутации *CHK1* и *CHK2* обнаруживают при раке легкого, толстой кишки и матки.

Этап промоции опухоли характеризуется следующими событиями. Трансформированная раковая клетка приобретает новые свойства, которые помогают ей выжить. Клетка приобретает способность к автономному росту, независимо от субстрата. Начинается процесс непрерывной ауто- и паракринной стимуляции ее ростовыми факторами, которые она сама и производит, а также рецепторов к этим факторам. Сигналы, поступающие из внешней среды, блокируются, и клетки начинают активно пролиферировать. Значительно подавлен процесс апоптоза. Клетка становится генетически нестабильной и склонной к накоплению мутаций. Происходят активация фермента теломеразы и иммортализация клеток. В результате опухолевой трансформации клетки на этапе промоции приобретают способность к инвазии и метастазированию. В раковой клетке изменяется ее биохимический профиль. Активируется синтез нуклеиновых кислот, процесс аэробного гликолиза. Работа рибосомного аппарата клетки направлена на синтез белков, участвующих в митозе, в том числе белка митотического веретена.

Далее клетки вступают в 3-й этап, опухолевую прогрессию, в котором они приобретают новый фенотип. Опухолевые клетки теряют часть своих дифференцировочных антигенов, что придает им селективные преимущества и помогает выжить. Благодаря постоянному процессу мутагенеза под давлением отбора со стороны иммунной системы возникают все новые клоны раковых клеток, опухоль становится поликлональной. На этапе опухолевой прогрессии

клетки претерпевают эпителиально-мезенхимальный переход, который придает им фибробластоподобные свойства. Такие изменения соответствуют I стадии метастазирования. Далее клетки под действием ряда мотогенных факторов начинают проникать через стенки эндотелия в полость кровеносных и лимфатических сосудов — II стадия метастазирования. Под влиянием тока жидкости клетки разносятся по всему организму. Несмотря на попытки уничтожить раковые клетки, которые предпринимаются со стороны иммунной системы, части из них удается выжить. За счет интегринопосредованной остановки опухолевые клетки прикрепляются к поверхности эндотелиоцитов. Далее следует их выход из полости сосуда в окружающие ткани. Здесь появляются вторичные очаги активно пролиферирующих клеток, метастазы. Это соответствует III и IV стадиям метастазирования. Возникновение метастаз говорит о генерализации процесса развития опухоли. Для активного роста раковым клеткам во вторичных очагах необходимо получать достаточное количество питательных веществ. Поэтому клетки синтезируют ряд ангиогенных факторов, что ведет к развитию новых сосудов, которые врастают в опухоль. К сожалению, работа иммунной системы в борьбе со злокачественным образованием оказывается недостаточно эффективной. Опухолевые клетки искусно маскируются, и иммунная система не в состоянии их все обнаружить. Кроме того, они способствуют выработке проопухолевого цитокина TGF- β , индуцируют активацию Т-регуляторных клеток, таким образом подавляя иммунитет.

Отметим, что детальное изучение процесса перерождения клетки и развития опухоли совершенно необходимо для разработки новых препаратов и терапии онкологических заболеваний. В настоящее время разрабатывают лекарства, которые будут действовать исключительно на опухолевые клетки, так называемая таргетная терапия. Она уже показала свою эффективность, особенно в сочетании с классической химиотерапией, иммунотерапией. Хотелось бы надеется, что дальнейшие исследования в области изучения поведения опухолевой клетки и ее взаимодействий с организмом будут способствовать разработке более эффективных препаратов и методов лечения больных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Копнин Б.П. Основные свойства неопластической клетки и базовые механизмы их возникновения. В кн.: Канцерогенез. Под. ред. Д.Г. Заридзе. М.: Медицина, 2004. С. 86–94, 97–101, 134, 150–152.
2. Alitaio K., Schwab M. Oncogene amplification in tumor cells. *Adv Cancer Res* 1986;47:235–81. PMID: 3022564.
3. Melani C., Rivoltini L., Parmiani G. et al. Inhibition of proliferation by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in colon

- adenocarcinoma cell lines that express c-myc. *Cancer Res* 1991;51(11):2897–901. PMID: 2032228.
4. Sullivan N.F., Willis A.E., Moore J.P. et al. High levels of the c-myc protein in cell lines of Bloom's syndrome origin. *Oncogene* 1989;4(12):1509–11. PMID: 2687770.
 5. Tesch H., Michels M., Jucker M. et al. Heterogeneous expression of c-myc protein in human leukemia detected by simultaneous two color flow cytometric analysis. *Leukemia Res* 1992;16(3):265–74. PMID: 1560675.
 6. Weiss R.A., Schulz T.F. Transforming properties of the HTLV-I tax gene. *Cancer Cells* 1990;2(8–9):281–3. PMID: 2223390.
 7. Croce C.M. Role of chromosome translocations in human neoplasia. *Cell* 1987;49(2):155–6. PMID: 3494520.
 8. Татосян А.Г., Зуева Э.Ш. Механизмы активации онкогенов. В кн.: Клиническая онкогематология. Руководство для врачей. Под ред. М.А. Волковой. М.: Медицина, 2001. 576 с.
 9. Levine A.J. The genetic origins of neoplasia. *JAMA* 1995;273(7):592. PMID: 7837394.
 10. Sherr C.J. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Cenosis Dev* 1998;12(19):2984–92. PMID: 9765200.
 11. Kinzler K.W., Vogelstein B. Cancer therapy meets p53. *N Engl J Med* 1994;331(1):49–50. DOI: 10.1056/NEJM199407073310113. PMID: 8202105.
 12. Knudsen A.G., Strong L.C., Anderson D.E. Heredity and cancer in man. *Prog Med Genet* 1973;9:113–58. PMID: 4351406.
 13. Levine A.J. The tumor suppressor genes. *Ann Rev Biochem* 1993;62:623–51. DOI: 10.1146/annurev.bi.62.070193.003203. PMID: 8394683.
 14. Ko L.J., Prives K. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10(9):1054–72. PMID: 8654922.
 15. Sourvinos G., Tsatsanis C., Spandidos D.A. Mechanisms of retrovirus-induced oncogenesis. *Folia Biol (Praha)* 2000;46(6):226–32. PMID: 11140855.
 16. Singerland J.M., Minden M.D., Benchimol S. Mutation of the p53 gene in human acute myelogenous leukemia. *Blood* 1991;77(7):1500–7. PMID: 2009369.
 17. Sankar M., Tanaka K., Kumaralev T.S. et al. Identification of a commonly deleted region at 17p13.3 in leukemia and lymphoma associated with 17p abnormality. *Leukemia* 1998;12(4):510–6. PMID: 9557609.
 18. Weinberg R.A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81(3):323–30. PMID: 7736585.
 19. Антоненкова Н.Н., Аверкин Ю.И., Белоцерковский И.В. и др. Канцерогенез. В кн.: Онкология. Под ред. И.В. Залуцкого. Минск: Вышэйшая школа, 2007. С. 45–46.
 20. Горбань В.А. Особенности опухолевой ткани. В кн.: Ю.В. Быць, Г.М. Бутенко, А.И. Гоженко и др. Патологическая анатомия. Киев: ВСИ «Медицина», 2015. С. 388.
 21. Koebel C.M., Vermi W., Swann J.B. et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007;450(7171):903–7. DOI: 10.1038/nature06309. PMID: 18026089.
 22. Grivnitskiy S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140(6):883–99. DOI: 10.1016/j.cell.2010.01.025. PMID: 20303878.
 23. Kalluri R., Weinberg R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119(6):1420–8. DOI: 10.1172/JCI39104. PMID: 19487818.
 24. Joyce J.A., Pollard J.W. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):239–52. DOI: 10.1038/nrc2618. PMID: 19279573.
 25. Polyak K., Weinberg R.A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):265–73. DOI: 10.1038/nrc2620. PMID: 19262571.
 26. Kaplan R.N., Riba R.D., Zacharoulis S. et al. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* 2005;438(7069):820–7. DOI: 10.1038/nature04186. PMID: 16341007.
 27. Kim S., Takahashi H., Lin W.W. et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* 2009;457(7225):102–6. DOI: 10.1038/nature07623. PMID: 19122641.
 28. Yang J., Weinberg R.A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 2008;14(6):818–29. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.05.009. PMID: 18539112.
 29. Luo J.L., Maeda S., Hsu L.C. et al. Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF- α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 2004;6(3):297–305. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.08.012. PMID: 15380520.
 30. Nguyen D.X., Bos P.D., Massague J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):274–28. DOI: 10.1038/nrc2622. PMID: 19308067.
 31. Condeelis J., Pollard J.W. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell* 2006;124(2):263–6. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.007. PMID: 16439202.
 32. Galon J., Costes A., Sanchez-Cabo F. et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006;313(5795):1960–4. DOI: 10.1126/science.1129139. PMID: 17008531.
 33. Pages F., Berger A., Camus M. et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353(25):2654–66. DOI: 10.1056/NEJMoa051424. PMID: 16371631.
 34. Palumbo J.S., Talmage K.E., Massari J.V. et al. Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 2007;110(1):133–41. DOI: 10.1182/blood-2007-01-065995. PMID: 17371949.
 35. Mantovani A., Allavena P., Sica A., Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454(7203):436–44. DOI: 10.1038/nature07205. PMID: 18650914.

ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ МИНИМАЛЬНОЙ ОСТАТОЧНОЙ БОЛЕЗНИ ПРИ В-ЛИНЕЙНЫХ ОСТРЫХ ЛИМФОБЛАСТНЫХ ЛЕЙКОЗАХ В УСЛОВИЯХ ТАРГЕТНОЙ ТЕРАПИИ

О.А. Безнос, Л.Ю. Гривцова, А.В. Попа, М.А. Шервашидзе, И.Н. Серебрякова, Н.Н. Тупицын

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Ольга Алексеевна Безнос beznos.olga@gmail.com

Введение. Проточно-цитометрические (ПЦ) алгоритмы детекции минимальной остаточной болезни (МОБ) хорошо отработаны и близки по чувствительности к молекулярно-биологическим методам. Однако помимо информативных лейкозассоциированных иммунофенотипов, отобранных с учетом фенотипа опухоли на этапе диагностики, необходимо принимать во внимание специфичность проводимой таргетной терапии и ее воздействие на клетку.

Цель работы — отобрать стабильные комбинации антигенов для выявления В-линейных предшественников у больных на терапии блинатумомабом (анти-CD19).

Материалы и методы. Больному Г., 4 лет, с ранним рецидивом острого лимфобластного лейкоза (ОЛЛ) (пре-пре-В иммуноподварианта) после 3 курсов противорецидивного лечения с учетом сохранения МОБ-положительного статуса был назначен блинатумомаб в режиме монотерапии. Иммунофенотип опухолевых В-лимфоцитов был детально охарактеризован иммунологически методом ПЦ согласно протоколу консорциума EuroFlow как в дебюте заболевания, так и в рецидиве. Мониторинг МОБ в рецидиве проводили методом 8-цветной ПЦ с учетом индивидуально отобранных лейкозассоциированных иммунофенотипов.

Результаты. У больного, получающего лечение блинатумомабом, в курсе терапии В-линейного ОЛЛ была изменена стратегия мониторинга МОБ. С учетом отсутствия экспрессии CD19 основой идентификации В-линейных предшественников стали суCD22 в сочетании с ядерной TdT и CD10.

Заключение. В случае назначения блинатумомаба в курсе терапии В-линейного ОЛЛ выявление В-линейных предшественников должно основываться на оценке экспрессии других пан-В-клеточных антигенов. В первую очередь это суCD22 или суCD79a в сочетании с ядерной TdT и CD10 в пределах ядродержащих клеток образца.

Ключевые слова: минимальная остаточная болезнь, В-линейный острый лимфобластный лейкоз, таргетная терапия, блинатумомаб

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-18-24

APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE IN B-CELL ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIAS IN CONDITIONS OF TARGET THERAPY

O.A. Beznos, L.Yu. Grivtsova, A.V. Popa, M.A. Shervashidze, I.N. Serebryakova, N.N. Tupitsyn

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Background. Flow cytometry (FC) algorithms of detection of minimal residual disease (MRD) are well standardized, and approximate to molecular biologic methods. However, besides informative leukemia-associated aberrant immunophenotype, which are selected taking into account a tumor phenotype at diagnostics stage, it is necessary to consider specificity of the provided target therapy and its influence on a cell.

Objective: to offer stable combinations of antigens to identify B-cell precursors in patients on therapy of blinatumomab.

Materials and methods. Clinical observation of patient G. 4 years old with B-cell precursors acute lymphoblastic leukemia (ALL) (pre-pre-B immunosubtype), whom after 3 blocks of reinduction therapy, taking into account MRD-positive status, blinatumomab was appointed as a monotherapy. Tumor immunophenotype was characterized in details by FC protocol according to EuroFlow in debut and relapse of the disease. MRD monitoring was provided by 8-color FC taking into account personalized leukemia-associated aberrant immunophenotypes.

Results. In patient with B-cell precursors ALL received blinatumomab, the strategy of MRD monitoring was changed. Due to the lack of CD19 expression, identification of B-cell precursors was based on expression of cyCD22 in combination with nuclear TdT and CD10.

Conclusion. In case of blinatumomab's appointment during B-cell precursors ALL therapy, it is necessary to change the strategy of B-cell precursors identification, due to the lack of CD19 expression. Detection of B-cell precursors should be provided by assessment

of other pan-B lineage antigens. First of all, it is cyCD22 or cyCD79a in combination with nuclear TdT and CD10, within the limits of nucleated cells of the sample.

Key words: minimal residual disease, B-lineage acute lymphoblastic leukemia, target therapy, blinatumomab

Введение

Оценка минимальной остаточной болезни (МОБ) является неотъемлемой частью современных протоколов лечения В-линейных острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ) у детей [1, 2]. Многопараметровая проточная цитометрия (ПЦ) дает возможности детальной иммунофенотипической характеристики опухоли на этапе диагностики с последующим отбором индивидуальных лейкозассоциированных иммунофенотипов и персонализации мониторинга МОБ [3]. Протоколы детекции МОБ при ОЛЛ хорошо отработаны и близки по чувствительности к молекулярно-биологическим методам [4]. С применением углубленной риск-стратификации больных с учетом данных МОБ достигнуты значительные успехи терапии, отражением которых стало увеличение общей выживаемости до 80–90 %. Однако стандартная терапия остается неэффективной у 10–20 % детей с впервые диагностированным ОЛЛ [5, 6].

Ежегодно в клиническую практику входят новые таргетные препараты, призванные на молекулярном уровне воздействовать на болезнь, и целый ряд находится на разных стадиях клинических испытаний [7].

Новый виток развития таргетных препаратов произошел с разработкой биспецифических антител, представляющих новый класс препаратов на основе моноклональных антител, связывающихся с таргетным поверхностным антигеном с одной стороны и с Т-клеточным рецептором с другой, привлекая таким образом эффекторные Т-клетки и усиливая противоопухолевый эффект. Первым лекарственным средством в данном классе стал блинатумомаб, одобренный Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов и лекарственных препаратов США для лечения Ph-отрицательного рефрактерного/рецидивирующего В-линейного ОЛЛ. Поводом для одобрения стали результаты II фазы клинических исследований, в которой 43 % из 189 взрослых пациентов достигли полной ремиссии. МОБ-отрицательный статус был зарегистрирован в 82 % случаев [8–11].

Блинатумомаб — моноклональное антитело с молекулярным весом 50 кДа, которое состоит из ветви анти-CD3, прикрепляется к CD3⁺ Т-клеткам и соединяется посредством линкера с ветвью анти-CD19, связывающейся с CD19⁺ В-клетками [12].

Антиген CD19 выбран в качестве целевой молекулы не случайно, это трансмембранный белок, появляющийся на ранних стадиях нормального

В-клеточного онтогенеза и сохраняющийся на всех этапах дифференцировки [13]. Его обязательное присутствие на клетках ОЛЛ В-линейной принадлежности обуславливает выбор данной детерминанты в качестве иммунотерапевтической мишени.

Несмотря на многообещающие начальные результаты лечения, некоторые пациенты не отвечают на терапию блинатумомабом или же после хорошего начального эффекта все же имеют прогрессирование заболевания. Рецидив болезни развивается в 30 % случаев [14].

При характеристике иммунофенотипа бластных клеток в рецидиве на фоне лечения блинатумомабом установлен факт отсутствия экспрессии CD19 на клетках опухоли. Это затрудняет идентификацию В-линейных предшественников и требует поиска новых методологических подходов к оценке количества клеток МОБ.

В данной статье рассматривается возможность оценки количества клеток МОБ с использованием многоцветной ПЦ у пациентов в ходе лечения блинатумомабом на примере больного с ранним рецидивом ОЛЛ (пре-пре-В иммуноподвариант).

Материалы и методы

Материалом исследования явились образцы костного мозга больного с ОЛЛ (пре-пре-В иммуноподвариант) в дебюте и рецидиве заболевания. Морфоцитохимическое исследование проводили в лаборатории гематоцитологии НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (к.м.н. И.Н. Серебрякова). Подробная иммунофенотипическая характеристика бластов выполнена в лаборатории иммунологии гемопоэза НИИ КО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (руководитель, профессор Н.Н. Тупицын) методом 8-цветной ПЦ в соответствии с протоколами консорциума EuroFlow: проба ALOT (acute leukemia orientation tube) и уточняющая панель В-линейного ОЛЛ (см. таблицу).

Мониторинг МОБ в рецидиве проводили после каждого блока противорецидивной терапии, а также по окончании курса блинатумомаба методом 8-цветной ПЦ с учетом индивидуально отобранных лейкозассоциированных иммунофенотипов.

Клиническое наблюдение

Пациент Г., 4 лет, болен ОЛЛ, L2, пре-пре-В (ВII) иммуноподвариант с июня 2015 г. С признаками

Протокол консорциума EuroFlow

№/флу- орохром	Антиген							
	FITC	PE	PerCP-су5.5	Ре-су7	APC	APC-H7	V450	V500
Проба ALOT								
1	суMPO	CD79a	CD34	CD19	CD7	SmCD3	CyCD3	CD45
Уточняющая панель В-линейного ОЛЛ								
1	CD58	CD66с	CD34	CD19	CD10	CD38	CD20	CD45
2	суIgM	CD33	CD34	CD19	CD117 + sIgM	sIg-λ	sIg-κ	CD45
3	nuTdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24	CD9	CD45
4	CD15 + CD65	NG2	CD34	CD19	CD123	CD81	CD21	CD45

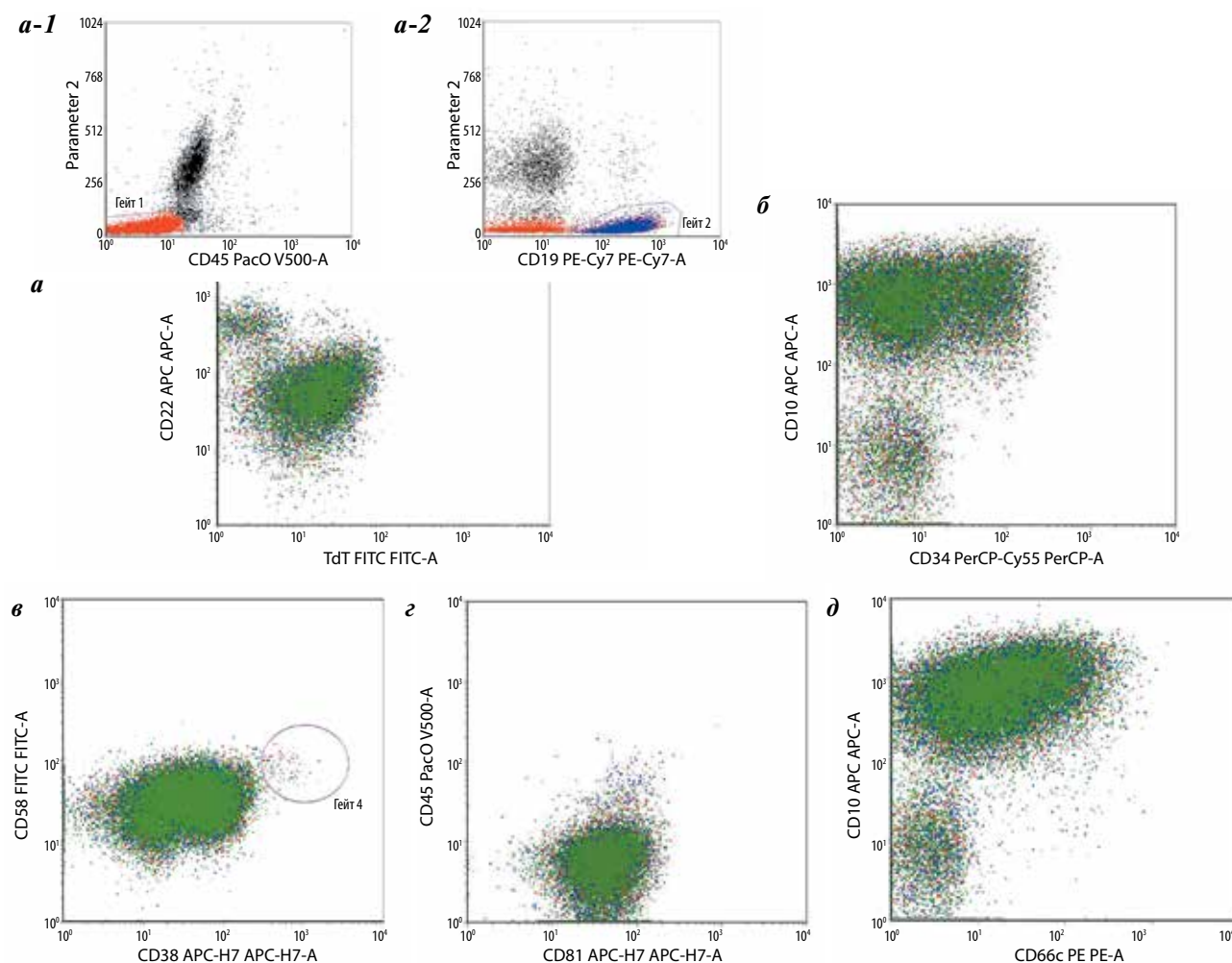


Рис. 1. Иммунофенотип бластных клеток в дебюте заболевания (пре-пре-В иммуноподвариант ОЛЛ): а – бластные клетки, выявленные на основании слабой экспрессии CD45 (цитограмма а-1; CD45 (ось x) vs SSC (ось y) – гейт 1 (красный цвет)), мономорфно экспрессирующие CD19 (цитограмма а-2; CD19 (ось x) vs SSC (ось y) – гейт 2 (синий цвет)), а также nuTdT (ось x) в сочетании со слабой экспрессией sCD22 (ось y); б – В-лимфоциты характеризуются яркой экспрессией CD10 (ось y), часть бластов CD34⁺ (CD34 – ось x); в – оценка экспрессии антигенов aberrantности CD58 (ось y) vs CD38 (ось x); при сопоставлении с остаточными нормальными В-линейными предшественниками (гейт 4) бластные клетки имеют фенотип CD58⁺CD38^{low}; г – В-лимфоциты aberrantны в отношении молекулы CD81 (ось x) vs CD45 (ось y); д – оценка экспрессии CD66c (ось x) vs CD10 (ось y), часть бластов CD66c⁺

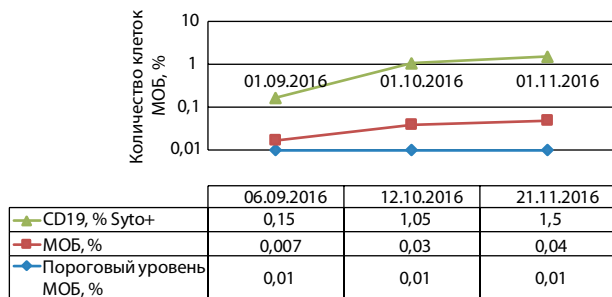


Рис. 2. Динамика уровня МОБ на фоне противорецидивной терапии

рецидива 01.08.2016 больной поступил в отделение НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, где была проведена первичная диагностика (руководитель, профессор А.В. Попа).

Бласты в дебюте заболевания характеризовались мономорфной экспрессией CD19 и ядерной TdT (piTdT) в сочетании со слабой экспрессией sCD22 (рис. 1а). Ярко экспрессировали CD10, часть бластов была CD34⁺ (рис. 1б). Обращает на себя внимание отсутствие

аберрантности по CD58 (антиген экспрессирован на уровне остаточных нормальных В-линейных предшественников) в сочетании со слабой (аберрантной) экспрессией CD38 (рис. 1в). Клетки опухоли были aberrantны в отношении молекулы CD81 (рис. 1г), что служило одним из основных критериев в дальнейшем мониторинге МОБ. Часть бластов была CD66c⁺ (рис. 1д).

В условиях отделения гематологии областной больницы в период с 17.07.2015 по 09.03.2016 было проведено лечение по протоколу ALL IC-BFM 2002 для средней группы риска. На 15-й день лечения достигнут хороший морфологический ответ – содержание бластов в миелограмме составляло <5 %. Мониторинг МОБ не выполняли. С 02.03.2016 начато проведение поддерживающей терапии.

При очередном плановом обследовании 20.07.2016 в общем анализе крови обнаружены бластные клетки – 42 %, в миелограмме – 80 %. Диагностирован рецидив заболевания. Больной госпитализирован в НИИ ДОГ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава

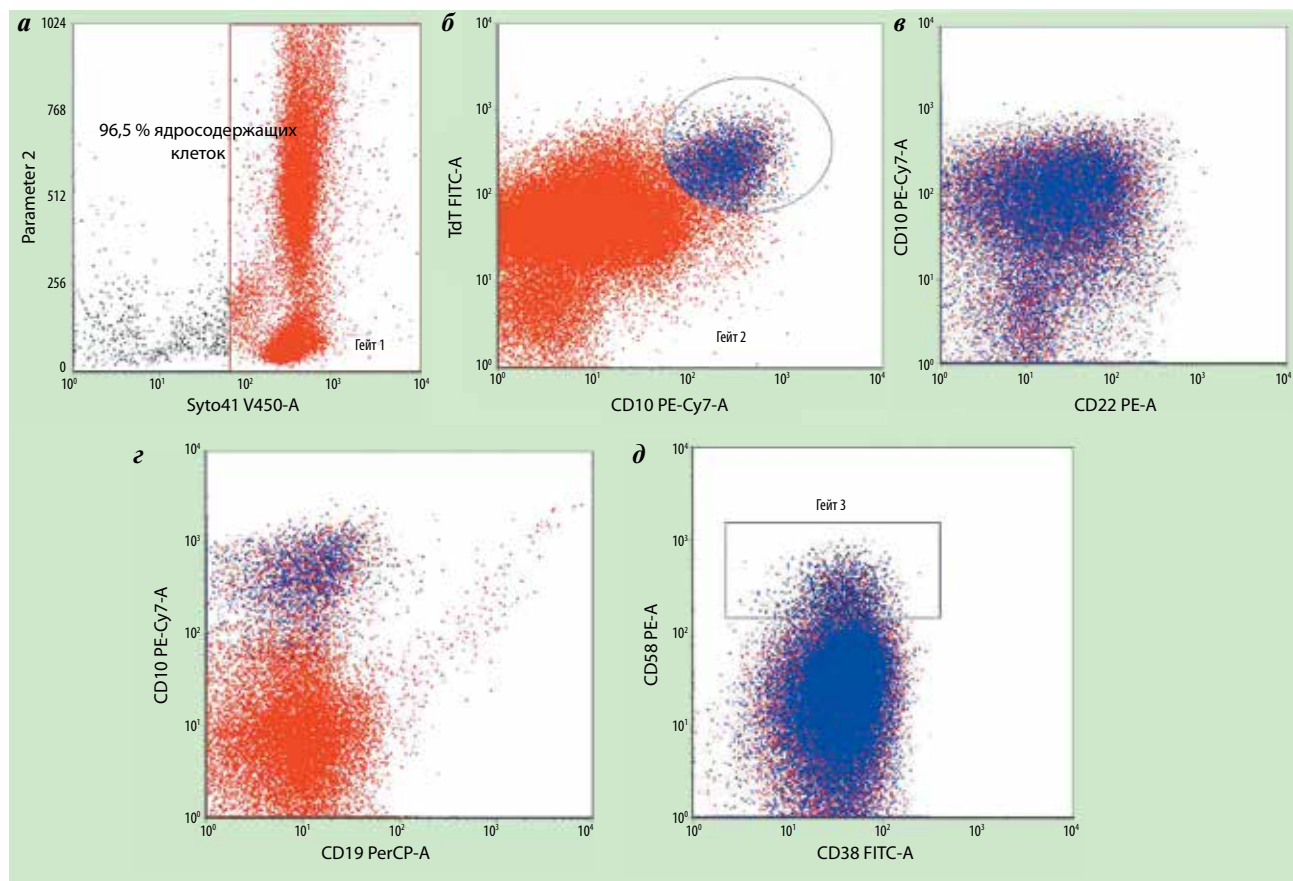


Рис. 3. Оценка МОБ по окончании курса блинатуомаба: а – количество ядросодержащих клеток составляет 96,5 % на основании экспрессии Syto41 (ось x) vs SSC (ось y) – гейт 1 (красный цвет); б – выявлено 9,4 % клеток-предшественников на основании экспрессии piTdT (ось y) vs CD10 (ось x) в пределах ядросодержащих клеток – гейт 2 (синий цвет); в – piTdT⁺CD10⁺ клетки характеризовались отчетливой экспрессией суCD22; г – экспрессия CD19 на piTdT⁺CD10⁺ клетках отсутствовала (CD19 (ось x) vs CD10 (ось y)); д – большинство В-линейных предшественников были CD58⁺CD38^{low} (CD38 (ось x) vs CD58 (ось y)); наряду с этим 0,12 % В-линейных предшественников демонстрировали фенотип CD58⁺CD38^{low} – гейт 3 (темно-синий цвет)

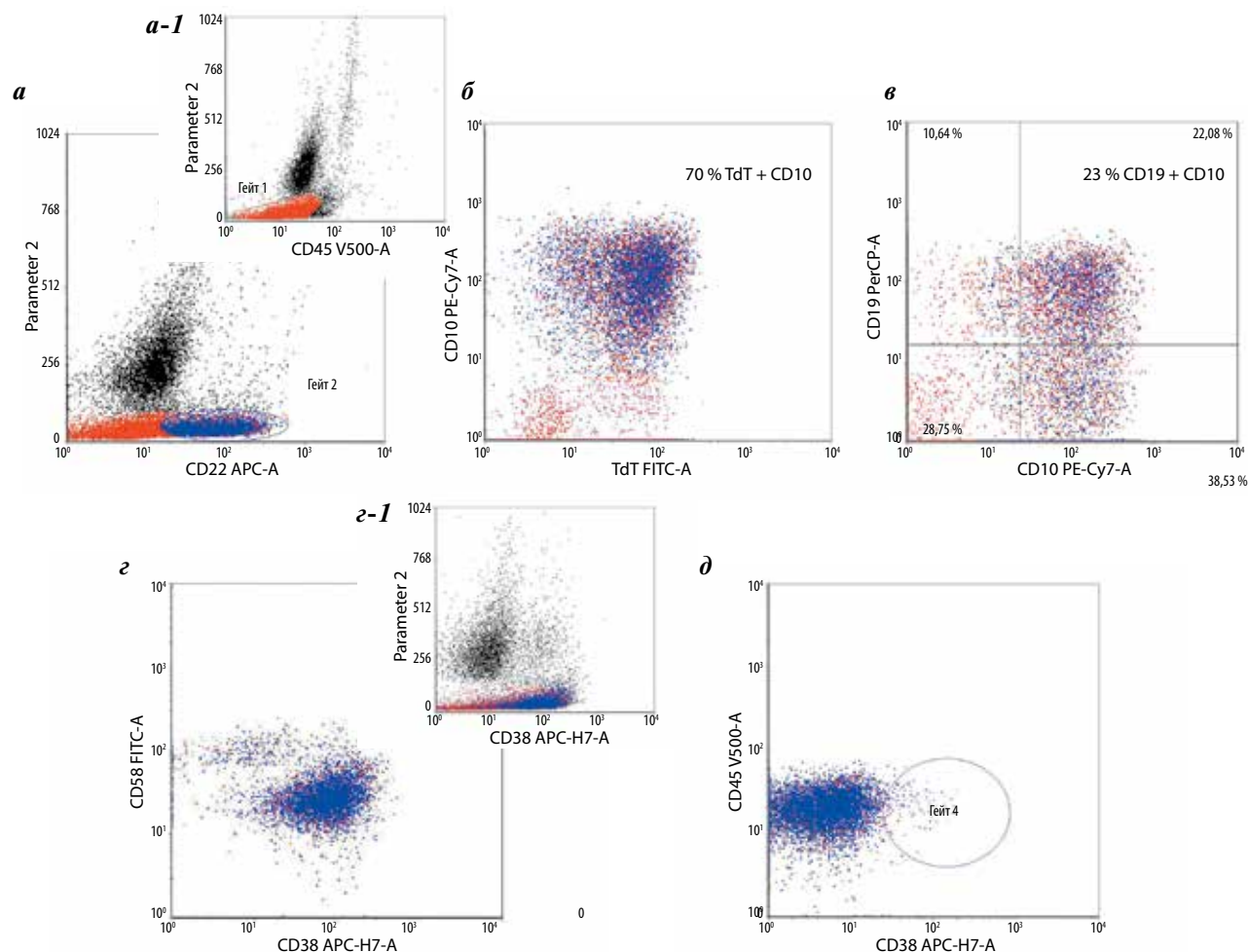


Рис. 4. Иммунофенотип опухолевых В-лимфобластов во 2-м рецидиве болезни (пре-пре-В иммуноподвариант ОЛЛ): а – бластные клетки, выявленные на основании слабой экспрессии CD45 (цитограмма а-1; CD45 (ось x) vs SSC (ось y) – гейт 1 (красный цвет)), характеризовались отчетливой экспрессией суCD22 (ось x) vs SSC (ось y) – гейт 2 (синий цвет); б – В-лимфобласты ярко экспрессировали CD10 (ось y) в сочетании с пиTdT (ось x); в – только 23 % бластов экспрессировали CD19 (CD10 (ось x) vs CD19 (ось y)); з – бластные клетки отчетливо экспрессируют антиген CD38 (ось x) в сочетании со слабой экспрессией CD58 (ось y); присутствует 4 % CD58⁺CD38^{low} клеток; д – экспрессия CD81 соответствует таковой как в дебюте, так и в рецидиве заболевания, т.е. аберрантна (CD81 (ось x) vs CD45 (ось y)) в сопоставлении с остаточными нормальными В-линейными предшественниками (гейт 4)

России. Иммунофенотип бластных клеток соответствовал таковому при первичной диагностике (CD19⁺CD10⁺суCD22⁺TdT⁺CD58⁺CD38^{low}CD81^{low}), особенностью было отсутствие экспрессии CD34.

Проведено 3 блока противорецидивной терапии. После каждого блока определяли количество клеток МОБ. Сохранялся МОБ-положительный статус (рис. 2).

Таким образом, у ребенка с ранним рецидивом ОЛЛ после 3-го курса противорецидивной терапии отмечалось в динамике нарастание количества клеток МОБ. В целях достижения МОБ-отрицательного статуса перед планируемой аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) было решено провести курс лечения блинатумомабом в режиме монотерапии с последующим контролем ответа и решением вопроса о сроках выполнения алло-ТГСК.

По окончании курса блинатумомаба (22.12.2016) состояние пациента было удовлетворительным, клинические признаки прогрессирования заболевания отсутствовали. Оценен статус МОБ. Морфологически в пунктате костного мозга выявлено 4,4 % бластов. Иммунологически, в пределах ядродержащих клеток (рис. 3а) на основании экспрессии пиTdT в сочетании с CD10 (рис. 3б) и суCD22 (рис. 3в) обнаружено 9,4 % В-линейных предшественников с закономерным отсутствием экспрессии CD19 (рис. 3г). Экспрессия маркеров аберрантности была такой же, как в дебюте и в рецидиве заболевания. Обращает на себя внимание появление популяции В-линейных предшественников с фенотипом CD58⁺CD38[–] (рис. 3д) в количестве 0,12 %. Иммунологически было высказано предположение о начале 2-го рецидива заболевания.

Спустя 2 нед развилась клиническая картина рецидива заболевания. Морфологически в пунктате костного мозга выявлено 47 % бластов. Иммунологически бласты были мономорфны по экспрессии суCD22 (рис. 4а) и nuTdT, ярко экспрессируя CD10 (рис. 4б). Экспрессия CD19 отмечалась только на части (23 %) бластов (рис. 4в). При оценке aberrантности наблюдались изменения в иммунофенотипе опухолевых клеток. Так, при сохранении отсутствия aberrантности по CD58 экспрессия CD38 стала более выраженной. Обращает на себя внимание увеличение популяции бластных клеток с фенотипом CD58⁺CD38⁻ (т.е. типичных aberrантных) до 4 % (рис. 4г). В-лимфобласты сохраняли свою aberrантность в отношении молекулы семейства тетраспона CD81 (рис. 4д).

Больному был проведен курс высокодозной химиотерапии по схеме FLA + бортезомиб, после чего принята попытка алло-ТГСК от матери.

Обсуждение

Таким образом, у больного с ранним рецидивом В-линейного ОЛЛ мониторинг МОБ был сопряжен с некоторыми трудностями. Наиболее часто используемым критерием aberrантности В-линейных предшественников при определении клеток МОБ считается гиперэкспрессия антигена CD58 в сочетании со слабой экспрессией либо отсутствием антигена CD38. Нормальные же В-линейные предшественники имеют иммунофенотип CD58⁺CD38^{low/-} [15, 16]. Однако у данного пациента aberrантность по CD58/CD38 (как в дебюте, так и в рецидиве болезни) отсутствовала, и детекция МОБ базировалась на оценке экспрессии альтернативных маркеров [3]. В данном случае были использованы антигены CD81 и CD66c.

Стандартный цитометрический протокол детекции МОБ подразумевает оценку В-линейных предшественников в гейте CD19⁺ в пределах ядросодержащих клеток [17–19]. Это невозможно в случае терапии блинатумомабом, так как на большинстве бластов антиген CD19 утрачивается [14]. По окончании курса блинатумомаба с учетом его специфичности была выбрана альтернативная стратегия выявления В-линейных предшественников. Показано, что nuTdT определяется на самых ранних этапах костномозговых В-линейных предшественников наряду с цитоплазматическими CD22 и CD79 [13], и основой детекции МОБ у данного пациента стала оценка этих маркеров в сочетании с CD10. При обращении внимания на количество В-линейных предшественников (9,4 %) и их полное соответствие первичному иммунофенотипу опухоли (CD58⁺CD38^{low}CD81^{low}) было высказано предположение о начале развития 2-го рецидива заболевания, которое позже подтвердилось.

Показано, что зачастую в рецидиве ОЛЛ на фоне блинатумомаба бластные клетки демонстрируют иммунофенотип CD19⁻ [14]. В данном случае в рецидиве заболевания после терапии блинатумомабом только 23 % бластов были CD19⁺.

Заключение

В случае назначения блинатумомаба в курсе терапии В-линейного ОЛЛ необходимо изменить стратегию поиска В-линейных предшественников ввиду отсутствия экспрессии антигена CD19. Выявление В-линейных предшественников должно основываться на оценке экспрессии других пан-В-клеточных антигенов. В первую очередь это цитоплазматические CD22 или CD79a в сочетании с экспрессией nuTdT и мембранного CD10 в пределах ядросодержащих клеток образца.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Borowitz M.J., Devidas M., Hunger S.P. et al. Clinical significance of minimal residual disease in children acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2008;111(12):5477–85. DOI: 10.1182/blood-2008-01-132837. PMID: 18388178.
- Dworzak M.N., Froschl G., Printz D. et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002;99(6):1952–8. DOI: 10.1182/blood.V99.6.1952. PMID: 11877265.
- Безнос О.А., Гривцова Л.Ю., Попа А.В. и др. Определение минимальной остаточной болезни при В-линейных острых лимфобластных лейкозах с использованием подходов EuroFlow. *Клиническая онкогематология* 2017;10(2):158–68.
- van Dongen J.J., van der Velden V.H., Brüggemann M., Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood* 2015;126(12):3996–4009. DOI: 10.1182/blood-2015-03-580027. PMID: 25999452.
- Litzow M.R. Antigen-based immunotherapy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: the emerging role of blinatumomab. *Immunotargets Ther* 2014;3:79–89. DOI: 10.2147/ITT.S37292. PMID: 27471701.
- Hoffman L.M., Gore L. Blinatumomab, a bi-specific anti-CD19/CD3 BiTE® antibody for the treatment of acute lymphoblastic leukemia: perspectives and current pediatric applications. *Front Oncol* 2014;4:63. DOI: 10.3389/fonc.2014.00063. PMID: 24744989.
- Wolach O., Stone R.M. Blinatumomab for the treatment of Philadelphia chromosome-negative, precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2015;21(19):4262–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0125. PMID: 26283683.
- Przepiorka D., Ko C.W., Deisseroth A. et al. FDA approval: Blinatumomab. *Clin*

- Cancer Res 2015;21(18):4035–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0612. PMID: 26374073.
8. Gokburget N., Zugmaier G., Klinger M. et al. Long-term relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab for the treatment of patients with minimal residual disease in B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologia* 2017;102(4):132–5. DOI: 10.3324/haematol.2016.153957. PMID: 28082340.
 9. Klinger M., Brandl C., Zugmaier G. et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 2012;119(26):6226–33. DOI: 10.1182/blood-2012-01-400515. PMID: 22592608.
 10. Topp M.S., Gökbuget N., Zugmaier G. et al. Long-term follow-up of hematologic relapse-free survival in a phase 2 study of blinatumomab in patients with MRD in B-lineage ALL. *Blood* 2012;120(26):5185–7. DOI: 10.1182/blood-2012-07-441030. PMID: 23024237.
 11. Lee K.J., Chow V., Weissman A. et al. Clinical use of blinatumomab for B-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Ther Clin Risk Manag* 2016;12:1301–10. DOI: 10.2147/TCRM.S84261. PMID: 27601914.
 12. Dworzak M.N., Fritsch G., Froschl G. et al. Four-color flow cytometric investigation of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive lymphoid precursors in pediatric bone marrow: CD79a expression precedes CD19 in early B-cell ontogeny. *Blood* 1998;92(9):3203–9. PMID: 9787156.
 13. Ruella M., Barrett D.M., Kenderian S.S. et al. Dual CD19 and CD123 targeting prevents antigen-loss relapses after CD19-directed immunotherapies. *J Clin Invest* 2016;126(10):3814–26. DOI: 10.1172/JCI87366. PMID: 27571406.
 14. Véltroni M., De Zen L., Sanzari M.C. et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B-cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *J Hematol* 2003;88(11):1245–52. PMID: 14607753.
 15. Romero-Ramirez H., Morales-Guadarrama M.T., Pelayo R. et al. CD38 expression in early B-cell precursors contributes to extracellular signal-regulated kinasemediated apoptosis. *Immunology* 2014;144(2):271–81. DOI: 10.1111/imm.12370. PMID: 25155483.
 16. Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Купрышина Н.А. и др. Оценка минимальной резидуальной болезни при острых лимфобластных лейкозах из В-линейных предшественников у детей методом трехцветной проточной цитометрии. *Иммунология гемопоэза* 2008;5(2):8–33.
 17. Гривцова Л.Ю., Попа А.В., Серебрякова И.Н., Тупицын Н.Н. К дальнейшей стандартизации определения остаточных бластных клеток в костном мозге детей с В-линейными острыми лимфобластными лейкозами на 15-й день индукционной терапии. *Иммунология гемопоэза* 2011;8(1):35–54.
 18. Гривцова Л.Ю., Тупицын Н.Н. Иммунологическая оценка гемодиллюции костного мозга при лабораторных исследованиях (на основании теста М. Локен). *Медицинский алфавит* 2015;18(259):67–70.

ПРОФИЛИ ЭКСПРЕССИИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ ПРИ ДИССЕМИНИРОВАННОМ РАКЕ ЖЕЛУДКА

Ф.М. Кипкеева¹, Т.А. Музаффарова¹, М.Н. Нариманов², О.А. Малехова², Т.А. Богущ², А.В. Карпукхин¹

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

²ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Фатима Магомедовна Кипкеева Foty_k@mail.ru

Цель исследования — изучение количественных профилей экспрессии матричной РНК потенциальных генов-мишеней при диссеминированном раке желудка (ДРЖ).

Материалы и методы. Применяли количественную полимеразную цепную реакцию в реальном времени на парных образцах опухоли — норма.

Результаты. Наиболее часто (25–41 % случаев) повышенный уровень матричной РНК в опухоли по отношению к контролю наблюдался для генов *TGF-β* (трансформирующий фактор роста β), *NRP-1* (нейропилин 1) и генов семейства *VEGF* (фактор роста эндотелия сосудов). Впервые при раке желудка обнаружена корреляция уровней экспрессии 3 генов: *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* и обратная корреляция уровней экспрессии генов *VEGF* и *bFGF* (основной фактор роста фибробластов).

Заключение. Выявленная корреляция экспрессии генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* обусловлена, видимо, взаимодействием *NRP-1* с продуктами 2 других генов и может быть связана с высоким метастатическим потенциалом прогрессирующей опухоли при ДРЖ. Обнаруженная обратная корреляция экспрессии генов *VEGF-A* и *bFGF* может свидетельствовать о стимуляции ангиогенеза в опухоли при сниженной активности пути *VEGF* через активизацию сигнального пути *bFGF*. Полученные результаты следует учитывать при таргетной терапии ДРЖ.

Ключевые слова: диссеминированный рак желудка, экспрессия генов, таргетная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-25-28

EXPRESSION PROFILES OF POTENTIAL TARGET GENES IN DISSEMINATED GASTRIC CANCER

F.M. Kipkeeva¹, T.A. Muzaffarova¹, M.N. Narimanov², O.A. Malekhova², T.A. Bogush², A.V. Karpukhin¹

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

²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Objective is the investigation of messenger RNA quantitative expression profiles of potential target genes among disseminated gastric cancer cases.

Materials and methods. Quantitative real-time polymerase chain reaction on paired tumor–normal samples.

Results. The most frequently (25–41 % of cases) an increased level of messenger RNA in the tumor with respect to normal tissue was observed for the genes of *TGF-β* (transforming growth factor β), *NRP-1* (neuropiline 1) and *VEGF* (vascular endothelial growth factor) family genes. For the first time a correlation between the expression levels of the three genes: *NRP-1*, *TGF-β* and *VEGFR-2*, and the inverse correlation of the levels of *VEGF* and *bFGF* gene expression were found.

Conclusion. The revealed correlation between the expression of *TGF-β*, *NRP-1* and *VEGFR-2* genes is apparently due to the interaction of *NRP-1* with the products of two other genes and may be associated with a high metastatic potential of the progressing tumor in disseminated gastric cancer. The observed inverse correlation of the *VEGF-A* and *bFGF* gene expression may indicate the stimulation of angiogenesis in the tumor with reduced activity of the *VEGF* pathway by activating the *bFGF* signaling pathway. The results obtained should be taken into account under targeted therapy.

Key words: disseminated gastric cancer, gene expression, targeted therapy

Рак желудка (РЖ) занимает 4-е место по заболеваемости и 2-е место по смертности среди всех онкологических заболеваний в мире. В настоящее время 5-летняя выживаемость среди пациентов

с РЖ составляет только 20–30 % [1]. Из числа ежегодно диагностированных больных в 85 % случаев сразу или в течение 2–3 лет заболевание переходит в метастатический этап. При диссеминированном

РЖ (ДРЖ) применяют комбинированные схемы химиотерапии, включающие 5-фторурацил, производные платины, таксаны и препараты таргетной терапии [2].

Таргетные препараты назначаются в составе комплексной терапии и с учетом механизма их действия эффективны только в том случае, если экспрессируется мишень, на которую они могут воздействовать. В связи с этим существенна информация о частотах экспрессии потенциальных генов-мишеней таргетной терапии, а также о характеристиках, позволяющих судить о возможной координации их действия.

Материалы и методы

У каждого больного, включенного в исследование, были взяты парные образцы нормальной и опухолевой тканей желудка. Забор материала проводили при биопсии или во время операции пациентов, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В исследование вошли 30 больных ДРЖ в возрасте 29–87 лет до начала терапии. Все образцы охарактеризованы гистологически. Основное число образцов опухолевой ткани представлено аденокарциномой. Всем больным была назначена комбинированная химиотерапия. Препараты таргетной терапии (трастузумаб) были включены в схему лечения 4 пациентам, таксаны – 8.

Методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) в парных образцах опухоль – норма изучали уровни экспрессии матричной РНК (мРНК) генов *VEGF* (фактор роста эндотелия сосудов), *VEGFR-1*, *VEGFR-2* (рецепторы фактора роста эндотелия сосудов 1 и 2), *NRP-1* (нейропинин 1), *bFGF* (основной фактор роста фибробластов), *FGFR-2* (рецептор факторов роста фибробластов 2), *TGF-β* (трансформирующий ростовой фактор β), *HER-2/neu* (рецептор эпидермального фактора роста 2), *TUBB-3* (β-тубулин 3-го класса), *BRCA-1* (breast cancer 1), *Ki-67* и *PCNA* (ядерный антиген пролиферирующих клеток).

Из каждой пары образцов выделяли суммарную фракцию РНК. Для выделения РНК использовали набор RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Обратную транскрипцию проводили с применением набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, США). ПЦР-РВ осуществляли на приборе Step One Plus (Applied Biosystems, США). Каждое измерение выполняли 3-кратно. ПЦР-РВ проводили с помощью наборов TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Для анализа полученных результатов применяли встроенную программу Applied Biosystems Step One Plus. В качестве контроля использовали ген *GAPDH*.

В результате обработки измерений получены значения уровней экспрессии генов в опухолевой ткани относительно нормальной. Повышенным или пониженным считали уровень экспрессии гена в опухоли, отличающийся в 2 раза и более от экспрессии в нормальной ткани. Статистический анализ данных проводили с помощью пакета стандартных программ Statistica 10.0 (StatSoft, США). Корреляции оценивали по методу Спирмена. Для определения ассоциации молекулярного признака с клиническими характеристиками или сравнения частот 2 молекулярных признаков использовали точный критерий Фишера. Значимыми считали различия между группами или значения коэффициентов корреляции при любом уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Чаше повышенный уровень мРНК в опухоли по отношению к контролю наблюдался для генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* (рис. 1). Доля больных в выборке с повышенным уровнем экспрессии *TGF-β* составила 41 %, *NRP-1* и *VEGFR-2* – 32 %. *TGF-β* на поздних стадиях развития опухоли является онкогеном. Он усиливает инвазивный потенциал опухоли и участвует в ангиогенезе. Высокий уровень экспрессии *TGF-β* связан с неблагоприятным прогнозом при гастроинтестинальных раках [3]. *NRP-1* взаимодействует с ключевыми сигнальными путями, которые задействованы в инициации, развитии и метастазировании раковых клеток [4]. Он выступает в качестве многофункционального корецептора, связываясь и модулируя активность различных лигандов, в том числе *TGF-β* [5].

Нами была обнаружена корреляция уровней экспрессии *TGF-β* и *NRP-1* (коэффициент корреляции $R = 0,63$; $p = 0,0017$; рис. 2). Экспрессия обоих этих генов коррелирует также с экспрессией гена *VEGFR-2* ($R = 0,66$; $p = 0,01$ и $R = 0,68$; $p = 0,0012$ соответственно). Продукты генов *VEGFR-2* и *NRP-1* способны взаимодействовать между собой, поскольку *NRP-1* действует как корецептор *VEGF*-рецепторов. Клеточная миграция, направление роста и ветвление

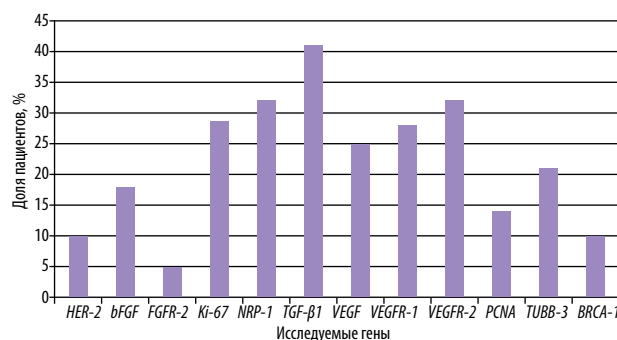


Рис. 1. Доля больных с повышенной экспрессией исследуемых генов в опухоли при ДРЖ

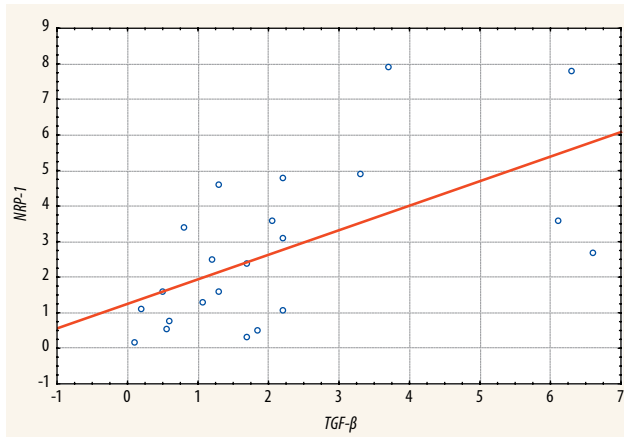


Рис. 2. Корреляция уровней экспрессии генов *NRP-1* и *TGF-β*

кровеносных сосудов опосредуются комплексом *VEGFR-2* и его корецептором *NRP-1* [6].

Видимо, впервые обнаруженная координация экспрессии генов *TGF-β*, *NRP-1* и *VEGFR-2* обусловлена взаимодействием *NRP-1* с продуктами 2 других генов и связана с высоким метастатическим потенциалом прогрессирующей опухоли при ДРЖ. Полученные результаты указывают на актуальность завершения разработки таргетных препаратов для *TGF-β* и *NRP-1*. Их применение для комплексного ингибирования 3 генов (ингибиторы *VEGFR-2* имеются) может привести к наилучшим результатам при лечении ДРЖ.

VEGF-A — ключевой медиатор физиологического и патологического ангиогенеза, одна из основных мишеней антиангиогенной терапии. *VEGF-A* опосредует свои эффекты путем связывания с рецепторами эндотелиальных клеток. Еще одним регулятором ангиогенеза является *bFGF*. Имеются данные о том, что одновременная экспрессия *VEGF* и *bFGF* приводит к активному росту опухоли с высокой плотностью и проходимостью сосудов [7].

В то же время нами впервые на образцах опухолевой ткани больных ДРЖ была обнаружена обратная зависимость экспрессии генов *VEGF-A* и *bFGF* ($R = -0,73$; $p = 0,0046$). Это согласуется с версией о том, что aberrантная экспрессия *bFGF* является компенсаторным механизмом, позволяющим опухоли сохранить ее микроциркуляторный гомеостаз, и рассматривается как потенциальная причина устойчивости к анти-*VEGF*-терапии [8]. В этом случае применение бевацизумаба в качестве антиангиогенной терапии может быть недостаточно, и следует обратить внимание на блокирование других путей, которые поддерживают ангиогенез опухоли.

В исследовании, проводившемся на культуре клеток сосудистого эндотелия рака толстой кишки *in vitro*, было получено, что при повышении уровня экспрессии *VEGF* экспрессия *bFGF* понижалась, и, наоборот,

при подавлении *VEGF* бевацизумабом активировался *bFGF*-сигнальный путь [9]. Возможно, что обнаруженный нами феномен присущ не только ДРЖ.

Ген *FGFR-2* относится к членам семейства рецепторов факторов роста фибробластов. Повышение уровня экспрессии *FGFR-2* связано с пролиферацией опухолевых клеток и неблагоприятным прогнозом для пациентов с ДРЖ [10]. В нашем исследовании частота повышенной экспрессии *FGFR-2* составила 5 %, что согласуется с изученной в других работах частотой его амплификации при РЖ [11]. Тем не менее этот ген рассматривается в качестве мишени для таргетных препаратов, продемонстрировавших выраженный и продолжительный эффект на моделях ксенотрансплантата РЖ с повышенной амплификацией *FGFR-2* [12].

Одной из популярных мишеней является *HER-2*. Включение трастузумаба в схему лечения пациентов с РЖ, у которых наблюдалась гиперэкспрессия *HER-2*, позволило увеличить их общую выживаемость [13]. В нашем исследовании в случаях повышенной экспрессии гена *HER-2* был также отмечен объективный эффект терапии, включающей трастузумаб. Это указывает в пользу возможности использования оценки уровня мРНК гена *HER-2* в качестве предиктивного маркера при ДРЖ.

В настоящее время нет единого мнения относительно влияния уровня экспрессии *TUBB-3* на чувствительность опухолевых клеток к терапии ингибиторами митоза. В нашем исследовании продолжительность жизни больных с повышенным уровнем экспрессии *TUBB-3*, в схему лечения которых были включены таксаны, оказалась выше, чем у пациентов с низким уровнем экспрессии этого гена, и составила 1 год и более ($p = 0,036$). Сравнение кривых выживаемости по *log-rank*-тесту также показало значимые различия ($p = 0,004$).

Примечательно, что повышенный уровень экспрессии гена *BRCA-1* наблюдался только в образцах опухолевой ткани с повышенной экспрессией *TUBB-3*. Это совпадение неслучайно ($p = 0,003$). Как известно, *BRCA-1* функционирует не только как ген репарации повреждений ДНК, но и принимает участие в процессе митоза. В связи с этим следует отметить данные, продемонстрировавшие высокую чувствительность клеточных линий к таксанам при индуцированной экспрессии *BRCA-1* [14]. Можно предположить совместное действие генов *BRCA-1* и *TUBB-3* по увеличению чувствительности ДРЖ к таксанам.

Уровни экспрессии генов *Ki-67* и *PCNA* не продемонстрировали связи с какими-либо клиническими характеристиками на исследованной выборке ДРЖ. Интересно только совпадение случаев повышенной экспрессии гена *PCNA* с повышенной экспрессией *Ki-67*.

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

1. Terry M.B., Gaudet M.M., Gammon M.D. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol* 2002;12(2):111–27. DOI: 10.1053/srao.30814. PMID: 11979413.
2. Когония Л.М., Корнилова А.Г. Метастатический рак желудка: новое в лекарственной терапии. *Альманах клинической медицины* 2013;29: 65–70. DOI: <http://dx.doi.org/10.18786/2072-0505-2013-29-65-70>.
3. Katz L.H., Likhter M., Jogunoori W. et al. TGF- β signaling in liver and gastrointestinal cancers. *Cancer Lett* 2016;379(2):166–72. DOI: 10.1016/j.canlet.2016.03.033. PMID: 27039259.
4. Li L., Jiang X., Zhang Q. et al. Neuropilin-1 is associated with clinicopathology of gastric cancer and contributes to cell proliferation and migration as multifunctional co-receptors. *J Exp Clin Cancer Res* 2016;35:16. DOI: 10.1186/s13046-016-0291-5. PMID: 26795388.
5. Prud'homme G.J., Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 2012;3(9):921–39. DOI: 10.18632/oncotarget.626. PMID: 22948112.
6. Djordjevic S., Driscoll P.C. Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor. *Drug Discovery Today* 2013;18(9–10):447–55. DOI: 10.1016/j.drudis.2012.11.013. PMID: 23228652.
7. Korc M., Friesel R.E. The role of fibroblast growth factors in tumor growth. *Curr Cancer Drug Targets* 2009;9(5):639–51. PMID: 19508171.
8. Lieu C., Heymach J., Overman M. et al. Beyond VEGF: inhibition of the fibroblast growth factor pathway and antiangiogenesis. *Clin Cancer Res* 2011;17(19):6130–9. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0659. PMID: 21953501.
9. Zhao M., Yu Z., Li Z. et al. Expression of angiogenic growth factors VEGF, bFGF and ANG1 in colon cancer after bevacizumab treatment *in vitro*: a potential self-regulating mechanism. *Oncol Rep* 2017;37(1):601–7. DOI: 10.3892/or.2016.5231. PMID: 27840995.
10. Kilgour E., Su X., Zhan P. et al. Prevalence and prognostic significance of FGF receptor 2 (FGFR2) gene amplification in Caucasian and Korean gastric cancer cohorts. *J Clin Oncol* 2012;30(suppl; abstr 4124).
11. Park Y.S., Na Y.S., Ryu M.H. et al. FGFR2 assessment in gastric cancer using quantitative real-time polymerase chain reaction, fluorescent *in situ* hybridization, and immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 2015;143(6): 865–72. DOI: 10.1309/AJCPNFLSM-WWPP8DR. PMID: 25972329.
12. Xie L., Su X., Zhang L. et al. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res* 2013;19(9):2572–83. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3898. PMID: 23493349.
13. Bang Y.J., Van Cutsem E., Feyereislova A. et al. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER-2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2010;376(9742):687–97. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X. PMID: 20728210.
14. Mullan P.B., Quinn J.E., Gilmore P.M. et al. BRCA1 and GADD45 mediated G2/M cell cycle arrest in response to antimicrotubule agents. *Oncogene* 2001;20(43):6123–31. DOI: 10.1038/sj.onc.1204712. PMID: 11593420.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА КОЭКСПРЕССИИ ЦИТОКЕРАТИНОВ И МАРКЕРА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ВИМЕНТИНА В ТКАНИ СЕРОЗНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Т.А. Богуш¹, А.А. Арефьева^{1,2}, С.А. Калюжный¹, Е.А. Богуш¹,
С.А. Тюляндин¹, Б.Е. Полоцкий¹, М.М. Давыдов¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские Горы, 1

Контакты: Анастасия Алексеевна Арефьева labmedchem@mail.ru

Введение. Эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) — фактор, связанный с метастатическим потенциалом опухолевых клеток. Отличительным признаком данной трансформации является, в частности, экспрессия несвойственного для эпителиальных клеток белка мезенхимальных клеток — виментина. Данные об уровне ЭМП и клинической значимости маркера в прогнозе опухолей различных локализаций, в том числе рака яичников, неоднозначны.

Цель исследования — характеристика ЭМП в ткани рака яичников на основании количественной оценки уровня коэкспрессии эпителиальных цитокератинов и маркера мезенхимальных клеток виментина.

Материалы и методы. Количественная оценка уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина проведена при последовательном (двойном) иммунофлуоресцентном окрашивании клеток, полученных из 58 хирургических образцов серозного рака яичников III стадии, с использованием проточной цитофлуориметрии.

Результаты. В настоящем исследовании разработан и использован оригинальный метод двойного иммунофлуоресцентного окрашивания, позволяющий количественно оценить уровень ЭМП по показателю коэкспрессии в эпителиальных клетках цитокератинов и виментина. Эпителиальные клетки, коэкспрессирующие эти маркеры, выявлены в 100 % исследованных опухолей при индивидуальных различиях показателя от 10 до 86 %. Средний уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина в подгруппах с уровнем показателя выше и ниже медианы, равной 42 %, различался значительно и составил соответственно $28,5 \pm 7,5$ и $56,3 \pm 11,8$ % ($p = 0,02$).

Заключение. Серозный рак яичников III стадии представляет молекулярно неоднородную группу злокачественных новообразований с принципиальными отличиями в уровне экспрессии фенотипа ЭМП в опухолях разных больных. В половине случаев заболевание характеризуется высоким метастатическим потенциалом опухолевых клеток. Выявление клеток, коэкспрессирующих цитокератин и виментин, во всех исследованных опухолях указывает на значимость этой молекулярной характеристики в патогенезе рака яичников.

Ключевые слова: рак яичников, эпителиально-мезенхимальный переход, виментин, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-29-33

QUANTITATIVE ASSESSMENT OF COEXPRESSION OF CYTOKERATINS AND MESENCHYMAL CELLS MARKER VIMENTIN IN SEROUS OVARIAN CANCER

T.A. Bogush¹, A.A. Arefieva^{1,2}, S.A. Kaliuzhny¹, E.A. Bogush¹, S.A. Tjulandin¹, B.E. Polotsky¹, M.M. Davydov¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is a factor related to metastatic potential of tumor cells. The most distinguishing feature of this transformation is expression of protein vimentin, which is not common for epithelial cells. Data of EMT level and clinical significance of the marker is ambiguous in prognosis of tumor different localization including ovarian cancer.

Objective is characterization of EMT in ovarian cancer tissue based on quantitative analysis of co-expression level of epithelial cytokeratins and mesenchymal cells marker vimentin.

Materials and methods. A quantitative assessment of co-expression level of cytokeratins and vimentin was performed by double immunofluorescence staining method (58 surgery specimens of ovarian cancer stage III), associated with flow cytometry.

Results. Double immunofluorescence staining method, developed and used in the current study, was used for quantitative assessment of EMT level based on value of cytokeratin and vimentin co-expression in epithelial cells. Epithelial cells co-expressed these markers, were detected in 100 % tumor investigated with individual value differences from 10 to 86 %. Average co-expression level of cytokeratins and vimentin in subgroups with high and low level value related to median 42 % significantly varied and were $28,5 \pm 7,5$ and $56,3 \pm 11,8$ % ($p = 0,02$) respectively.

Conclusions. *Serous ovarian cancer is molecular heterogeneous group with principal differences in level of EMT tumor phenotype between various patients. In half of the cases the disease is characterized by high metastatic potential of tumor cells. Co-expression of cytokeratins and vimentin in all the tumors investigated is evidenced clinical significance of this molecular characteristic in ovarian cancer pathogenesis.*

Key words: *ovarian cancer, epithelial-mesenchymal transition, vimentin, flow cytometry*

Введение

В патогенез эпителиальных солидных опухолей различных локализаций, в том числе серозного рака яичников, вовлечен процесс эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), в результате которого эпителиальные клетки утрачивают присущие им свойства (межклеточную адгезию и апикально-базальную полярность) и приобретают особенности мезенхимальных клеток (веретеновидную форму, подвижность) [1]. Данная трансформация является фактором, связанным с метастатическим потенциалом опухолевых клеток и повышающим, таким образом, агрессивность течения заболевания. Отличительные признаки ЭМП — утрата специфических для эпителиальных клеток белков и появление неспецифического маркера — белка виментина, экспрессия которого характерна для тканей, происходящих из мезенхимных клеток.

В настоящее время процесс ЭМП в ткани рака яичников хорошо изучен на культурах клеток *in vitro*. В публикациях последних лет показано, что такая трансформация выявляется также и в опухолевой ткани больных раком яичников [2, 3]. Однако данные о прогностической значимости уровня ЭМП в опухоли, в частности при использовании в качестве маркера показателей экспрессии специфического мезенхимального белка виментина, в настоящее время неоднозначны. В ряде работ обнаружена корреляция с клинически значимыми параметрами, характеризующими агрессивность течения болезни [4, 5], в других исследованиях такая зависимость не выявлена [6].

С учетом неопределенности в оценке клинической значимости уровня ЭМП и в выборе его оптимального маркера в настоящем исследовании проведена оценка этой важнейшей характеристики ткани рака яичников на основании количественного показателя уровня коэкспрессии мезенхимального белка виментина в клетках, экспрессирующих эпителиальные цитокератины.

Материалы и методы

Работа проведена на клетках первичного серозного рака яичников III стадии, полученных из хирургических биопсийных образцов опухоли 58 больных. Возраст пациенток составил 34–72 ($54,0 \pm 9,1$) года.

Проведен количественный иммунофлуоресцентный анализ, ассоциированный с проточной цитофлуориметрией, с использованием разработанной ранее методики [7]. Одноклеточные суспензии клеток рака яичников инкубировали последовательно с моноклональными антителами к цитокератинам 5, 6, 8, 17 и 19 (клон MNF116), затем 1 ч с антителами к виментину (клон SP20) в конечном разведении 1:200 для каждого из антител, далее в течение 1,5 ч с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями DyLight488 (ab96899) и DyLight650 (ab96899) в конечном разведении 1:120 и 1:1000 соответственно. Для исключения из анализа клеточных обломков и эритроцитов после окрашивания вторичными антителами клетки инкубировали с красителем ДНК Hoechst 33258 в течение 15 мин в концентрации 1,2 мкг/мл.

Уровень коэкспрессии виментина и цитокератинов определяли как отношение (%) количества клеток, коэкспрессирующих оба маркера, к общему количеству опухолевых клеток, экспрессирующих цитокератины. Высокий и низкий уровни коэкспрессии маркеров оценивали относительно (соответственно выше и ниже) медианы показателя, рассчитанного для всей группы исследованных образцов опухолей.

Флуоресценцию клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Количество окрашенных клеток рассчитывали в программе FlowJo 10.0 с помощью метода Колмогорова–Смирнова. Точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции визуализировали с применением программы WinMDI 2.9. Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, США). Оценку статистической значимости различий между 2 выборками выполняли с помощью параметрического t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни, нормальность распределения — с использованием критерия Шапиро–Уилка.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования был разработан методический подход, который позволил провести оценку уровня ЭМП по количеству эпителиальных клеток с экспрессией специфических цитокератинов, коэкспрессирующих мезенхимальный маркер вимен-

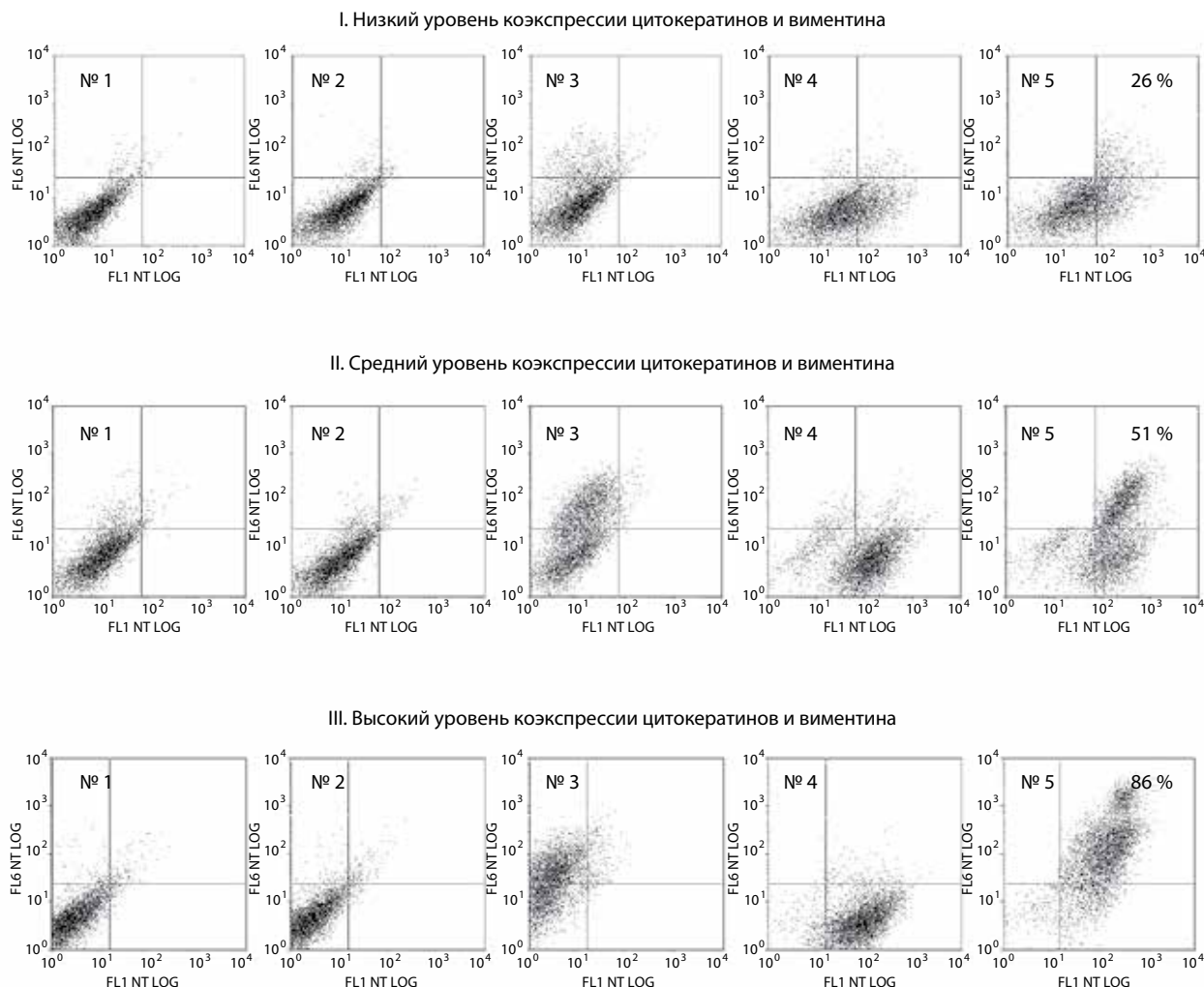


Рис. 1. Результаты последовательного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к виментину и цитокератинам (двойное флуоресцентное окрашивание). По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в канале FL-1 для цитокератинов. По оси ординат — интенсивность флуоресценции в канале FL-6 для виментина. Представлены точечные диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: № 1 — автофлуоресценция (левый нижний квадрант); № 2 — инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (левый нижний квадрант); № 3 — клетки, экспрессирующие виментин (левый верхний квадрант); № 4 — клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант); № 5 — клетки, экспрессирующие цитокератины (правый нижний квадрант) и коэкспрессирующие цитокератины и виментин (правый верхний квадрант)

тин. Примеры точечных диаграмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре представлены на рис. 1. Во всех случаях диаграммы № 1 демонстрируют автофлуоресценцию исследуемых клеток, которая может различаться в разных опухолях (левый нижний квадрант). Диаграммы № 2 показывают изменение исходной автофлуоресценции клеток после их инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем, в результате неспецифических взаимодействий вторичных антител с клетками (левый нижний квадрант). Этот анализ проводят для дальнейшей точной диспозиции областей размещения клеток, специфически окрашенных антителами к виментину (левый верхний квадрант, диаграммы № 3)

или к цитокератинам (правый нижний квадрант, диаграммы № 4). При последовательном окрашивании этими антителами клеток одной и той же клеточной суспензии (двойное флуоресцентное окрашивание, диаграммы № 5) в правом нижнем квадранте по-прежнему локализуются эпителиальные цитокератинположительные клетки, а в верхнем левом — виментинположительные, при этом в правом верхнем квадранте локализуются эпителиальные цитокератинположительные клетки, коэкспрессирующие виментин. Их доля в общем количестве эпителиальных клеток, включенных в анализ, характеризует уровень ЭМП в исследуемой опухоли.

Данные, представленные на рис. 1, демонстрируют примеры опухолей, различающихся по уровню

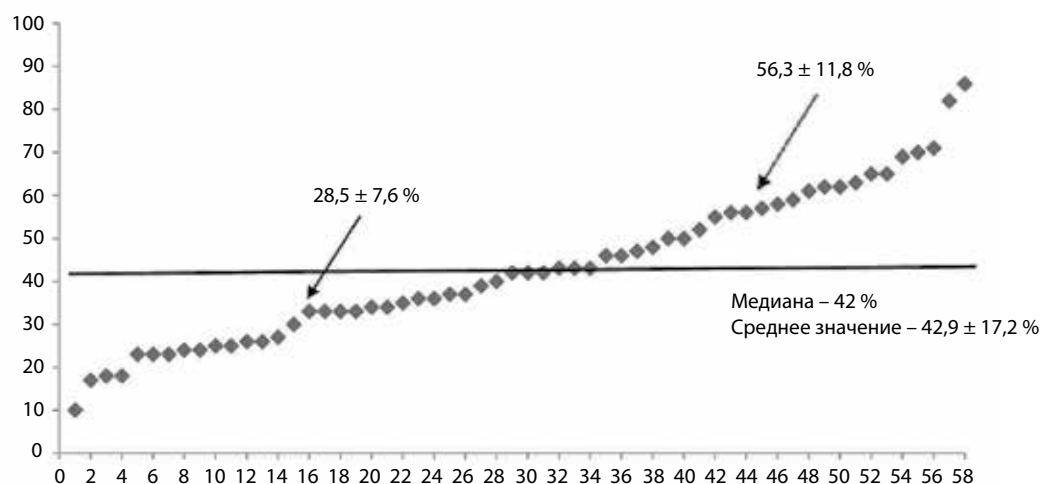


Рис. 2. Уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина в клетках серозного рака яичников. По оси абсцисс — номера образцов опухолей, включенных в анализ, которые ранжированы от минимального до максимального значения уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина (%). По оси ординат — уровень коэкспрессии цитокератинов и виментина (%). Сплошная горизонтальная линия — медиана показателя; цифры на рисунке — средние значения показателя $\pm$ стандартное отклонение в группах опухолей ниже и выше медианы

ЭМП. Это опухоли с низким (26 %), средним (51 %) и высоким (86 %) уровнями коэкспрессии цитокератинов и виментина.

Результаты анализа точечных диаграмм, полученных при двойном окрашивании антителами к цитокератинам и виментину опухолевых клеток, полученных из 58 образцов рака яичников, представлены на рис. 2. Количественные показатели уровня коэкспрессии маркеров ранжированы от минимального к максимальному значению.

Необходимо отметить, что эпителиальные клетки, коэкспрессирующие цитокератины и виментин, выявлены во всех исследованных образцах опухолей, однако по индивидуальным показателям уровня коэкспрессии маркеров опухоли различались значительно — от 10 до 86 %. Этот факт подтверждается рассчитанным коэффициентом вариации показателя, который равен 40 % (выборка рассматривается как неоднородная, если коэффициент вариации ≥ 33 %). При анализе результатов с помощью критерия Шапиро–Уилка продемонстрировано, что распределение показателей уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина, т.е. уровня ЭМП, в исследованной когорте опухолей соответствовало нормальному, при этом медиана значений показателя составила 42 % (горизонтальная сплошная линия на рис. 2). Среднее значение уровня ЭМП ожидалось близким и составило $42,9 \pm 17,2$ %.

Согласно современным представлениям в клинических исследованиях низкий и высокий уровни экспрессии того или иного молекулярного маркера определяют относительно медианы показателя. В данном случае границей явилась медиана уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина, равная

42 %. Индивидуальные различия показателя внутри подгрупп ниже и выше медианы были существенными: от 10 до 42 % и от 42 до 86 % соответственно. Средний уровень коэкспрессии маркеров в этих подгруппах различался значительно (в 2 раза) и составил соответственно $28,5 \pm 7,5$ и $56,3 \pm 11,8$ % ($p = 0,02$). Иными словами, серозный рак яичников представляет молекулярно неоднородную группу злокачественных новообразований с принципиальными отличиями фенотипа метастатического потенциала опухолей у разных больных.

Заключение

При использовании разработанного авторами иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, который позволяет проведение количественной оценки коэкспрессии мезенхимального белка виментина в эпителиальных клетках, экспрессирующих цитокератины, получены следующие результаты.

Фенотип ЭМП обнаружен во всех исследованных образцах рака яичников, при этом его уровень различался значительно, варьировал от 10 (близко к значению чувствительности метода) до 86 %.

Согласно выявленному показателю медианы уровня коэкспрессии цитокератинов и виментина высокий (≥ 42 %) уровень ЭМП отмечен в 52 % исследованных случаев рака яичников. Другими словами, в половине случаев в III стадии заболевания серозный рак яичников характеризуется высоким метастатическим потенциалом. Более того, тот факт, что клетки, коэкспрессирующие цитокератины и виментин, были обнаружены во всех исследованных образцах опухолей, указывает на патогенетическую

значимость этой характеристики серозного рака яичника.

С учетом проспективного характера проведенного исследования считаем чрезвычайно важным выполнение дальнейшего анализа корреляции выявленных количественных показателей ЭМП

с продолжительностью безрецидивного течения рака яичников после завершения 1-й линии стандартной химиотерапии с включением препаратов платины и таксанов. Всем пациенткам, которые вошли в настоящее исследование, проведено такое лечение.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 15-04-06 991-а, 16-34-01 049-мол-а).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kenda Suster N., Smrkolj S., Virant-Klun I. Putative stem cells and epithelial-mesenchymal transition revealed in sections of ovarian tumor in patients with serous ovarian carcinoma using immunohistochemistry for vimentin and pluripotency-related markers. *J Ovarian Res* 2017;10(1):11. DOI: 10.1186/s13048-017-0306-7. PMID: 28231820.
2. Despierre E., Vergote I., Anderson R. et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) pathway biomarkers in the randomized phase III trial of Erlotinib versus observation in ovarian cancer patients with No evidence of disease progression after first-line platinum-based chemotherapy. *Target Oncol* 2015;10(4):583–96. DOI: 10.1007/s11523-015-0369-6. PMID: 26004768.
3. Li X., Yang J., Wang X. et al. Role of TWIST2, E-cadherin and Vimentin in epithelial ovarian carcinogenesis and prognosis and their interaction in cancer progression. *Eur J Gynaecol Oncol* 2016;37(1):100–8. PMID: 27048119.
4. Davidson B., Holth A., Hellesylt E. et al. The clinical role of epithelial-mesenchymal transition and stem cell markers in advanced-stage ovarian serous carcinoma effusions. *Hum Pathol* 2015;46(1):1–8. DOI: 10.1016/j.humpath.2014.10.004. PMID: 25455994.
5. Wu D.I., Liu L., Ren C. et al. Epithelial-mesenchymal interconversions and the regulatory function of the ZEB family during the development and progression of ovarian cancer. *Oncol Lett* 2016;11(2):1463–8. PMID: 26893761.
6. Vos M.C., Hollemans E., Ezendam N. et al. MMP-14 and CD44 in Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in ovarian cancer. *J Ovarian Res* 2016;9(1):53. DOI: 10.1186/s13048-016-0262-7. PMID: 27590006.
7. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов β в солидных опухолях человека. *Вестник Московского университета* 2011;52(4):305–12.

КОЭКСПРЕССИЯ ЭСТРОГЕНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ АЛЬФА И БЕТА В ТКАНИ СЕРОЗНОГО РАКА ЯИЧНИКОВ

Т.А. Богущ¹, А.А. Башарина^{1,2}, Е.А. Богущ¹, А.С. Тюляндина¹, С.А. Тюляндин¹, М.М. Давыдов¹

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»;
Россия, 119991 Москва, ул. Ленинские Горы, 1

Контакты: Анна Александровна Башарина labmedchem@mail.ru

Введение. В последние годы возродился интерес к гормональному лечению рака яичников, в связи с чем возник ряд фундаментальных вопросов, связанных с экспрессией в опухолях этой локализации эстрогеновых рецепторов (estrogen receptors, ER) альфа и бета (ER α и ER β).

Цель исследования — ответить на вопросы, каковы частота и уровень экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников и возможна ли коэкспрессия ER α и ER β в разных и/или в одних и тех же клетках новообразования.

Материалы и методы. Проведена сравнительная количественная оценка частоты и уровня экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников (суммарно 20 образцов) с использованием иммунофлуоресцентного метода и проточной цитофлуориметрии, включая разработанный авторами метод двойного флуоресцентного окрашивания.

Результаты. Экспрессия ER β выявлена во всех образцах рака яичников, при этом встречались как ER α ⁺-, так и ER α ⁻-опухоли. В большинстве (69 %) ER α ⁺-опухолей наблюдался низкий (<40 %) уровень экспрессии ER α . Более того, при исследовании опухолей с высоким уровнем экспрессии как ER α , так и ER β выявлена коэкспрессия данных маркеров в одних и тех же клетках исследованных опухолей.

Заключение. В ткани рака яичников ER разных типов — ER α и ER β — могут экспрессироваться в разных опухолевых клетках, а также коэкспрессироваться как в разных, так и в одних и тех же клетках новообразования.

Ключевые слова: рак яичников, эстрогеновые рецепторы альфа, эстрогеновые рецепторы бета, проточная цитофлуориметрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-34-37

COEXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTORS ALPHA AND BETA IN SEROUS OVARIAN CANCER

T.A. Bogush¹, A.A. Basharina^{1,2}, E.A. Bogush¹, A.S. Tyulyandina¹, S.A. Tyulyandin¹, M.M. Davydov¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. In recent years, interest in hormonal treatment of ovarian cancer has revived and a number of fundamental questions associated with the expression in these tumors of different types of estrogen receptors (ER) — ER α and ER β — have arisen.

Objective: to answer the questions, what is the frequency and level of expression of ER α and ER β in the tissue of ovarian cancer and is it possible co-expression of ER α and ER β in different and/or in the same tumor cells.

Materials and methods. A comparative quantitative assessment of the frequency and level of expression of ER α and ER β in the tissue of ovarian cancer (a total of 20 samples) was carried out using the immunofluorescence method and flow cytometry, including the method of double fluorescent staining developed by the authors.

Results. ER β expression was found in all ovarian cancer samples, but there are both ER α ⁺ and ER α ⁻ tumors. In most ER α ⁺ tumors (69 % of cases), a low (<40 %) level of ER α expression was observed. Moreover, in the study of tumors with a high level of expression of both ER α and ER β , co-expression of the markers in the same cells of the examined tumors was revealed.

Conclusions. In the ovarian cancer tissue, different types of ER — ER α and ER β — can be expressed in different tumor cells, as well as co-expressed both in different and in the same tumor cells.

Key words: ovarian cancer, estrogen receptors α , estrogen receptors β , flow cytometry

Введение

В последние годы возродился интерес к гормональному лечению рака яичников. В клинических исследо-

ваниях тамоксифена [1] и ингибиторов ароматазы [2] при лечении распространенного рака яичников показано, что гормональная терапия практически идентич-

на по эффективности стандартной химиотерапии, но при этом значительно менее токсична. Однако вопрос о предиктивных маркерах ответа на гормональную терапию рака яичников до настоящего времени остается нерешенным.

Оценка экспрессии классических рецепторов эстрогенов (estrogen receptors, ER) альфа — ER α с целью предсказания эффективности тамоксифена или ингибиторов ароматазы не позволила выявить группу больных, у которых отмечается ответ на лечение [3]. Что касается ER бета (ER β), их роль в качестве предиктивного маркера не изучена. Более того, в экспериментальных исследованиях *in vitro* показано, что трансфекция ER β в опухолевые клетки, экспрессирующие ER α , приводит к подавлению пролиферации. На уровне клеточного цикла это сопровождается уменьшением числа клеток в S-фазе и увеличением — в фазах G2 и M [4]. Однако в другой работе показано, что в культурах клеток, конститутивно экспрессирующих ER α и ER β , антипролиферативные свойства ER β не реализуются, а антиэстроген тамоксифен проявляет свой эффект независимо от экспрессии ER β [5].

Цель настоящего исследования — ответить на вопросы, каковы частота и уровень экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников и возможна ли коэкспрессия ER α и ER β в разных и/или одних и тех же клетках новообразования. Это принципиально важные фундаментальные вопросы, ответы на которые позволят в дальнейшем более точно оценить клиническую значимость экспрессии ER α и ER β в ткани рака яичников.

Материалы и методы

Работа проведена на опухолевых клетках серозного рака яичников, полученных из 20 хирургических биопсийных образцов опухолей. Показатели экспрессии ER α и ER β оценивали с помощью количественного иммунофлуоресцентного метода, ассоциированного с проточной цитофлуориметрией, разработанного и запатентованного в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [6]. В исследовании использовали первичные моноклональные антитела, специфичные к ER α (клон SP1, ab6660) и к ER β (клон 14C8, ab288). Для экспериментов с одиночным окрашиванием ER α и ER β использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight650 (ab98729 и ab98510 соответственно). При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании рецепторов в одних и тех же клетках для выявления ER α использовали вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентным красителем DyLight488 (ab98729). Все антитела были производства фирмы Abcam (Великобритания).

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter, США). Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельные диодные лазеры с длиной волны испускаемого света 488 и 638 нм. Регистрацию сигнала флуоресценции красителей DyLight488 и DyLight650 проводили в каналах FL-1 и FL-6 соответственно. Точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре получали с помощью программы WinMDI 2.9 (The Scripps Research Institute, США). Число специфически флуоресцирующих клеток рассчитывали с помощью теста Колмогорова—Смирнова, включенного в программу FlowJo 10.0.8 (FlowJo LLC, США).

Результаты

Для ответа на вопрос, существует ли коэкспрессия ER α и ER β в разных клетках ткани одного опухолевого узла, количественные показатели экспрессии рецепторов исследованы в 20 хирургических образцах серозного рака яичников. Согласно принятым в настоящее время правилам, в клинических исследованиях низкий и высокий уровни экспрессии молекулярного маркера определяют относительно медианы показателя, выявленной при исследовании определенной группы опухолей. В нашем случае эта граница составила 40 %, при этом низким считали уровень экспрессии <40 % клеток, экспрессирующих рецептор, а высоким — ≥ 40 % клеток.

На рис. 1 представлены примеры гистограмм распределения клеток рака яичников в зависимости от интенсивности флуоресценции клеток после иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к ER α и ER β . Видно, что ткань рака яичников характеризуется гетерогенностью экспрессии обоих рецепторов. Другими словами, в исследованной группе больных встречаются опухоли как с низким, так и с высоким уровнем экспрессии ER α и ER β .

В исследованной группе образцов рака яичников во всех случаях выявлена в разной степени выраженная экспрессия ER β . Примеры, представленные на рис. 1, демонстрируют опухоли с уровнями экспрессии ER β 35 % (образец 1) и более 60 % (образцы 2, 3). Что касается ER α , то наряду с аналогичными показателями экспрессии маркера, представленными на рис. 1, выявлены и ER α -опухоли. Важно отметить, что опухоли без экспрессии ER α и с уровнем экспрессии этого маркера <40 % встречались почти в 2 раза чаще по сравнению со случаями низкой экспрессии ER β : 16 против 9 опухолей из исследованных соответственно. Это свидетельствует о том, что ведущей эстрогеновой мишенью в ткани рака яичников являются ER β .

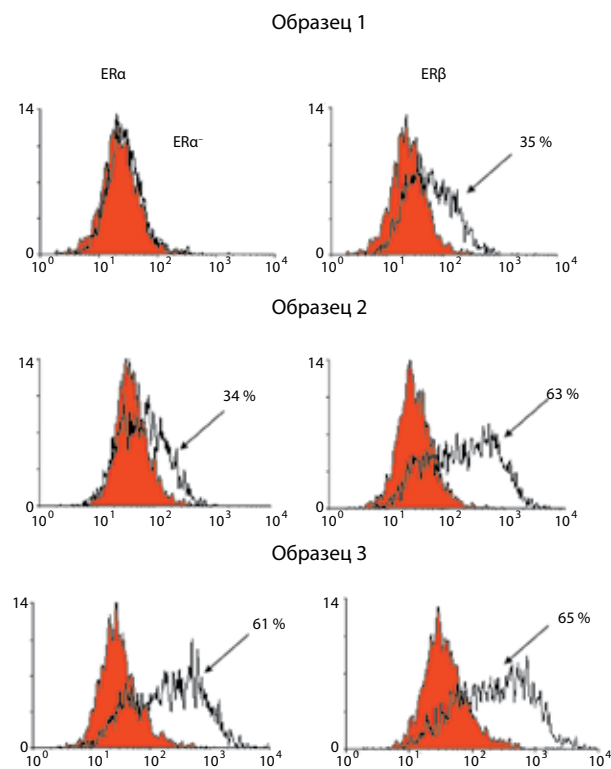


Рис. 1. Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от интенсивности клеточной флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании. По осям абсцисс — интенсивность специфической флуоресценции (усл. ед.), по осям ординат — число специфически флуоресцирующих клеток; красные гистограммы — после инкубации с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль), прозрачные диаграммы — после инкубации с антителами к ERα (левый столбец) или ERβ (правый столбец); цифры на гистограммах — уровень экспрессии маркера (%) в разных опухолях (указан стрелками), ERα⁻ — отсутствие экспрессии рецептора в образце 1

Выявление в одном и том же образце опухоли как ERα, так и ERβ с очевидностью свидетельствует о возможности коэкспрессии этих маркеров в ткани одной опухоли (см. рис. 1, образцы 2 и 3). С другой стороны, тот факт, что в образце одной и той же опухоли суммарный показатель уровней экспрессии ERα и ERβ может превышать 100 % (см. рис. 1, образец 3), позволяет утвердительно ответить на вопрос о возможности внутриклеточной коэкспрессии ERα и ERβ, т. е. о коэкспрессии обоих маркеров в одних и тех же клетках исследованной опухоли. Это заключение было подтверждено при двойном иммунофлуоресцентном окрашивании ERα и ERβ в клетках из 4 образцов рака яичников с высокой экспрессией обоих рецепторов.

На рис. 2 приведены точечные диаграммы распределения клеток в зависимости от интенсивности флуоресценции, детектируемой в каналах FL-6 и FL-1 на проточном цитофлуориметре. На диаграммах под № 1 представлена автофлуоресценция клеток

рака яичников. Видно, что при расстановке границ регионов в анализ включаются 97–98 % клеток. Контрольное окрашивание только вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем, показано на диаграммах под № 2. Данные гистограмм свидетельствуют о практически полном отсутствии неспецифического окрашивания. При этом в обеих опухолях выявлен высокий уровень экспрессии как ERα (40 и 45 %, диаграммы под № 3), так и ERβ (87 и 43 %, диаграммы под № 4).

Данные, представленные на рис. 2 на диаграммах под № 5, демонстрируют результаты специфического двойного окрашивания клеток рака яичников антителами к ERα и ERβ. Видно, что в обеих опухолях выявляются клетки, коэкспрессирующие эти маркеры (правые верхние квадранты). В 1-м случае число таких клеток в опухолевом узле составило 42 %, во 2-м — 28 %. Обращает на себя внимание тот факт, что в 1-м образце во всех клетках с экспрессией ERα выявлена и коэкспрессия ERβ, тогда как во 2-м образце только около половины клеток, экспрессирующих ERα, коэкспрессировали и ERβ. В обоих случаях в исследованных опухолях выявлены клетки с экспрессией только ERβ (левые верхние квадранты на диаграммах под № 5).

Таким образом, при стандартном иммунофлуоресцентном исследовании, ассоциированном с проточной цитофлуориметрией, в ткани рака яичников выявлена экспрессия ER разных типов — ERα и ERβ. Количественные показатели частоты и уровня экспрессии ERβ оказались выше по сравнению с ERα, при этом в большинстве опухолей отмечена коэкспрессия обоих маркеров. При двойном иммунофлуоресцентном окрашивании клеток рака яичников выявлена коэкспрессия ERα и ERβ не только в разных, но и в одних и тех же клетках новообразования.

Выводы

С помощью количественного иммунофлуоресцентного метода с использованием проточной цитофлуориметрии охарактеризована экспрессия ER разных типов в ткани рака яичников. Показано, что основной потенциальной мишенью гормональной терапии опухолей этой локализации, в отличие от рака молочной железы, могут являться ERβ, частота и уровень экспрессии которых существенно превышают показатели для ERα.

Исследование выявило внутриопухолевую гетерогенность экспрессии ERα и ERβ и продемонстрировало, что маркеры могут экспрессироваться в разных опухолевых клетках и коэкспрессироваться как в разных, так и в одних и тех же клетках злокачественного новообразования.

Учитывая данные литературы о разной (возможно, диаметрально противоположной) роли ERα

Образец 4

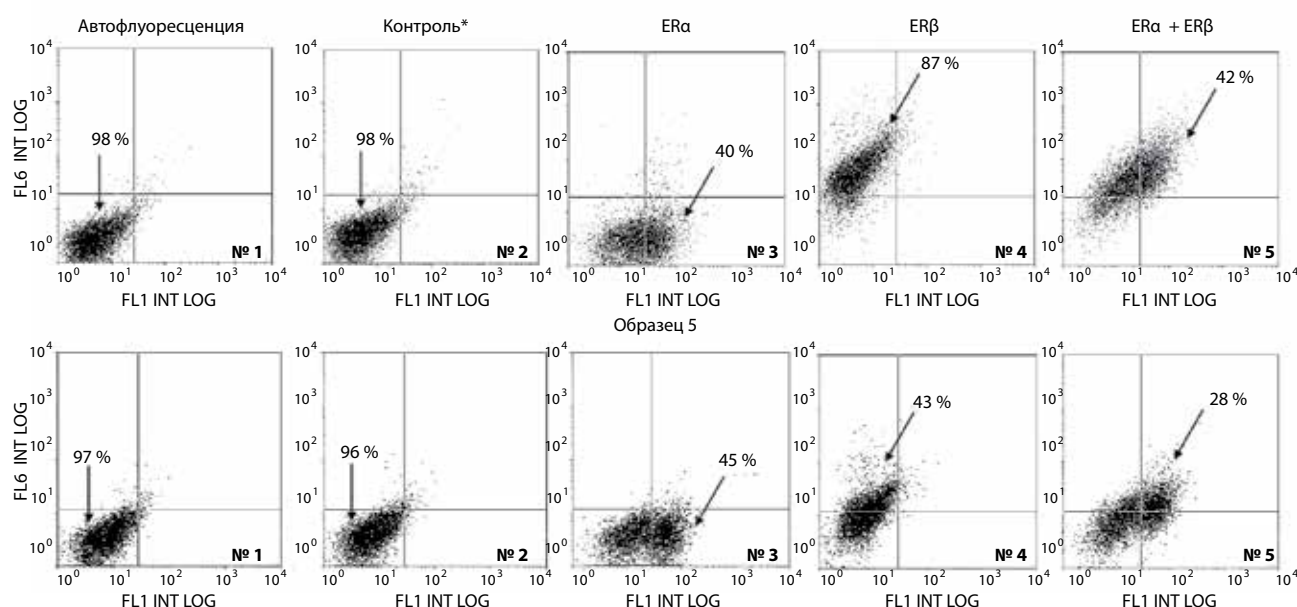


Рис. 2. Примеры двойного иммунофлуоресцентного окрашивания клеток рака яичников специфическими антителами к ERα и ERβ. По оси абсцисс — интенсивность флуоресценции в канале FL-1 для ERα, по оси ординат — интенсивность флуоресценции в канале FL-6 для ERβ. Представлены точечные диаграммы распределения клеток в образцах 2 опухолей (образцы 4 и 5) по интенсивности флуоресценции в разных каналах на проточном цитофлуориметре: № 1 — автофлуоресценция (левый нижний квадрант); № 2* — инкубация с вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем (контроль, левый нижний квадрант); № 3 — клетки, экспрессирующие ERα (правый нижний квадрант); № 4 — клетки, экспрессирующие ERβ (левый верхний квадрант); № 5 — клетки, коэкспрессирующие ERα и ERβ (правый верхний квадрант)

и ERβ в реализации стимулирующих и ингибирующих воздействий на клетки пролиферативных регуляторов опухолевого роста, можно предположить, что, наряду с безусловной важностью выявления

одиночной экспрессии в опухолевых клетках одного или другого типа ER, уровень коэкспрессии ERα и ERβ в клетке может нести самостоятельную прогностическую информацию.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 15-04-06 991-а и № 16-34-01 049-мол-а).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Lindemann K., Gibbs E., Avall-Lundqvist E. et al. Chemotherapy versus tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomized multicenter trial (Ovaresist). Br J Cancer 2017;116(4):455–63. DOI: 10.1038/bjc.2016.435. PMID: 28118323.
2. Stasenko M., Plegue M., Sciallis A.P., McLean K. Clinical response to antiestrogen therapy in platinum-resistant ovarian cancer patients and the role of tumor estrogen receptor expression status. Int J Gynecol Cancer 2015;25(2):222–8. DOI: 10.1097/IGC.0000000000000334. PMID: 25500503.
3. Langdon S.P., Gourley C., Gabra H., Stanley B. Endocrine therapy in epithelial ovarian cancer. Expert Rev Anticancer Ther 2017;17(2):109–17. DOI: 10.1080/14737140.2017.1272414. PMID: 27967255.
4. Bossard C., Busson M., Vindrieux D., Gaudin F. et al. Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. PLoS One 2012;7(9):e44787. DOI: 10.1371/journal.pone.0044787. PMID: 22970307.
5. Jonsson P., Katchy A., Williams C. Support of a bi-faceted role of estrogen receptor beta (ERβ) in ERα-positive breast cancer cells. Endocr Relat Cancer 2014;21(2):143–60. DOI: 10.1530/ERC-13-0444. PMID: 24192230.
6. Богуш Т.А., Шатурова А.С., Дудко Е.А. и др. Количественная иммунофлуоресцентная оценка с использованием проточной цитофлуориметрии экспрессии эстрогеновых рецепторов бета в солидных опухолях человека. Вестник Московского университета, серия 2 «Химия» 2011;52(4):305–12.

КЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПРОФИЛЯ МЕТИЛИРОВАНИЯ ПРОМОТОРНЫХ ОБЛАСТЕЙ 8 ГЕНОВ ХРОМОСОМЫ 3 И ГЕНА *MGMT* ПРИ ЛЮМИНАЛЬНОМ ТИПЕ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Д.А. Рябчиков¹, И.К. Воротников¹, Т.П. Казубская¹, С.С. Лукина²,
Е.А. Филиппова², А.М. Бурденный², В.И. Логинов^{2,3}

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

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

³ФБГНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115478 Москва, ул. Москворечье, 1

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

Введение. Эпигенетические изменения генов-супрессоров опухолевого роста рассматривают как наиболее тонкий и динамичный механизм регуляции генов, в том числе генов, вовлеченных в развитие рака молочной железы (РМЖ). Огромный интерес в изучении роли метилирования в патогенезе РМЖ представляют гены, расположенные на коротком плече хромосомы 3, и ген *MGMT* (10q26), для которых имеются крайне противоречивые данные об уровне их метилирования в опухолях.

Цель исследования — изучение роли метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* и *MGMT* в патогенезе эпителиальных опухолей молочной железы.

Материалы и методы. Образцы опухолевой и окружающей гистологически неизменной ткани от 174 больных РМЖ собраны и клинически охарактеризованы в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Анализ метилирования ДНК проводили с использованием 2 независимых методов. Метилирование генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* изучали с помощью полимеразной цепной реакции, специфичной к метилированному аллелю. Анализ метилирования промоторных районов генов *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1* и *NKIRAS1* выполняли с применением 2 метилчувствительных рестриктаз — *HpaII* и *HhaI* — и последующей полимеразной цепной реакции.

Результаты. Показана статистически значимо высокая частота метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* в эпителиальных опухолях молочной железы по сравнению с гистологически нормальной тканью от тех же пациенток. Выявлены значимые корреляции частоты метилирования генов *RARβ2* и *MGMT* с различными клинико-морфологическими характеристиками злокачественного процесса. Впервые показана статистически значимая связь между метилированием генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* и выживаемостью пациенток.

Заключение. Полученные данные об эпигенетических нарушениях при люминальном типе РМЖ дополняют «молекулярный портрет» этого вида рака и вносят вклад в понимание его патогенеза. Выявленные особенности метилирования исследованных генов могут найти клиническое применение для разработки современных подходов к прогнозированию, профилактике и выбору тактики лечения РМЖ у пациенток московского региона.

Ключевые слова: метилирование, промоторная область, CpG-островок, рак молочной железы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-38-45

CLINICAL ASSESSEMENT OF THE 8 GENES ON CHROMOSOME 3 WITH ALSO *MGMT* GENE PROMOTER REGIONS METHYLATION STATUS IN PATIENTS WITH BREAST CANCER LUMINAL HYSTOTYPE

D.A. Ryabchikov¹, I.K. Vorotnikov¹, T.P. Kazubskaya¹, S.S. Lukina², E.A. Filippova², A.M. Burdenny², V.I. Loginov^{2,3}

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Institute of General Pathology and Pathophysiology; 8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russia;

³Research Center of Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow 115478, Russia

Background. Epigenetic changes of TSG are supposed as the most fine and active genes regulation mechanism in particular breast cancer (BC) genes pathway development. The most valuable results are awaited for methylation role of genes located on the short arm of chromosome 3 with also *MGMT* gene (10q26) in BC pathogenesis because of their ambiguous data for methylation status in tumors.

Objective: to illustrate the specific methylation role of the *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* and *MGMT* genes promoter regions in BC pathogenesis.

Materials and methods. Sample set of 174 BC patients consists of tumor and surrounding histologically normal tissue that were collected and clinically characterized in the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology. Two substantive methods were used to evaluate DNA methylation status. To analyse *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* and *MGMT* genes methylation we used polymerase chain reaction specific for the methylated allele. Whereas for analyses *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* promoter regions genes methylation status was used methyl sensitive restriction analyses with 2 methyl sensitive endonucleases *HpaII* and *HhaI* with subsequent polymerase chain reaction.

Results. A statistically significant high frequency of *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, and *MGMT* genes methylation in epithelial breast tumors compared with histologically normal tissue from the same patients was shown. Significant correlation of *RARβ2* and *MGMT* genes methylation frequency considering the different clinical and morphological characteristics of the malignant process was revealed. The statistically significant relationship between methylation of *RASSF1A*, *RARβ2* and *MGMT* genes and patient survival is shown for the first time.

Conclusion. The findings of epigenetic changes in the luminal BC supplement the “molecular picture” of this cancer and contribute to an understanding of its pathogenesis. The revealed features of investigated genes methylation can find clinical application for the development of modern approaches to prognosis, prevention and choice of tactics for treatment of BC in females of the Moscow region.

Key words: methylation, promoter region, CpG-island, breast cancer

Введение

Несмотря на успехи в развитии клинической и экспериментальной онкологии, рак молочной железы (PMЖ) остается самым распространенным онкологическим заболеванием у женщин. Так, в России в год диагностируют более 53 тыс. новых случаев PMЖ. В Москве и Санкт-Петербурге эти показатели максимальные и составляют 52,3 и 48,1 на 100 тыс. женщин соответственно [1, 2]. По данным канцер-регистра в США на 2013 г., выявлено около 232 340 случаев PMЖ и зарегистрировано 39 620 летальных исходов от этой болезни [3]. На развитие данного заболевания оказывают влияние многие факторы, такие как образ жизни, гормональные, генетические и окружающие факторы среды, и, как известно, их канцерогенез является многоступенчатым процессом, включающим различные молекулярно-генетические изменения, в том числе эпигенетические нарушения в генах, ассоциированных с развитием опухоли. Большинство из них — гены «домашнего хозяйства», обеспечивающие поддержание нормального функционирования клетки, ее защиту от факторов внешней среды и поддержание целостности ее структуры [4]. Эпигенетическая модификация (метилование) регуляторных участков этих генов нарушает их взаимодействие с факторами транскрипции, блокируя эти участки с помощью белков, специфично связывающихся с метилированными CpG-парами (methyl CpG binding proteins), и, кроме того, вносит изменения в окружающий хроматин, переводя его в стабильно репрессированное состояние [5, 6]. К таким генам относятся *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1*, расположенные на коротком плече хромосомы 3 (рис. 1) и ген *MGMT* (10q26).

Ген *RASSF1A* располагается в кластере связанных с канцерогенезом генов в районе 3p21.31 [7]. Белковый продукт гена относится к цитоплазматическим

белкам. Выявлено многообразие функций этого белка в клетке, например задержка клеточного цикла в фазе G1/S-перехода, влияние на содержание циклина D1 и фосфорилирование белка pRb [8]. Белок гена *RASSF1A* вовлечен также в индукцию апоптоза и стабилизацию микротрубочек [9]. Метилирование гена *RASSF1A* в опухолях различной локализации рассматривают как способ подавления его супрессорной функции при онкогенезе [10]. Похожая ситуация и с геном *SEMA3B*, расположенным в районе 3p21.31 [11].

Ген *RHOA* принимает участие в процессах формирования актинового цитоскелета, выполняет

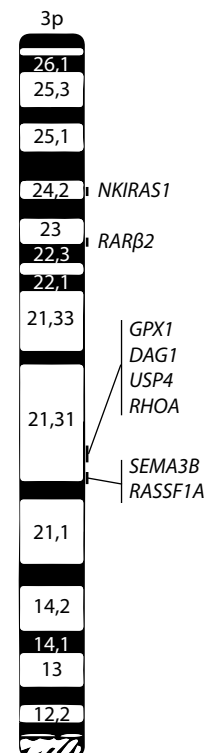


Рис. 1. Расположение исследованных генов на 3p

важную роль в подвижности и адгезии клеток. Данный ген может вызывать экзогенно трансформацию клеток как *in vitro*, так *in vivo*. Предполагается, что *RHOA* участвует в инвазии и метастазировании опухолей [12]. Активация его экспрессии в эпителиальных опухолях может быть связана как с частичным деметилированием, так и с амплификацией локуса [13, 14]. Эти результаты согласуются с данными об онкогенном потенциале гена и его участии в инвазии [15].

Ген *DAG1* кодирует дистрогликан — белок адгезии, который состоит из 2 субъединиц (трансмембранной и внеклеточной) и выполняет взаимосвязь внеклеточного матрикса с цитоскелетом. Описаны связи адгезии клеток с дистрогликаном, инвазией и метастазированием опухолей [16].

Ген *GPX1* является наиболее распространенным членом семейства глутатионпероксидаз. Этот белок локализован в митохондриях, ядре и цитоплазме. Данный антиоксидантный селенопротеин играет важную роль в защите клеток от окислительного стресса и разрушения. Показано снижение уровней белкового продукта и матричной РНК в опухолях, и выявлена способность *GPX1* подавлять рост эндотелиальной линии клеток ECV304 [17]. В недавно опубликованных исследованиях других авторов, выполненных на клеточных линиях РМЖ и образцах опухолей у больных раком желудка, также продемонстрирована роль метилирования в регуляции *GPX1* [18, 19]. Эти результаты согласуются с данными об опухолесупрессорной активности гена [17].

Ген *USP4* кодирует убиквитинспецифическую протеазу 4-го типа, которая отщепляет убиквитин и на время останавливает процесс протеолитической деградации регуляторных белков, включая p27, p53, циклины, pRb, NF-κB, транскрипционные факторы E2F, c-jun, c-fos, онкогены *c-myc* и Ser/Thr-киназу c-mos. Описано повышение уровня матричной РНК *USP4* при раке легкого [20].

Ген *RARβ2* (3p23 — p22.3) относится к суперсемейству ядерных рецепторов, которые служат лигандактивирующими транскрипционными факторами [21]. Лигандами для рецепторов класса RAR являются ретиноиды — витамин А и его биологически активные метаболиты. Представлены данные о том, что метилирование 5'-области и экзона 1 гена *RARβ2* сопровождается подавлением транскрипции гена в эпителиальных опухолях различных локализаций, в том числе при РМЖ [22].

Ген *NKIRAS1* является гомологом онкогена *Ras*, который взаимодействует с фактором некроза NF-κB. Белковый продукт гена может функционировать как G-белки, проявляющие GTPазную активность. Данный ген принимает участие в регуляции деградации IκB и вместе с IκB может подавлять актив-

ность NF-κB [23]. *NKIRAS1* идентифицирован с помощью гибридизации Not1-микрочипов в поиске генов, подверженных делециям, метилированию и амплификациям, как наиболее распространенная мишень структурных изменений такого типа в различных локализациях эпителиальных опухолей [8].

Ген *MGMT* кодирует фермент Об-метилгуанин-метилтрансфераза, участвующий в прямой репарации ДНК. Данный фермент выполняет активирующую функцию переноса метильной группы от Об-метилгуанина к остатку цистеина, что помогает восстановить нормальную структуру ДНК после вызванного алкильными соединениями повреждения [24]. В ряде работ обнаружено, что гиперметилирование CpG-островка *MGMT* взаимосвязано с инактивацией его транскрипции и, как правило, сопровождается перестройкой хроматина в неактивное состояние [25].

Одними из причин низкой выживаемости больных РМЖ являются бессимптомное течение на ранних стадиях, отсутствие достаточно эффективной диагностики заболевания и его устойчивость к химиотерапии. Известно, что нарушение паттерна метилирования ДНК наблюдается на всех стадиях канцерогенеза, что может быть использовано для диагностики и прогноза злокачественных опухолей [26].

В настоящей работе представлены результаты изучения метилирования промоторных районов генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* и *MGMT* в эпителиальных опухолях молочной железы. Определена частота метилирования промоторных районов (т.е. доля образцов, в которых наблюдали метилирование), и показана достоверная корреляция частоты метилирования этих районов с прогрессированием РМЖ.

Материалы и методы

Исследование проводили на выборке из 174 пациенток с РМЖ, проходивших обследование и лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Также использовали выборку здоровых женщин в качестве контрольной группы. У 6 (3,6 %) больных РМЖ наблюдалось билатеральное поражение, поэтому мы дополнительно анализировали результаты с учетом этого фактора. Больные описаны в соответствии с TNM-классификацией Международного противоракового союза и гистологически на основании классификации Всемирной организации здравоохранения [27, 28]. У 127 (75,6 %) пациенток выявлен люминальный гистологический тип опухоли.

Всем больным на материале удаленной опухоли проведены рутинное гистологическое и иммуногистохимическое исследования. Во всех случаях одним

морфологом был выполнен 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 Всемирной организации здравоохранения (2013). Во всех случаях сделано иммуногистохимическое исследование экспрессии андрогеновых и эстрогеновых рецепторов, прогестерона, эпидермального фактора роста 2-го типа (Her2/neu) и пролиферативной активности опухоли (индекс Ki-67). Данные по числу образцов представлены в табл. 1.

Исследование выполняли на серийных депарафинизированных срезах опухолевой ткани с помощью биотин-стрептавидинового иммунопероксидазного метода с антителами к эстрогеновым рецепторам α (SP1, Cell Marque), прогестерону (SP42, Cell Marque), андрогеновым рецепторам (F39.4.1, Biogenex), Her2/neu (Herceptest, Dako) и Ki-67 (MIB1, Dako). Срезы толщиной 3–4 мкм депарафинизировали и регидратировали по стандартной схеме. Оценку реакции гормональных рецепторов проводили в опухоли полуколичественным методом с учетом интенсивности окрашивания и количества антигенположительных клеток [29].

Тотальную ДНК выделяли из образцов ткани молочной железы по стандартной методике фенол-хлороформной очистки. ДНК хранили при температуре -20°C . Качество и концентрацию ДНК проверяли с помощью спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, США).

Анализ метилирования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и бисульфитной модификации ДНК. Метилирование генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR β 2* и *MGMT* изучали с помощью ПЦР, специфич-

ной к метилированному аллелю (метилспецифичная ПЦР). Данный метод основан на бисульфитной конверсии ДНК, которая достигается взаимодействием молекул гидросульфита с цитозином с превращением последнего в урацил. В дальнейшем осуществляется амплификация исследуемого фрагмента ДНК с помощью ПЦР. При этом все остатки урацила и тимина амплифицируются как тимин, и только 5-метилцитозин воспроизводится как цитозин [30]. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР взяты из выполненных ранее работ [31, 32].

Анализ метилирования промоторных районов генов *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* проводили с применением метилчувствительной реакции. Метод основан на способности метилчувствительных рестриктаз гидролизовать ДНК, не содержащую модифицированных оснований, и оставлять негидролизованной участки, содержащие 5-метилцитозин. ДНК последовательно гидролизовали с 2 метилчувствительными рестриктазами *HpaII* (CCGG) и *HhaI* (GCGC) (Fermentas – Thermo Fisher Scientific, США) в условиях, приведенных в протоколах фирмы-изготовителя, и использовали в качестве матрицы для ПЦР. Для амплификации применяли 2,5 мкл гидролизованной ДНК. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и условия проведения ПЦР взяты из ранее выполненных работ [14].

Продукты ПЦР исследуемых и контрольных фрагментов генов разделяли одновременно путем электрофореза в 10 % полиакриламидном геле.

Статистический анализ данных проводили с применением точного критерия Фишера. Уровень значимости принят равным 0,05. Конкордантность данных по метилированию оценивали с помощью непараметрической ранговой корреляции Спирмена. Значимость корреляции по Спирмену (R_s) проверяли с помощью t-теста Стьюдента. Отсчет безрецидивной выживаемости определялся с использованием метода Каплана–Майера и системы для статистического анализа данных SPSS 20.0.

Результаты и обсуждение

Известно, что CpG-островки генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RAR β 2*, *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* и *MGMT* перекрывают 5' – область гена, включая старт транскрипции и участок промоторной области. У гена *GPX1* CpG-островок охватывает промоторную область и весь ген. Статус метилирования CpG-островков указанных генов изучен на выборке из 174 парных образцов опухоль/неизмененная ткань у больных РМЖ, данные по частотам метилирования представлены в табл. 2. Обнаружено, что при оценке метилирования генов *SEMA3B*, *RASSF1A*, *RAR β 2* и *MGMT* их частота в опухолевой ткани составила

Таблица 1. Патоморфологические характеристики образцов люминального РМЖ

Фактор	n
Морфологическая форма:	
протоковый	104
дольковый	10
смешанный	14
редкая	5
Her2/neu:	
нет	108
есть	25
Ki-67:	
нет	68
есть	65
Андрогены:	
нет	6
есть	59

Таблица 2. Частота метилирования генов в опухоли и гистологически нормальной ткани молочных желез

Ген	Опухолевая ткань		Нормальная ткань	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>RASSF1A</i> (<i>n</i> = 174)	55	31,6*	1	0,6
<i>SEMA3B</i> (<i>n</i> = 174)	66	37,9*	12	6,9
<i>RARβ2</i> (<i>n</i> = 174)	50	28,7*	9	5,2
<i>MGMT</i> (<i>n</i> = 174)	23	13,2*	0	0
<i>USP4</i> (<i>n</i> = 92)	21	22,8	14	15,2
<i>GPX1</i> (<i>n</i> = 92)	18	19,6	10	10,9
<i>RHOA</i> (<i>n</i> = 92)	12	13,0	8	8,7
<i>DAG1</i> (<i>n</i> = 92)	19	20,7	15	16,3
<i>NKIRAS1</i> (<i>n</i> = 92)	26	28,3	23	25,0

*Различия достоверны по сравнению с нормальной тканью ($p < 0,0001$).

37,9; 31,6; 28,7 и 13,2 % соответственно, и во всех случаях была значимо выше, чем в образцах гистологически нормальной ткани ($p < 0,0001$). Отмечено, что частота метилирования изучаемых генов весьма близка или совпадает с опубликованными результатами мировых исследований [33]. В то же время изменение статуса метилирования CpG-островков генов *RHOA*, *USP4*, *GPX1*, *DAG1* и *NKIRAS1* выявлено в меньшем количестве случаев (см. табл. 2) и различия в частоте метилирования в опухолевой и прилежащей гистологически нормальной ткани статистически незначимы.

Отметим, что у 133 из 174 пациенток был диагностирован люминальный подтип РМЖ, при этом у 6 больных зарегистрировано двухстороннее поражение молочных желез. По этой причине исследуемые пациентки были разделены на 3 независимые группы по подтипам РМЖ: люминальный РМЖ ($n = 133$), Erb-B2 ($n = 13$) и трижды негативный РМЖ ($n = 28$). Был проведен анализ статуса метилирования для каждой группы, для того чтобы установить значимость более «тяжелых» форм РМЖ в патогенезе заболевания. Также проанализирована частота метилирования исследуемых генов в группе с люминальным подтипом РМЖ, чтобы оценить сохранение изменения статуса метилирования в опухоли по сравнению с гистологически нормальной тканью и подтвердить связь люминального гистологического типа РМЖ с изменением статуса метилирования исследованных генов и, соответственно, с патогенезом заболевания. Статистически значимых различий в изменении метилирования исследованных генов в зависимости от типа РМЖ не найдено. При этом сравнение внутри отдельных групп РМЖ показало, что изменение частоты метилирования генов

RASSF1A (30,8 %; $p = 0,00001$), *SEMA3B* (38,3 %; $p = 0,00001$), *MGMT* (11,3 %; $p = 0,00001$) и *RARβ2* (27,1 %; $p = 0,00001$; рис. 2) в опухоли статистически значимо выше, чем в прилежащей нормальной ткани при люминальном подтипе РМЖ. Результаты мировых исследований противоречивы, и наши данные могут оказаться интересными для понимания роли генов хромосомы 3 в развитии люминального подтипа РМЖ.

Для оценки вклада метилирования исследованных генов в развитие отдельных подтипов люминального РМЖ выборка из 133 случаев люминального РМЖ была разделена на 3 независимые подгруппы: люминальный подтип А ($n = 61$ (45,9 %)), люминальный Her2/neu⁻ подтип Б ($n = 47$ (35,3 %)) и люминальный Her2/neu⁺ подтип Б ($n = 25$ (18,8 %)). Данные по частотам метилирования исследованных генов представлены в табл. 3.

Отметим, что статистически значимых различий в частоте метилирования промоторных CpG-островков генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RHOA*, *GPX1*,

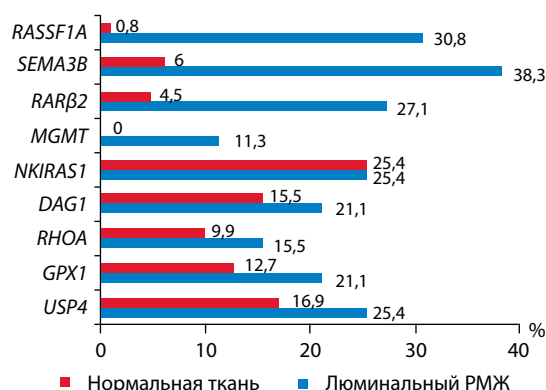


Рис. 2. Уровень метилирования генов в образцах люминального РМЖ и нормальной ткани молочных желез

Таблица 3. Уровень метилирования генов в зависимости от подтипа люминального РМЖ

Ген	Подтип А		Подтип Б Her2neu ⁻		Подтип Б Her2/neu ⁺	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
<i>RASSF1A</i>	19	31,1	15	31,9	7	28,0
<i>SEMA3B</i>	22	36,1	18	38,3	11	44,0
<i>RARβ2</i>	10	16,4	15	31,9*	11	44,0*
<i>MGMT</i>	2	3,3	8	17,0*	5	20,0*
<i>USP4</i>	8	24,2	6	24,0	4	30,8
<i>GPX1</i>	6	18,2	4	16,0	5	38,5
<i>RHOA</i>	6	18,2	4	16,0	1	7,7
<i>DAG1</i>	7	21,2	5	20,0	3	23,1
<i>NKIRAS1</i>	9	27,3	5	20,0	4	30,8

*Различия достоверны по сравнению с подтипом А при $p < 0,05$.

USP4, *DAG1* и *NKIRAS1* при сравнении разных подтипов люминального РМЖ не найдено. При этом уровень частоты метилирования генов *MGMT* и *RARβ2* в образцах РМЖ подтипа А был статистически значимо меньше ($p < 0,05$), чем в обоих подтипах Б (см. табл. 3). Так, частота метилирования *RARβ2* была 16,4 %, что в 2 и 3 раза меньше, чем у подтипов Б Her2/neu⁻ и Her2/neu⁺. Частота метилирования для гена *MGMT* была в 5 и 6 раз ниже по сравнению с подтипами Б Her2/neu⁻ и Her2/neu⁺. Полученные результаты указывают на связь этих генов с развитием люминального РМЖ подтипа Б, что согласуется с данными литературы [33–35]. Это позволяет рассматривать данные гены как молекулярные маркеры неблагоприятного прогноза РМЖ.

Нами был проанализирован статус метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* с учетом патоморфологических характеристик люминального РМЖ (см. табл. 1). Показано, что в группе больных с гиперэкспрессией Her2 уровень метилирования *RARβ2* значимо выше, чем в группе с Her2⁻ (44 % против 23,1 %; $p < 0,05$). Повышенный уровень Ki-67 статистически значимо ассоциирован с метилированием генов *MGMT* (20 % против 2,9 %; $p < 0,05$) и *RARβ2* (38,5 % против 16,2 %; $p < 0,05$).

Нами изучена корреляция среднего уровня смертности и выживаемости пациенток со статусом метилирования в зависимости от уровня метилирования 9 исследованных генов. Среднее время наблюдения составило $98,75 \pm 53,36$ мес (4,10–208,06 мес, медиана 100,6 мес). За этот период 22 (17,3 %) из 127 пациенток умерли, прогрессия зарегистрирована у 30 (23,6 %). Анализ смертности больных люминальным РМЖ в зависимости от метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2*, *MGMT*, *USP4*, *GPX1*,

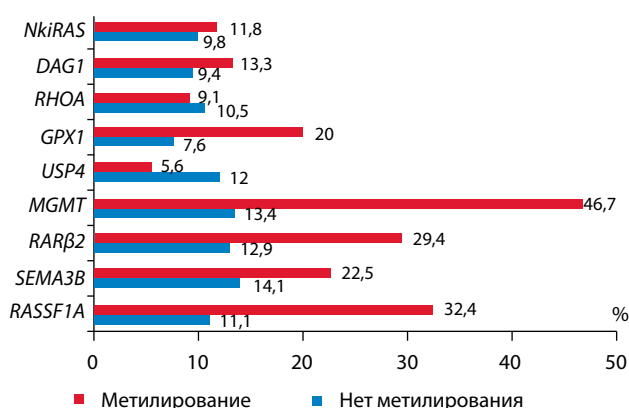


Рис. 3. Частота смертности больных люминальным РМЖ в зависимости от метилирования 9 исследованных генов

RHOA, *DAG1* и *NKIRAS1* показал достоверную корреляцию для 3 генов: *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* (рис. 3). Для *RASSF1A* уровень смертности увеличился в 2,9 раза, для *RARβ2* — в 2,3 раза и для *MGMT* — в 3,5 раза.

Тенденция к снижению общей выживаемости больных с метилированием генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* начала выявляться уже через год (рис. 4). Так, 5- и 10-летняя выживаемость больных без метилирования *RASSF1A* составила 93,5 и 85,5 %, с метилированием эти показатели достоверно ниже — 80,3 и 65,3 % соответственно ($p = 0,007$; см. рис. 4а). У больных без метилирования *RARβ2* 5- и 10-летняя выживаемость — 91,3 и 83,7 %, с метилированием показатели достоверно ниже — 84,3 и 67,2 % соответственно ($p = 0,038$; см. рис. 4б). У пациентов с метилированием *MGMT* 5- и 10-летняя выживаемость — 92,9 и 84,1 %, с отсутствием метилирования достоверно ниже — 63,8 и 42,5 % соответственно ($p = 0,0008$; см. рис. 4в). Выявленная нами связь

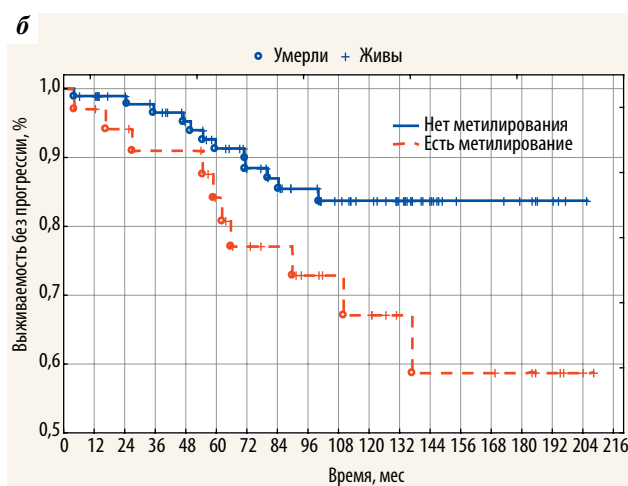
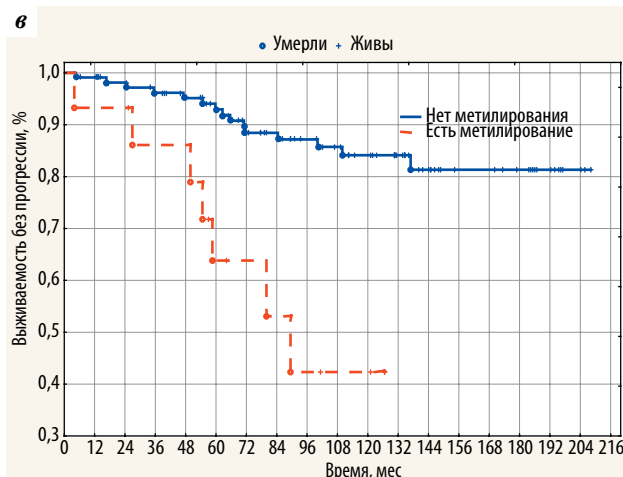
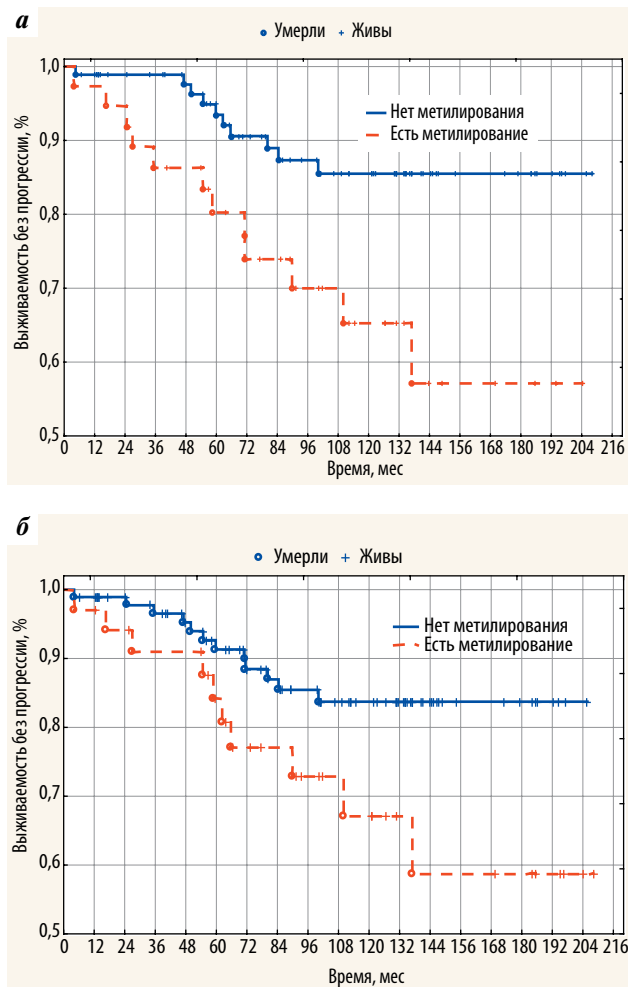


Рис. 4. Общая выживаемость больных люминальным РМЖ в зависимости от метилирования генов *RASSF1A* (а), *RARβ2* (б), *MGMT* (в)

метилирования гена *RASSF1A* с выживаемостью пациенток с люминальным РМЖ согласуется с данными зарубежных исследователей [36].

Заключение

Таким образом, в настоящей работе изучено метилирование промоторных районов 9 генов у больных РМЖ, проживающих в Москве и Московской области. Показана статистически

значимо высокая частота метилирования генов *RASSF1A*, *SEMA3B*, *RARβ2* и *MGMT* в эпителиальных опухолях молочной железы по сравнению с гистологически нормальной тканью от тех же пациенток. Выявлены значимые корреляции частоты метилирования генов *RARβ2* и *MGMT* с различными клинико-морфологическими характеристиками злокачественного процесса. Впервые продемонстрированы связь метилирования промоторных районов этих генов с люминальным фенотипом Б и статистически значимая связь метилирования генов *RASSF1A*, *RARβ2* и *MGMT* с выживаемостью пациенток.

Полученные данные об эпигенетических нарушениях при люминальном типе РМЖ дополняют «молекулярный портрет» этого вида рака и вносят вклад в понимание его патогенеза. Выявленные особенности метилирования исследованных генов могут найти клиническое применение для разработки современных подходов к прогнозированию, профилактике и выбору тактики лечения РМЖ у пациенток московского региона.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-000654).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Состояние онкологической помощи населению России в 2014 году. Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2015. С. 5–11.
2. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2008 г. Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН 2010;21(S2):52–86.
3. 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.
4. Buganim Y., Rotter V. p53: balancing tumour suppression and implications for the clinic. Eur J Cancer

- 2009;45(Suppl 1):217–34.
DOI: 10.1016/S0959-8049(09)70037-1.
PMID: 19775621.
5. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16(1):6–21. DOI: 10.1101/gad.947102. PMID: 11782440.
 6. Prokhortchouk E., Hendrich B. Methyl-CpG binding proteins and cancer: are MeCpGs more important than MBDs? *Oncogene* 2002;21(35):5394–9. DOI: 10.1038/sj.onc.1205631. PMID: 12154402.
 7. Zabarovsky E.R., Senchenko V., Loginov V. et al. Positional cloning of tumor suppressor genes from 3p21.3 involved in major human cancers. In book: *Horizons in Cancer Research*. Ed. F. Columbus. New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011, 42, chapter 4. Pp. 103–127.
 8. Dmitriev A.A., Kashuba V.I., Haraldson K. et al. Genetic and epigenetic analysis of non-small cell lung cancer with NotI-microarrays. *Epigenetics* 2012;7(5):502–13. DOI: 10.4161/epi.19801. PMID: 22491060.
 9. Agathangelou A., Cooper W.N., Latif F. Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 2005;65(9):3497–508. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-4088. PMID: 15867337.
 10. Kashuba V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S. et al. NotI microarrays: novel epigenetic markers for early detection and prognosis of high grade serous ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2012;13(10):13352–77. DOI: 10.3390/ijms131013352. PMID: 23202957.
 11. Брага Э.А., Ходырев Д.С., Логинов В.И. и др. Метилирование в регуляции экспрессии генов хромосомы 3 и генов микроРНК при светлоклеточном почечно-клеточном раке. *Генетика* 2015;51(6):668–74.
 12. Horiuchi A., Imai T., Wang C. et al. Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest* 2003;83(6):861–70. PMID: 12808121.
 13. Ходырев Д.С., Логинов В.И., Пронина И.В. и др. Изменение метилирования генов из критичных районов хромосомы 3 в эпителиальных опухолях. *Молекулярная медицина* 2011;1:3–10.
 14. Логинов В.И., Пронина И.В., Бурденный А.М. и др. Роль метилирования в регуляции экспрессии функционально значимых генов хромосомы 3: *RHOA*, *GPX1*, *USP4*, *DAG1*, *NKIRAS1* – в опухолях молочной железы. *Молекулярная медицина* 2014;6:30–7.
 15. Ma L., Liu Y.P., Geng C.Z. et al. Overexpression of Rhoa is associated with progression in invasive breast duct carcinoma. *Breast J* 2010;16(1):105–7. DOI: 10.1111/j.1524-4741.2009.00860.x. PMID: 19912238.
 16. Brennan P.A., Jing J., Ethunandan M., Gorecki D. Dystroglycan complex in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004;30(6):589–92. DOI: 10.1016/j.ejso.2004.03.014. PMID: 15256230.
 17. Faucher K., Rabinovitch-Chable H., Barriere G. et al. Overexpression of cytosolic glutathione peroxidase (GPX1) delays endothelial cell growth and increases resistance to toxic challenges. *Biochimie* 2003;85(6):611–7. PMID: 12829378.
 18. Min S.Y., Kim H.S., Jung E.J. et al. Prognostic significance of glutathione peroxidase 1 (GPX1) down-regulation and correlation with aberrant promoter methylation in human gastric cancer. *Anticancer Res* 2012;32(8):3169–75. PMID: 22843889.
 19. Kulak M.V., Cyr A.R., Woodfield G.W. et al. Transcriptional regulation of the *GPX1* gene by TFAP2C and aberrant CpG methylation in human breast cancer. *Oncogene* 2013;32(34):4043–51. DOI: 10.1038/onc.2012.400. PMID: 22964634.
 20. Hwang S.J., Lee H.W., Kim H.R. et al. Ubiquitin-specific protease 4 controls metastatic potential through β -catenin stabilization in brain metastatic lung adenocarcinoma. *Sci Rep* 2016;6:21596. DOI: 10.1038/srep21596. PMID: 26883469.
 21. Xu X.C. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer. *Cancer Lett* 2007;253(1):14–24. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.11.019. PMID: 17188427.
 22. Wu L., Shen Y., Peng X. et al. Aberrant promoter methylation of cancer-related genes in human breast cancer. *Oncol Lett* 2016;12(6):5145–55. DOI: 10.3892/ol.2016.5351. PMID: 28105221.
 23. Chen Y., Vallee S., Wu J. et al. Inhibition of NF-kappaB activity by IkappaBbeta in association with kappaB-Ras. *Mol Cell Biol* 2004;24(7):3048–56. DOI: 10.1128/MCB.24.7.3048-3056.2004. PMID: 15024091.
 24. Sato A., Sunayama J., Matsuda K.I. MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 2011;29(12):1942–51. DOI: 10.1002/stem.753. PMID: 21957016.
 25. Abouzeid H.E., Kassem A.M., Abdel Wahab A.H. et al. Promoter hypermethylation of *RASSF1A*, *MGMT*, and *HIC-1* genes in benign and malignant colorectal tumors. *Tumour Biol* 2011;32(5):845–52. DOI: 10.1007/s13277-011-0156-7. PMID: 21274674.
 26. Kulis M., Esteller M. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 2010;70:27–56. DOI: 10.1016/B978-0-12-380866-0.60002-2. PMID: 20920744.
 27. Sobin L.Y., Wittekind Ch. *UICC – TNM classification of malignant tumours*. New York: Wiley-Liss, 2002. Pp. 193–195.
 28. World health organization classification of tumours. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Eds.: F.A. Tavassoli, P. Devilee. Lyon: IARC Press, 2003.
 29. 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.
 30. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl Acids Res* 1994;22(15):2990–7. PMID: 8065911.
 31. Казубская Т.П., Логинов В.И., Ходырев Д.С. и др. Метилирование генов *RASSF1A*, *RAR β* , *SEMA3B* в эпителиальных опухолях молочной железы, яичников и полинеоплазии. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2012;1(12):61–9.
 32. Бурденный А.М., Челышева Д.С., Ходырев Д.С. и др. Роль гиперметилирования промоторных районов генов *RASSF1A* и *MGMT* в развитии рака молочной железы и яичников. *Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН* 2015;26(2):39–44.
 33. Feng W., Shen L., Wen S. et al. Correlation between CpG methylation profiles and hormone receptor status in breast cancers. *Breast Cancer Res* 2007;9(4):R57. DOI: 10.1186/bcr1762. PMID: 17764565.
 34. Park S.Y., Kwon H.J., Choi Y. et al. Distinct patterns of promoter CpG island methylation of breast cancer subtypes are associated with stem cell phenotypes. *Mod Pathol* 2012;25(2):185–96. DOI: 10.1038/modpathol.2011.160. PMID: 22037257.
 35. Asiaf A., Ahmad S.T., Malik A.A. et al. Protein expression and methylation of MGMT, a DNA repair gene and their correlation with clinicopathological parameters in invasive ductal carcinoma of the breast. *Tumour Biol* 2015;36(8):6485–96. DOI: 10.1007/s13277-015-3339-9. PMID: 25820821.
 36. Xu J., Shetty P.B., Feng W. et al. Methylation of *HIN-1*, *RASSF1A*, *RIL* and *CDH13* in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only *RASSF1A* methylation is associated with outcome. *BMC Cancer* 2012;12:243. DOI: 10.1186/1471-2407-12-243. PMID: 22695491.

ИЗУЧЕНИЕ СВОЙСТВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ *IN SILICO И IN VITRO*

Г.Н. Апрышко, О.С. Жукова, Л.В. Фетисова, Н.К. Власенкова, Р.Б. Пугачева, О.В. Горюнова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Ольга Васильевна Горюнова o.goryunova@mail.ru

Цель работы — оценка перспективности производных гликозидов индолокарбазола, содержащих аминокислотные остатки, как потенциальных противоопухолевых соединений.

Материалы и методы. Для 32 соединений по структурным формулам с использованием методов хемоинформатики рассчитали ряд молекулярных дескрипторов и вероятность проявления различных видов биологической активности, в экспериментах *in vitro* оценили цитотоксическую активность с помощью МТТ-теста на 5 линиях клеток.

Результаты. Для изученных аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола компьютерным методом предсказана высокая вероятность противоопухолевой активности при низкой вероятности цитотоксической активности *in vitro*. Низкая цитотоксическая активность подтверждена в МТТ-тесте на 5 линиях клеток. Компьютерными методами получен прогноз механизмов возможной противоопухолевой активности и рассчитан ряд молекулярных дескрипторов, имеющих значение для квалификации веществ как потенциальных лекарств.

Заключение. Целесообразно дальнейшее исследование противоопухолевой активности аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола в опытах на животных с перевиваемыми опухолями.

Ключевые слова: гликозид индолокарбазолов, аминокислотное производное, противоопухолевая активность, цитотоксичность, прогнозирование биологической активности

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-46-54

IN SILICO AND IN VITRO RESEARCH OF POTENTIAL ANTINEOPLASTIC AMINO ACID DERIVATIVES OF INDOLOCARBAZOL GLYCOSIDES PROPERTIES

G.N. Apryshko, O.S. Zhukova, L.V. Fetisova, N.K. Vlasenkova, R.B. Pugacheva, O.V. Goryunova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Objective: to evaluate the prospects of the glycosides of indolocarbazole containing amino acid residues as potential antitumor compounds.

Materials and methods. For 32 compounds by structural formulas using the methods of chemoinformatics, a number of molecular descriptors and the probability of manifestation of various types of biological activity were calculated, the cytotoxic activity was evaluated *in vitro* by methylthiazole tetrazolium (MTT) assay using five human tumor cell lines.

Results. For the studied amino acid derivatives of glycosides of indolocarbazole, a high probability of antitumor activity with a low probability of cytotoxic activity *in vitro* is predicted by computer method. Low cytotoxic activity was confirmed in the MTT test on 5 cell lines. Computer methods were used to predict the mechanisms of possible antitumor activity and to calculate a number of molecular descriptors that are important for the qualification of substances as potential drugs.

Conclusion. It is expedient to study the antitumor activity of amino-acid derivatives of glycosides of indolocarbazole in experiments on animals with transplanted tumors.

Key words: glycoside of indolocarbazoles, amino acid derivative, antitumor activity, cytotoxicity, prediction of biological activity

Введение

В связи с неудовлетворительной эффективностью химиотерапии злокачественных опухолей

лекарствами, имеющимися в настоящее время в арсенале врачей, продолжается поиск новых активных потенциальных противоопухолевых веществ. Один

из химических классов, изучающихся в этом отношении, — производные индолокарбазола с различными заместителями.

В этом классе молекулы, содержащие гетероциклическое ядро индола [2,3-а] пиррола [3,4-с] карбазола, обладают, наряду с антибактериальным, противопаразитарным и прочими видами биологической активности, наиболее выраженным противоопухолевым действием [1]. Оно обусловлено их способностью интеркалировать в ДНК, ингибировать топоизомеразы 1 и 2 [2, 3], протеинкиназы С и А [2, 4], циклинзависимые киназы [5]. В настоящее время проходят II–III фазы клинических испытаний разработанные на основе соединений этого класса производные противоопухолевого антибиотика ребеккамицина эдотекарин и бекатекарин, производное алкалоида стауроспорина мидостаурин [6]. Тем не менее продолжается поиск новых противоопухолевых агентов класса индолокарбазолов путем выделения из природных источников методами химического синтеза [7–9]. Введение различных заместителей в молекулу индолокарбазола, в первую очередь к атомам азота индола и/или имидного атома азота 5-членного цикла, позволяет модулировать физико-химические и биологические свойства полученных соединений [10]. Наличие углеводного остатка у азота индола — ключевой элемент как для взаимодействия с ДНК, так и для ингибирования топоизомеразы 1 [10, 11]. Метильная группа при атоме азота индола [11] или при имидном азоте [10] усиливает в ряде случаев цитотоксическую активность соединения. Следует отметить, что в структурах описанных производных индола [2,3-а] пиррола [3,4-с] карбазола преобладают низкомолекулярные группы заместителей, а, например, молекулы, содержащие пептидные остатки или аминокислоты, представлены лишь в некоторых публикациях [11–14].

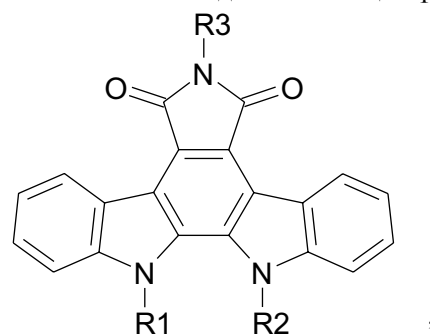
Важным качеством биологически активного препарата является его растворимость. К сожалению, даже N-гликозиды индолопирролокарбазолов, например ребеккамицин и стауроспорин, трудно растворимы [2, 15]. Одна из задач при синтезе новых производных гликозидов индолокарбазолов — ввести заместители, способные улучшить растворимость целевых соединений. Нами предположено, что включение в молекулу индолокарбазола при имидном атоме азота аминокислотного остатка с открытой карбоксильной группой как активного метаболита способно изменить путь продвижения лекарственного препарата в опухоль и действие на нее. Кроме того, наличие открытой карбоксильной группы в молекуле способно привести к значительному улучшению растворимости полученных соединений.

Цель работы — компьютерное прогнозирование биологической активности и расчет ряда молекуляр-

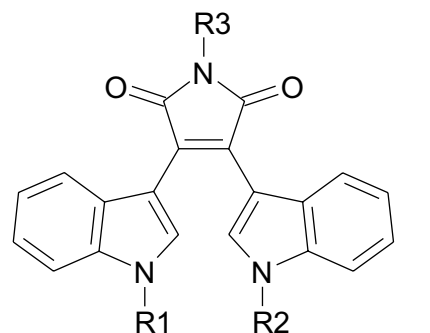
ных дескрипторов, используемых при отнесении химических соединений к потенциальным лекарственным, а также исследование цитотоксической активности *in vitro* производных гликозидов индолокарбазола, содержащих аминокислотные остатки при имидном атоме азота, по сравнению с гликозидами индолопирролокарбазола без заместителей у этого атома. Соединения были синтезированы в лаборатории химического синтеза НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Материалы и методы

Объект исследования — содержащие аминокислотные остатки 28 соединений общей формулы:



имеющие шифры ЛХС-1046, ЛХС-1047, ЛХС-1156, ЛХС-1166, ЛХС-1167, ЛХС-1171, ЛХС-1174, ЛХС-1176, ЛХС-1179, ЛХС-1196, ЛХС-1203, ЛХС-1204, ЛХС-1205, ЛХС-1206, ЛХС-1224, ЛХС-1225, ЛХС-1226, ЛХС-1227, ЛХС-1228, ЛХС-1229, ЛХС-1230, ЛХС-1231, ЛХС-1233, ЛХС-1234, ЛХС-1235, ЛХС-1243, ЛХС-1244, ЛХС-1245, и 2 соединения общей формулы:

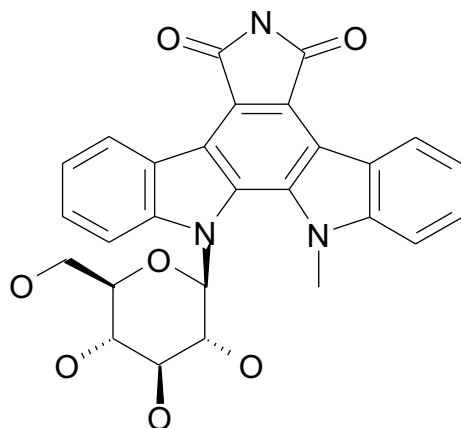


имеющие шифры ЛХС-1172 и ЛХС-1173, где R1 — гликозидный остаток; R2 — CH₃; R3 — остаток L- или D-аминокислоты.

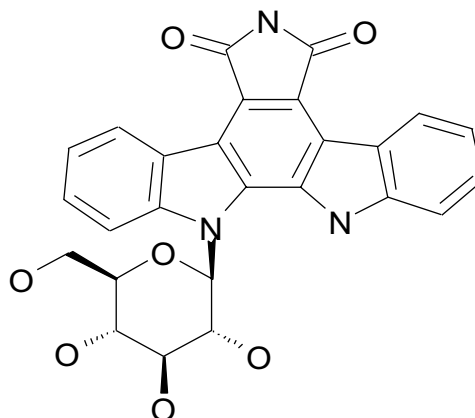
Изучены также ЛХС-1177 и ЛХС-1207 в качестве сравнительных, не содержащих аминокислотных остатков соединений (см. рисунок).

Исследования *in silico*. Для 32 исследованных соединений класса индолокарбазолов из формул,

а



б



Не содержащие аминокислотные остатки соединения ЛХС-1177 (а) и ЛХС-1207 (б)

содержащихся в бумажных паспортах на эти соединения, с помощью программы ISIS Draw генерировали структурные формулы в электронном виде, которые затем сохраняли в базе данных формата ISIS Base [16].

Компьютерное прогнозирование биологической активности проводили с помощью системы PASS, разработанной и постоянно совершенствуемой сотрудниками ФГБНУ «НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича» [17–19]. Используемая версия PASS 12.06.22 прогнозирует 6400 видов биологической активности на основе анализа обучающего массива, содержащего структурные формулы и данные по биологической активности 313 345 химических соединений. Структурные формулы исследуемых соединений вводятся в систему в виде файлов формата MOL или SDF. Средняя ошибка прогноза составляет 4,9 %. Результаты прогнозирования рассчитывают в виде вероятности соединения проявлять определенную биологическую активность (Pa) и не проявлять ее (Pi). Обычно для новых химических соединений порогом отбора перспективных соединений считают значение $Pa > 0,5$.

С использованием программного комплекса CheD [20], предоставленного ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» разработчиками в лице С.В. Трепалина, по структурным формулам соединений рассчитаны следующие молекулярные дескрипторы: N_O (суммарное число атомов азота и кислорода с неподеленными электронными парами), N_Donors (число групп, являющихся донорами атомов водорода, которые могут участвовать в образовании водородных связей), $N_Acceptor$ (число групп, являющихся акцепторами атомов водорода, которые участвуют в образовании водородных связей), PSA (площадь полярной поверхности в квадратных ангстремах). С помощью свободно доступного online программного комплекса ALOGPS [21] рассчитывали коэффициент распределения октанол – вода $LogP$, характеризующий липофильность соединений.

Значения молекулярной массы извлекали из базы данных формата ISIS Base, в которой они автоматически рассчитываются при вводе структурных формул соединений.

Исследования *in vitro*. Цитотоксическую активность *in vitro* изучали в соответствии с методикой [22] на клетках линий рака яичников SKOV3, карциномы молочной железы MCF7 и SKBR3, рака толстой кишки LS174T и HCT116.

Цитотоксическую активность оценивали по выживаемости клеток в присутствии соединений в определенных концентрациях. Для этого клетки рассевали в плоскодонные 96-луночные микропланшеты (Nunc) и инкубировали в течение 24 ч. Затем в лунки добавляли исследуемые соединения и инкубировали в течение 48 ч. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста, основанного на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать бесцветную форму МТТ-реагента (3,4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолий бромид) до голубых кристаллов формазана, растворимых в диметилсульфоксиде [23].

Оптическое поглощение растворов диметилсульфоксида измеряли на счетчике Multiskan MS (Lab-sistem, Финляндия) при длине волны $\lambda = 540$ нм. Выживаемость клеток для соответствующей концентрации вычисляли (в процентах) по формуле:

$$(\text{опыт/контроль}) \times 100.$$

Соединение считали активным, если при концентрации 10 мкМ хотя бы на одной из линий выживаемость клеток ≤ 50 % ($IC_{50} \leq 10$ мкМ). Ошибка измерений не превышала 5 %.

Результаты и обсуждение

При прогнозировании спектра биологической активности извлеченные из базы данных ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» структурные формулы конвертировали в файлы формата SDF

для ввода в систему PASS. Результаты прогнозирования, полученные в виде разностей вероятности проявлять ту или иную активность и вероятности не проявлять эту активность $Pa - Pi$, представлены в табл. 1–3.

Таблица 1. Результаты прогнозирования цитостатической и противоопухолевой активности ($Pa - Pi$)

Шифр соединения	Цитостатическая активность	Противоопухолевая активность
ЛХС-1177 (R3 = H)	0,5763	0,8077
ЛХС-1207 (R3 = H)	0,6107	0,8245
ЛХС-1046	0,4992	0,7129
ЛХС-1047	0,2391	0,7362
ЛХС-1156	0,3570	0,7236
ЛХС-1166	0,3002	0,7191
ЛХС-1167	0,3570	0,7236
ЛХС-1171	0,4889	0,5162
ЛХС-1172	0,2248	0,5715
ЛХС-1173	0,3243	0,6314
ЛХС-1174	0,2050	0,7130
ЛХС-1176	–0,0135	0,7190
ЛХС-1179	0,2868	0,7271
ЛХС-1196	0,2570	0,7176
ЛХС-1203	0,3773	0,6417
ЛХС-1204	0,3001	0,7396
ЛХС-1205	0,5325	0,7182
ЛХС-1206	0,4119	0,6942
ЛХС-1224	0,2314	0,5663
ЛХС-1225	–0,0315	0,6239
ЛХС-1226	0,3094	0,7422
ЛХС-1227	0,2325	0,7516
ЛХС-1228	–0,0332	0,6308
ЛХС-1229	0,160	0,6771
ЛХС-1230	0,2452	0,7270
ЛХС-1231	0,4247	0,6998
ЛХС-1233	0,3460	0,7312
ЛХС-1234	0,3570	0,7236
ЛХС-1235	0,3570	0,7236
ЛХС-1243	0,3001	0,7396
ЛХС-1244	0,2452	0,7270
ЛХС-1245	0,2325	0,7516

В табл. 1 приведены результаты прогнозирования цитостатической и противоопухолевой активности соединений. Видно, что для всех изученных аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола прогнозируется невысокая цитостатическая активность или ее полное отсутствие (только для соединения ЛХС-1205 значение $Pa - Pi > 0,5$ (0,5325), для остальных аминокислотных производных значения $Pa - Pi$ составляли от –0,0332 до 0,4992), в то время как для не содержащих аминокислотных остатков соединений ЛХС-1177 и ЛХС-1207 получены более значимые величины $Pa - Pi$ – 0,5763 и 0,6107 соответственно. Для всех аминокислотных производных получены значительные вероятности проявления противоопухолевой активности: $Pa - Pi$ от 0,5162 до 0,7516. Для не содержащих аминокислотных остатков ЛХС-1177 и ЛХС-1207 эти значения были больше и составляли 0,8245 и 0,8077 соответственно.

Сравнение результатов прогнозирования цитостатической и противоопухолевой активности позволяет предположить, что введение в молекулу гликозидов индолокарбазолов аминокислотных остатков, снижая вероятность цитостатической активности, не препятствует высокой вероятности наличия у этих соединений противоопухолевой активности.

Проведено прогнозирование наличия у изученных соединений 243 биологических эффектов, определяющих клеточные и молекулярные механизмы действия противоопухолевых лекарств. Значимые результаты представлены в табл. 2 в виде $Pa - Pi$.

С наибольшей вероятностью для изученных соединений прогнозируется способность ингибировать циклинзависимую киназу 3: $Pa - Pi$ для всех исследуемых соединений колеблется в области 0,65–0,74, а для ЛХС-1206 ее значение достигает 0,85. Для препаратов сравнения ЛХС-1177 и ЛХС-1207 $Pa - Pi$ этой активности равна 0,70.

Вероятность взаимодействия с ДНК (ингибирование синтеза ДНК и активности топоизомеразы 1) несколько больше выражена у препаратов сравнения. Оценено значение $Pa - Pi$ для способности стимулировать образование микротрубочек: для изучаемого ряда соединений оно колеблется в широких пределах от 0,10 до 0,50; при этом для большинства исследуемых соединений его величина почти в 2 раза выше, чем для препаратов сравнения (0,26).

Значение разности вероятностей $Pa - Pi$ стимулировать транскрипционный фактор NF-κB как для соединений, содержащих аминокислотные остатки, так и для соединений сравнения, не превышало 0,44 (см. табл. 2).

Следует отметить, что для соединений ЛХС-1156, ЛХС-1167, ЛХС-1206, ЛХС-1234 и ЛХС-1235

Таблица 2. Результаты прогнозирования механизмов действия ($P_a - P_i$)

Шифр соединения	Ингибирование циклинзависимой киназы 3	Ингибирование топоизомеразы 1	Ингибирование синтеза ДНК	Стимуляция образования микротрубочек	Стимуляция транскрипционного фактора NF-κB	Иммуностимулирующее действие
ЛХС-1177 (R3 = H)	0,7008	0,5348	0,5464	0,2561	0,4095	0,5271
ЛХС-1207 (R3 = H)	0,7018	0,5639	0,5309	0,2620	0,4390	0,5620
ЛХС-1046	0,7411	0,4726	0,2801	0,4967	0,4192	0,3404
ЛХС-1047	0,7193	0,4370	0,1603	0,4891	0,4145	0,146
ЛХС-1156	0,6695	0,4534	0,4385	0,2739	0,4186	0,5889
ЛХС-1166	0,6447	0,4170	0,2139	0,5012	0,4421	0,380
ЛХС-1167	0,7008	0,4534	0,4385	0,2739	0,4186	0,5889
ЛХС-1171	0,6479	0,2789	0,1997	0,4897	0,4006	0,1339
ЛХС-1172	0,7063	0,2271	0,0679	0,4826	0,3967	−0,0939
ЛХС-1173	0,7179	0,3614	−0,1342	0,4354	0,3750	0,2161
ЛХС-1174	0,6843	0,4052	0,0208	0,4642	0,4031	0,0259
ЛХС-1176	0,7162	0,3877	0,0096	0,4447	0,3508	−0,0308
ЛХС-1179	0,7051	0,4302	0,1812	0,4786	0,4201	0,1430
ЛХС-1196	0,6493	0,4430	0,3050	0,1989	0,3805	0,2959
ЛХС-1203	0,7173	0,4090	0,2179	0,1185	0,3526	0,4702
ЛХС-1204	0,7381	0,470	0,3959	0,2255	0,3894	0,4062
ЛХС-1205	0,7160	0,5037	0,4833	0,2207	0,3930	0,5632
ЛХС-1206	0,8528	0,4920	0,4892	0,2049	0,3982	0,6146
ЛХС-1224	0,6067	0,3535	0,3465	0,0955	0,2821	0,5072
ЛХС-1225	0,6189	0,3748	0,2628	0,1964	0,2911	0,3482
ЛХС-1226	0,7004	0,4504	0,4010	0,1891	0,4028	0,4982
ЛХС-1227	0,6922	0,4451	0,3689	0,2410	0,3972	0,4013
ЛХС-1228	0,6323	0,3620	0,1214	0,0938	0,3309	0,4849
ЛХС-1229	0,6770	0,4160	0,2917	0,1524	0,3123	0,3672
ЛХС-1230	0,7037	0,4503	0,3399	0,2216	0,3742	0,3301
ЛХС-1231	0,7077	0,4809	0,5134	0,1917	0,4069	0,6267
ЛХС-1233	0,7143	0,4645	0,4123	0,1917	0,3955	0,4031
ЛХС-1234	0,7008	0,4534	0,4385	0,2739	0,4186	0,5889
ЛХС-1235	0,7008	0,4534	0,4385	0,2739	0,4186	0,5889
ЛХС-1243	0,7381	0,470	0,3959	0,2255	0,3894	0,4062
ЛХС-1244	0,7037	0,4503	0,3399	0,2216	0,3742	0,3301
ЛХС-1245	0,6922	0,4451	0,3689	0,2410	0,3972	0,4013

значения $P_a - P_i$ для иммуностимулирующего действия (0,59–0,61) несколько превышают соответствующие значения для соединений сравнения ЛХС-1177 и ЛХС-1207 (не более 0,56). Эти данные указывают

на высокую вероятность взаимодействия перечисленных аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола с надклеточными системами организма.

Таблица 3. Результаты прогнозирования общей токсичности ($P_a - P_i$)

Шифр соединения	Общая токсичность
ЛХС-1177 ($R_3 = H$)	0,2164
ЛХС-1207 ($R_3 = H$)	0,1634
ЛХС-1046	0,0055
ЛХС-1047	0,1593
ЛХС-1156	0,462
ЛХС-1166	0,3687
ЛХС-1167	0,462
ЛХС-1171	0,0036
ЛХС-1172	0,1575
ЛХС-1173	0,1852
ЛХС-1174	0,1114
ЛХС-1176	-0,2208
ЛХС-1179	0,1262
ЛХС-1196	0,1969
ЛХС-1203	0,2730
ЛХС-1204	0,2495
ЛХС-1205	0,0876
ЛХС-1206	0,1423
ЛХС-1224	0,3153
ЛХС-1225	0,1999
ЛХС-1226	0,4789
ЛХС-1227	0,2839
ЛХС-1228	0,5554
ЛХС-1229	-0,0588
ЛХС-1230	0,1396
ЛХС-1231	0,1514
ЛХС-1233	0,2108
ЛХС-1234	0,4620
ЛХС-1235	0,4620
ЛХС-1243	0,2495
ЛХС-1244	0,1396
ЛХС-1245	0,2839

В табл. 3 представлены результаты прогнозирования общей токсичности в виде $P_a - P_i$. Для большинства соединений прогнозируется невысокая общая токсичность, что свидетельствует в пользу рассматриваемых соединений как потенциальных лекарств.

Расчет молекулярных дескрипторов проведен для предварительной характеристики «лекарствоподобия» (drug-likeness) изучаемых соединений.

При разработке лекарств широко применяется «правило пяти» Липинского, согласно которому для химических соединений — кандидатов в лекарства — для удовлетворительной биодоступности должны выполняться хотя бы 2–3 из следующих требований: молекулярная масса не более 500, LogP не более 5, в молекуле должно быть не больше 5 доноров водородной связи (H_Donors), не более 10 атомов азота и кислорода суммарно (N_O), что рассматривается как приблизительное число акцепторов водородной связи. Дополнительно предложено также оценивать площадь полярной поверхности молекулы (PSA), которая для большинства лекарственных соединений $\leq 140 \text{ \AA}^2$, и число связей, вокруг которых возможно вращение (Rot_Band), оптимальное его значение оценено как ≤ 10 . И хотя эти эмпирические величины молекулярных дескрипторов химических соединений первоначально определены как существенные для пероральной биодоступности разработанных на их основе лекарств, есть указание на значение этих параметров для способности соединений проникать через биологические мембраны и, вследствие этого, для фармакокинетических свойств, в том числе и биодоступности при других способах введения [24–26]. В работе [27] обсуждается сходство между проблемами биодоступности химических соединений и их проникновения внутрь злокачественных клеток, что свидетельствует об особой роли соответствия физико-химических дескрипторов описанным выше правилам для соединений — кандидатов в противораковые лекарства. С учетом этого были рассчитаны молекулярные дескрипторы, позволяющие проводить предварительную оценку соединений по их предполагаемой растворимости, биодоступности и фармакокинетическим свойствам. Результаты расчетов представлены в табл. 4.

Все изученные соединения удовлетворяют «правилу пяти» Липинского по коэффициенту распределения в системе октанол–вода ($\text{LogP} < 5$), имея значение от 0,36 до 3,43, причем 15 аминокислотных производных имеют лучшие значения LogP , чем не содержащие аминокислотных остатков соединения сравнения ЛХС-1177 и ЛХС-1207, для которых экспериментально показана очень низкая растворимость в воде ($< 1 \text{ мг/мл}$).

Соединения ЛХС-1177 и ЛХС-1207 имеют меньшие по сравнению с аминокислотными производными значения молекулярной массы, Rot_Band , N_O , при этом 2 из этих показателей соответствуют целевым значениям ($Rot_Band = 1$, $N_O = 10$), молекулярная масса их незначительно превышает 500.

Таблица 4. Молекулярные дескрипторы, рассчитанные по структурным формулам

Шифр соединения	Молекулярная масса	N_O	H_Donors	LogP	Rot_Band	PSA, Å ²
ЛХС-1177 (R3 = H)	501,50026	10	5	1,49	1	146,18
ЛХС-1207 (R3 = H)	487,47317	10	6	1,13	1	157,04
ЛХС-1046	529,51	11	4	1,49	3	154,46
ЛХС-1047	543,53	11	4	1,70	3	154,46
ЛХС-1156	603,59088	13	6	0,76	4	194,92
ЛХС-1166	573,56439	12	5	1,08	3	174,69
ЛХС-1167	603,59	13	6	0,76	4	194,92
ЛХС-1171	531,52675	11	4	1,73	5	154,46
ЛХС-1172	545,55384	11	4	1,84	5	154,46
ЛХС-1173	603,65608	11	4	1,72	5	179,76
ЛХС-1174	635,63608	12	5	2,72	4	174,69
ЛХС-1176	658,67365	12	5	3,43	4	170,25
ЛХС-1179	559,5373	12	5	0,96	5	174,69
ЛХС-1196	665,66257	13	6	2,25	5	194,92
ЛХС-1203	633,68257	12	5	1,37	6	199,99
ЛХС-1204	573,56439	12	5	1,11	4	174,69
ЛХС-1205	559,5373	12	5	0,95	4	174,69
ЛХС-1206	573,56439	12	5	1,15	5	174,69
ЛХС-1224	688,65659	17	7	0,93	7	256,39
ЛХС-1225	764,79615	15	6	2,64	10	213,02
ЛХС-1226	631,60143	14	6	0,58	7	211,99
ЛХС-1227	601,61857	12	5	1,73	4	174,69
ЛХС-1228	649,68197	13	5	0,89	6	210,97
ЛХС-1229	688,70014	13	6	3,01	5	190,48
ЛХС-1230	649,66317	12	5	2,33	4	174,69
ЛХС-1231	587,59148	12	5	1,55	6	174,69
ЛХС-1233	589,56379	13	6	0,36	5	194,92
ЛХС-1234	603,59088	13	6	0,76	5	194,92
ЛХС-1235	603,59088	13	6	0,76	4	194,92
ЛХС-1243	573,5644	12	5	1,11	4	174,69
ЛХС-1244	649,6632	12	5	2,33	4	174,69
ЛХС-1245	601,6186	12	5	1,73	4	174,69

Молекулярная масса всех вышеприведенных аминокислотных производных >500.

Значения Rot_Band для всех 30 аминокислотных соединений соответствуют целевым значениям ≤10.

Значения H_Donors у соединений сравнения ЛХС-1177 и ЛХС-1207 составляют 5 и 6 соответственно. Для 20 из 30 изученных, содержащих аминокислотные остатки соединений значения H_Donors укладываются в целевые значения ≤5,

у 9 из 30 они равны 6 и у 1 соединения значение H_Donors равно 7.

Для всех содержащих аминокислотные остатки соединений значения N_O превышают целевое значение 10. Значения PSA для всех изученных соединений больше целевого значения 140 Å².

Полученные расчетные значения молекулярных дескрипторов указывают на то, что среди аминокислотных производных гликозидов индолакарбазолов могут быть соединения, пригодные по физико-химическим параметрам для разработки на их основе лекарств.

Исследование цитотоксической активности на всех клеточных линиях, перечисленных выше, не выявило активности ни у одного из 28 изученных соединений (значение IC_{50} превышало заданный критерий активности 10 мкМ). Результаты экспериментального изучения цитотоксической активности коррели-

руют с полученными с помощью системы PASS результатами прогнозирования цитостатической активности.

Заключение

Исследованные аминокислотные производные гликозидов индолакарбазола по прогнозируемым физико-химическим свойствам могут быть кандидатами для разработки на их основе лекарств. Полученные результаты прогнозирования противоопухолевой активности и механизмов действия указывают на их потенциальную противоопухолевую активность, предположительно не связанную с цитотоксическим действием. Целесообразно продолжить исследование противоопухолевой активности содержащих аминокислотные остатки гликозидов индолакарбазола на животных с экспериментальными опухолями.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Konlker H.J., Reddy K.R. Isolation and synthesis of biologically active carbazole alkaloids. *Chem Rev* 2002;102(11):4303–427. PMID: 12428991.
- Prudhomme M. Recent developments of rebeccamycin analogues as topoisomerase I inhibitors and antitumor agents. *Med Chem* 2000;7(12):1189–212. PMID: 11032967.
- Meng L.H., Liao Z.Y., Pommier Y. Non-camptothecin DNA topoisomerase I inhibitors in cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2003;3(3):305–20. PMID: 12570765.
- Pereira E.R., Fabre S., Sanselme M. et al. Antimicrobial activities of indolocarbazole and bis-indole protein kinase C inhibitors. II. Substitution on maleimide nitrogen with functional groups bearing a labile hydrogen. *J Antibiot (Tokyo)* 1995;48(8):863–8. PMID: 7592032.
- Sielecki T.M., Boylan J.F., Benfield P.A., Trainor G.L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: useful targets in cell cycle regulation. *J Med Chem* 2000;43(1):1–18. PMID: 10633033.
- Butler M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 2005;22(2):162–95. DOI: 10.1039/b402985m. PMID: 15806196.
- Civenni G., Longoni N., Costales P. et al. EC-70124, a novel glycosylated indolocarbazole multitargeted kinase inhibitor, reverts tumorigenic and stem cell properties in prostate cancer by inhibiting STAT3 and NF-κB. *Mol Cancer Ther* 2016;15(5):806–18. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0791. PMID: 26826115.
- Shaaban K.A., Elshahawi S.I., Wang X. et al. Cytotoxic indolocarbazoles from *Actinomadura melliaura* ATCC 39691. *J Nat Prod* 2015;78(7):1723–9. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00429. PMID: 26091285.
- Steinert G., Taylor M.W., Schup P.J. Diversity of Actinobacteria associated with the marine Ascidian *Eudistoma toaeleensis*. *Mar Biotechnol* 2015;17(4):377–85. DOI: 10.1007/s10126-015-9622-3. PMID: 25678260.
- Prudhomme M. Biological targets of antitumor indolocarbazoles bearing a sugar moiety. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 2004;4(6):509–21. PMID: 15579016.
- Pindur U., Kim Y.-S., Mehrabani F. Advances in indolo[2,3-a]carbazole chemistry: design and synthesis of protein kinase C and topoisomerase I inhibitors. *Curr Med Chem* 1999;6(1):29–69. PMID: 9873114.
- Trostmann U., Hartenstein J., Barth H. et al. Патент Германии Ger. Offen DE 4243321 A1, June 23, 1994.
- Trostmann U., Schaechtele C., Hartenstein J. et al. Патент США 5750555, May 12, 1998.
- Горюнова О.В., Захарчук Г.М., Жукова О.С. и др. N6-дипептидные производные N12-рибозил-индола[2,3-a]карбазола. *Биоорганическая химия* 2014;40(1):12–9. DOI: 10.7868/S0132342314010047.
- Omura S., Sasaki Y., Iwai Y., Takeshima H. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot* 1995;48(7):535–48. PMID: 7649849.
- Апрышко Г.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных «Противоопухолевые отечественные вещества, изученные в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН» № 2013620860. М.: Федеральная служба по интеллектуальной собственности, 29 июля 2013 г.
- Филимонов Д.А., Пороиков В.В. Прогноз спектра биологической активности органических соединений. *Российский химический журнал* 2006;50(2):66–75.
- Filimonov D.A., Poroikov V.V. Probabilistic approach in activity prediction. In book: *Chemoinformatics approaches to virtual screening*. Eds.: A. Varnek, A. Tropsha. Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008. Pp. 182–216.
- Филимонов Д.А., Лагуни А.А., Глоризова Т.А. и др. Предсказание спектров биологической активности органических соединений с помощью веб-ресурса PASS Online. *Химия гетероциклических соединений* 2014;3:483–99.
- Trepalin S.V., Yarkov A.V. CheD: chemical database compilation tool, internet server, and client for sql servers. *J Chem Inf Comput Sci* 2001;41(1):100–7. PMID: 11206361. <http://www.vclab.org/lab/alogps>.
- 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. 642–656.
22. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;65(1–2):55–63. PMID: 6606682.
23. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Delivery Rev* 2001;46(1–3):3–26. PMID: 11259830.
24. Кубиньи Г. В поисках новых соединений-лидеров для создания лекарств. *Российский химический журнал* 2006;50(2):5–17.
25. Veber D.F., Johnson S.R., Cheng H.Y. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem* 2002;45(12):2615–23. DOI: 10.1021/jm020017n. PMID: 12036371.
26. Omran Z., Rauch C. Acid-mediated Lipinski's second rule: application to drug design and targeting in cancer. *Eur Biophys J* 2014;43(4–5):199–206. DOI: 10.1007/s00249-014-0953-1. PMID: 24687685.

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ОРМУСТИНА НА ПЕРЕВИВАЕМЫХ СОЛИДНЫХ ОПУХОЛЯХ МЫШЕЙ. ЧАСТЬ I

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

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

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

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

Введение. Препараты из группы производных *N*-алкил-*N*-нитрозомочевина активно и успешно применяются в онкологической практике. Однако поиск новых высокоэффективных противоопухолевых агентов из этой группы в настоящее время является актуальным.

Цель исследования — изучение *in vivo* противоопухолевой активности нового отечественного препарата из группы производных *N*-алкил-*N*-нитрозомочевина — ормустина — на солидных перевиваемых опухолях мышей: меланоме В16 и эпидермоидной карциноме легкого Льюис.

Материалы и методы. Оценку противоопухолевой активности ормустина и препарата сравнения — мюстофорана (Les Laboratoires Servier, Франция) — проводили на мышах B6D2F1. Ормустин в диапазоне доз 50–135 мг/кг вводили мышам внутривенно однократно. Мюстофоран вводили внутривенно 2-кратно в дозе 32 мг/кг (на 2-е и 9-е сутки) и 3-кратно в дозе 25 мг/кг (на 2, 6 и 9-е сутки). Наблюдение за животными продолжали до их гибели. Противоопухолевый эффект препаратов оценивали по торможению роста опухоли, увеличению продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными.

Результаты. Установлена терапевтическая доза ормустина, равная 125 мг/кг, при однократном внутривенном введении мышам с меланомой В16 или эпидермоидной карциномой легкого Льюис.

Выводы. Ормустин обладает высокой противоопухолевой активностью на солидных перевиваемых опухолях мышей. На меланоме В16 ормустин по терапевтическому эффекту не уступает мюстофорану.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, нитрозоалкилмочевина, ормустин, мюстофоран, перевиваемые опухоли мышей

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-55-60

ANTITUMOR ACTIVITY OF ORMUSTINE AGAINST TRANSPLANTABLE SOLID MURINE TUMORS. PART I

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

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²Postovsky Institute of Organic Synthesis, Ural Branch of RAS; 22 S. Kovalevskaya St., Ekaterinburg 620990, Russia

Background. Drugs of nitrosourea class are actively and successfully administered in oncology practice. However, at present, the search for new antitumor agents of this class is very urgent.

Objective: to examine *in vivo* antitumor activity of ormustine, a new Russian drug from alkylnitrosourea class, against solid transplantable murine tumors: melanoma B16 and epidermoid Lewis lung carcinoma.

Materials and methods. The assessment of antitumor activity of ormustine and a reference drug mustophoran (Les Laboratoires Servier, France) was carried out in B6D2F1 mice. Ormustine was administered intravenously at a single dose of 50–135 mg/kg. Mustophoran was administered intravenously at a dose of 32 mg/kg twice (on days 2 and 9) and 3 times at a dose of 25 mg/kg (on days 2, 6 and 9). The follow-up period lasted till the death of animals. The antitumor effect of agents was assessed by the tumor growth inhibition and increase in life span of experimental mice compared to control animals.

Results. It has been defined that the single intravenous dose of ormustine (125 mg/kg) is therapeutic for mice bearing melanoma B16 and epidermoid Lewis lung carcinoma.

Conclusions. Ormustine possesses high antitumor effect against solid transplantable murine tumors. Ormustine is not inferior to mustophoran in the therapeutic effect against melanoma B16.

Key words: antitumor agents, alkylnitrosoureas, ormustine, mustophoran, transplantable murine tumors

Введение

Производные N-алкил-N-нитрозомочевины (НАМ) как противоопухолевые препараты успешно применяются для лечения злокачественных глиом, метастазов в головной мозг, меланом, а также в комбинированной химиотерапии ряда солидных опухолей и гемобластозов. Однако препараты из группы НАМ вызывают серьезные системные осложнения, для них характерна высокая отсроченная и кумулятивная токсичность, что в сочетании с низкой селективностью значительно ограничивает их использование для химиотерапии [1–4].

Для повышения избирательности действия и снижения токсичности были созданы производные НАМ, молекулы которых содержат в качестве носителей цитотоксических фрагментов остатки аминокислот. В клинической практике применяется производное НАМ фотемустин (мюстофоран) – биоизостерический аналог аланина диэтил-[1-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]этил]фосфонат, эффективный в моно- и поли-терапии при различных неоплазиях (меланома, опухоли мозга, острая рефрактерная лейкемия) [5–10]. Противоопухолевый препарат лизомустин – производное L-лизина, созданное в результате совместных исследований ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и Института органического синтеза им. И.Я. Постовского Уральского отделения РАН – применяют для лечения злокачественной меланомы и мелкоклеточного рака легкого [11–13]. Фотемустин и лизомустин относятся к III поколению противоопухолевых препаратов – производных нитрозомочевины.

В продолжение исследований по созданию оригинальных противоопухолевых препаратов из подгруппы производных НАМ, содержащих в своем составе остатки аминокислот, на основе природного L-орнитина был синтезирован аналог лизомустина – ормустин, представляющий собой смесь изомеров 8-(2-хлорэтил)-6-нитрозо-L-цитруллина и 8-(2-хлорэтил)-8-нитрозо-L-цитруллина [14]. Лекарственная форма «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» в настоящее время успешно проходит доклинические испытания в качестве потенциального противоопухолевого средства [15–20]. Ранее была установлена ее высокая противоопухолевая активность при однократном внутривенном (в/в) введении мышам с перевиваемыми лимфолейкозами [21].

Цель настоящего исследования – оценка *in vivo* специфической активности лекарственной формы «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» на солидных перевиваемых опухолях мышей: меланоме В16 и эпидермоидной карциноме легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC).

Материалы и методы

Оценку противоопухолевой активности ормустина *in vivo* на солидных перевиваемых опухолях мышей проводили в соответствии с «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств» [22]. Штаммы экспериментальных опухолей с различными кинетическими и патологическими параметрами – меланома В16 и LLC – были получены из Банка опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и поддерживались путем стандартных серийных перевивок (каждые 11–13 дней) на мышах линии С57В1/6j (меланома В16 – подкожно (п/к), LLC – внутримышечно) [23].

Опыты проводили на иммунокомпетентных мышах гибридах первого поколения F1(DBA/2 × С57В1/6j) (В6D2F1), самцах и самках с массой тела 18–25 г. Животных получили из филиала «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» и содержали в виварии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России на брикетированном корме с постоянным доступом к воде. Все эксперименты проводили согласно с этическими аспектами проведения исследований на биомоделях и лабораторных животных, принятыми в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [24, 25].

Опухоли мышам перевивали п/к в область подмышечной впадины передней лапы по стандартным методикам [22, 23]. Затем методом случайного выбора формировали контрольную (10–12 животных) и опытные группы (по 8–9 животных).

В работе использовали лекарственную форму «Ормустин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг», полученную в лаборатории разработки лекарственных форм Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [15, 16]. Леофилизат *ex tempore* регидратировали 5 % раствором глюкозы и вводили однократно в/в мышам в диапазоне доз 50–135 мг/кг через 48 ч после перевивки опухолей. Однократное введение препарата соответствует режиму, применяемому в клинической практике для данной группы противоопухолевых соединений [1].

В качестве препарата сравнения использовали мюстофоран (фотемустин; диэтил-[1-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]этил]фосфонат) производства Les Laboratoires Servier (Франция). Препарат в оригинальном растворителе вводили мышам В6D2F1 в/в 2-кратно в дозе 32 мг/кг на 2-е и 9-е сутки (суммарная доза 64 мг/кг) и 3-кратно в дозе 25 мг/кг на 2, 6 и 9-е сутки (суммарная доза 75 мг/кг). Дозы мюстофорана для мышей были рассчитаны

в соответствии с дозами, используемыми в клинике для человека. Они совпали с дозами для мышей (34–50 мг/кг), указанными в литературе [26]. Также был использован режим введения мюстофорана животным, аналогичный эффективному режиму применения фотемустина в терапии опухолей человека [1].

Объемы опухолей у экспериментальных животных измеряли каждые 3–5 дней в зависимости от скорости роста опухоли. Объем опухоли (V) вычисляли умножением 3 максимальных взаимно перпендикулярных размеров опухоли (длина, ширина, высота) у каждого животного [22].

Критериями оценки противоопухолевой активности служили торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) подопытных животных по сравнению с контрольными, которые рассчитывали по формулам:

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

где V_k – средний объем опухолей в контрольной группе, V_o – средний объем опухолей в опытной группе (мм^3);

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

где СПЖ_k – средняя продолжительность жизни животных в контрольной группе (дни), СПЖ_o – средняя продолжительность жизни животных в опытной группе (дни).

Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 % [22].

Наблюдение за животными продолжали до их гибели. О токсичности препаратов судили по более ранней гибели мышей опытных групп по сравнению с гибелью контрольных животных и макроскопической картине внутренних органов при их аутопсии, а также по снижению массы тела более чем на 20 %.

Статистическую значимость противоопухолевого эффекта по отношению к контрольной группе определяли по методу Фишера–Стьюдента. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В табл. 1–3 представлены результаты тестирования противоопухолевой активности ормустина *in vivo* на солидных перевиваемых опухолях мышей: меланоме В16 и LLC.

Однократное в/в введение ормустина в интервале доз 50–135 мг/кг мышам В6D2F1 с меланомой В16 вызывало дозозависимое значительное и продолжительное ингибирование роста первичных подкожных опухолевых узлов (см. табл. 1). В дозе 50 мг/кг ормустина умеренно подавлял рост опухоли только с 6-го до 13-го дня после окончания введения препарата (ТРО 85–54 % соответственно, УПЖ 25 %), тогда как в дозе 125 мг/кг ингибирующее действие ормустина было значительным (ТРО 100–87 %, УПЖ 50 %) и длительным (в течение 20 дней после окончания введения препарата). Увеличение дозы препарата до 135 мг/кг не вызвало дальнейшего усиления ингибирования роста меланомы В16, но привело к гибели при явлениях токсичности 22 % животных в группе.

Таким образом, доза ормустина 125 мг/кг при однократном в/в введении на 2-е сутки опыта мышам с меланомой В16 является терапевтической.

В табл. 2 представлены результаты сравнения эффективности действия ормустина и мюстофорана на рост меланомы В16 у мышей В6D2F1.

Для сравнения с мюстофораном использовали наиболее эффективные по критерию УПЖ дозы ормустина: 125 и 135 мг/кг (см. табл. 1). Мюстофоран в дозе 32 мг/кг при 2-кратном в/в введении на 2-е и 9-е сутки (суммарная доза 64 мг/кг) проявил

Таблица 1. Противоопухолевая активность ормустина при однократном в/в введении мышам с меланомой В16

№ группы	Доза, мг/кг	ТРО, %					УПЖ, %	Гибель от токсичности, n/N (%) **
		Дни после окончания лечения						
		6	9	13	16	20		
1	50	85*	80*	54*	47	40	25	0/9
2	100	100*	99*	98*	86*	68*	28	0/9
3	125	100*	99*	99*	99*	87*	50***	0/9
4	135	100*	99*	99*	99*	96*	63***	2/9 (22)

*Различия с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,05$); ** n/N (%) – отношение числа животных, погибших от токсичности препарата, к общему числу животных в группе, % случаев; ***различие в средней продолжительности жизни мышей между группами 3 и 4 недостоверно ($p > 0,05$).

Таблица 2. Сравнение противоопухолевой активности ормустина и мюстофорана при в/в введении мышам с меланомой B16

№ группы	Препарат, доза (мг/кг) × режим введения	ТРО, %					УПЖ, %	Гибель от токсичности, n/N (%) **
		Дни после перевивки опухоли						
		7	10	14	17	21		
1	Ормустин 125 × 1 раз на 2-е сутки	99	99	99	97	91	84*	0/8
2	Ормустин 135 × 1 раз на 2-е сутки	99	99	99	97	86	93***	1/8 (12,5)
3	Мюстофоран 32 × 2 раза (на 2-е и 9-е сутки)	98	99	99	99	99	119*	3/8 (37,5)
4	Мюстофоран 25 × 3 раза (на 2, 6 и 9-е сутки)	99	99	99	99	99	104***	1/8 (12,5)

*Различие в средней продолжительности жизни мышей между группами 1 и 3 статистически недостоверно ($p > 0,05$); **n/N (%) — отношение числа животных, погибших от токсичности препарата, к общему числу животных в группе, % случаев; ***различие в средней продолжительности жизни мышей между группами 2 и 4 недостоверно ($p > 0,05$).

длительную стойкую противоопухолевую активность (ТРО 98–99 % до 21-го дня после перевивки опухоли). Ормустин в терапевтической дозе 125 мг/кг при однократном в/в введении также значительно (ТРО 99–91 %) и длительно (до 21-го дня после перевивки опухоли) ингибировал рост меланомы B16. Оба препарата в использованных дозах и режимах значительно увеличивали продолжительность жизни мышей в опытных группах по сравнению с контрольными (см. табл. 2). УПЖ при применении ормустина в дозе 125 мг/кг было несколько ниже, чем при применении мюстофорана в суммарной дозе 64 мг/кг: 84 % против 119 % соответственно, однако это различие являлось статистически недостоверным ($p > 0,05$). Мюстофоран при этом проявил достаточно высокую токсичность, вызвав гибель 3 из 8 животных (37,5 % случаев).

При повышении дозы ормустина до 135 мг/кг при однократном в/в введении и суммарной дозы мюстофорана до 75 мг/кг при 3-кратном в/в введении оба препарата оказались эквитоксичными и вызывали гибель мышей в 12,5 % случаев. УПЖ

при применении ормустина составило 93 %, а при применении мюстофорана — 104 %, однако различие было статистически недостоверным ($p > 0,05$).

Таким образом, противоопухолевые эффекты ормустина и мюстофорана в изученных дозах и режимах в отношении меланомы B16 мышей равнозначны.

Следует отметить, что на мышах BALB/c nude с п/к перевитыми ксенографтами беспигментной меланомы человека Mel7 (Bro) лечение ормустином и мюстофораном также оказалось равнозначным по уровню достоверного противоопухолевого эффекта и переносимости терапии [27].

В табл. 3 представлены результаты изучения противоопухолевого действия ормустина на LLC мышей.

Отмечено, что ормустин в исследуемых дозах при однократном в/в введении дозозависимо ингибировал рост первичного опухолевого узла у мышей с LLC. Высокий статистически значимый противоопухолевый эффект ормустина наблюдался при дозе 100 мг/кг: ТРО 92–72 % с 4-го по 18-й день после

Таблица 3. Противоопухолевая активность ормустина при однократном в/в введении мышам с LLC

№ группы	Доза, мг/кг	ТРО, %							УПЖ, %	Гибель от ток- сичности, n/N (%) **
		Дни после окончания лечения								
		4	11	18	22	25	29	35		
1	100	92*	89*	72*	58*	43	37	28	26	0/8
2	125	97*	99*	97*	91*	85*	76*	66*	35	0/8
3	135	95*	99*	93*	88*	85*	74*	67*	16	1/8 (12,5)

*Различия с контрольной группой статистически достоверны ($p < 0,05$); **n/N (%) — отношение числа животных, погибших от токсичности препарата, к общему числу животных в группе, % случаев.

окончания введения препарата, УПЖ 26 %. Максимальный терапевтический эффект ормустина на LLC отмечался при его введении в терапевтической дозе 125 мг/кг: ТРО от 97–99 до 85 % в течение 25 дней. Противоопухолевый эффект сохранялся до 35-го дня наблюдения (ТРО 66 %), УПЖ при этом составляло 35 %.

Повышение дозы ормустина до 135 мг/кг не давало преимуществ по критерию ТРО (95–67 % в течение 35 дней после окончания лечения) перед дозой 125 мг/кг. При этом УПЖ составило 16 % и наблюдалась гибель 1 из 8 подопытных животных (12,5 % случаев), что свидетельствует о токсическом действии ормустина на организм мышей.

Выводы

В результате проведенных доклинических исследований нового отечественного препарата «Ормус-

тин, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 125 мг» выявлена его высокая противоопухолевая активность в отношении солидных экспериментальных опухолей мышей: меланомы В16 и LLC. Установлено, что при применении ормустина на перевиваемых опухолях мышей доза 125 мг/кг является терапевтической. Ормустин при однократном в/в введении ингибирует рост меланомы В16 на 100–87 % в течение 20 дней и увеличивает продолжительность жизни подопытных мышей на 50 %, замедляет рост LLC на 99–66 % в течение 35 дней, УПЖ мышей при этом составляет 35 %.

Изучение противоопухолевой активности отечественного препарата ормустин в сравнении с коммерческим препаратом мюстофоран при в/в введении на меланоме В16 показало, что ормустин по терапевтическому эффекту не уступает мюстофорану.

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

1. Переводчикова Н.И. Клинико-фармакологическая характеристика противоопухолевых средств. В кн.: Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой и В.А. Горбуновой. М.: Практическая медицина, 2015. С. 37–41, 49–57.
2. Островская Л.А., Корман Д.Б., Деметьева Н.П. и др. Препараты класса нитроалкилмочевин в отечественной противоопухолевой химиотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2004;3(1):24–36.
3. Nikolova T., Roos W.P., Krämer O.H. et al. Chloroethylating nitrosoureas in cancer therapy: DNA damage, repair and cell death signaling. *Biochim Biophys Acta* 2017;1868(1):29–39. DOI: 10.1016/j.bbcan.2017.01.004. PMID: 28143714.
4. Сыркин А.Б., Горбачева Л.Б. Биохимические механизмы действия N-алкил-N-нитрозомочевин. Возможные причины лекарственной устойчивости к этим соединениям. Экспериментальная и клиническая фармакология 1996;59(2):69–75.
5. Поддубная И.В. Клиническое значение противоопухолевого препарата мюстофоран. Современная онкология 2000;2(4):121–3.
6. Quéreux G., Dréno B. Fotemustine for the treatment of melanoma. *Expert Opin Pharmacother* 2011;12(18):2891–904. DOI: 10.1517/14656566.2011.633513. PMID: 22077794.
7. De Rossi A., Rossi L., Laudisi A. et al. Focus on fotemustine. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25(4):461–8. PMID: 17310834.
8. Lombardi G., Farina P., Della Puppa A. et al. An overview of fotemustine in high-grade gliomas: from single agent to association with bevacizumab. *Biomed Res Int* 2014;2014:698542. DOI: 10.1155/2014/698542. PMID: 24800248.
9. Pérez-Segura P., Manneh R., Ceballos I. et al. GEINOFOTE: efficacy and safety of fotemustine in patients with high-grade recurrent gliomas and poor performance status. *Clin Transl Oncol* 2016;18(8):805–12. DOI: 10.1007/s12094-015-1444-2. PMID: 26542177.
10. Fabi A., Metro G., Vidiri A. et al. Low-dose fotemustine for recurrent malignant glioma: a multicenter phase II study. *J Neurooncol* 2010;100(2):209–15. DOI: 10.1007/s11060-010-0163-3. PMID: 20352471.
11. Краснов В.П., Чупахин О.Н., Левит Г.Л. и др. Химические аспекты создания оригинального противоопухолевого препарата лизомустин. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова и А.Ю. Барышниковой. М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. С. 135–46.
12. Горбунова В.А., Манзюк Л.В., Демидов Л.В., Харкевич Г.Ю. Лизомустин — отечественный препарат из группы производных нитрозомочевин в лечении меланомы кожи. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):55–6.
13. Краснов В.П., Левит Г.Л., Барышникова М.А. и др. Нитрозомочевин на основе аминокислот. Оригинальный противоопухолевый препарат лизомустин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):46.
14. Краснов В.П., Левит Г.Л., Матвеева Т.В. и др. N-нитрозо-N-[(2-хлорэтил)карбамоил]-L-орнитин. Патент на изобретение № 2503657 от 24.08.2012.
15. Nikolaeva L., Oborotova N., Bunyatyan N. et al. The development of a parenteral pharmaceutical formulation of a new class of compounds of nitrosourea. *Pharmaceutics* 2016;9(4):68. DOI: 10.3390/ph9040068.
16. Николаева Л.Л., Ланцова А.В., Санарова Е.В. и др. Парентеральная лекарственная форма нового соединения из класса алкилнитрозомочевин. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):113.
17. Грищенко И.В., Альбассит Б., Барышников М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия 2 лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевин. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):49–54.
18. Барышников М.А., Альбассит Б., Сапрыкина Н.С. и др. Противоопухолевая активность нового соединения из класса нитроалкилмочевин. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):8.

19. Сапрыкина Н.С., Барышникова М.А., Краснов В.П. и др. Противоопухолевая активность соединения OR-2011 на перевиваемых меланомах мышей. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):125.
20. Пятаев Н.А., Минаева О.В., Столяров Г.С. и др. Фармакокинетика и тканевое распределение противоопухолевого химиопрепарата ормустина. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):124.
21. Сапрыкина Н.С., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Противоопухолевая активность ормустина на перевиваемых лейкозах мышей. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):24–31.
22. 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 I. Под ред. А.Н. Миронova, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 640–54.
23. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Година, А. Кляйна. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.
24. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986;123. Available at: <http://www.coe.int>.
25. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1:53.
26. Vassal G., Boland I., Terrier-Lacombe M.J. et al. Activity of fotemustine in medulloblastoma and malignant glioma xenografts in relation to O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase and alkylpurine-DNA-N-glycosylase activity. Clin Cancer Res 1998;4(2):463–8. PMID: 9516937.
27. Смирнова Г.Б., Борисова Ю.А., Калишьян М.С. и др. Сравнительное изучение нового нитрозопроизводного ормустина с мюстофораном на подкожных ксенографтах меланомы человека Mel7. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):132–3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ТАРГЕТНОГО ПРЕПАРАТА АИМПИЛА

Э.Р. Переверзева¹, В.А. Голибродо¹, М.И. Трещалин¹, Н.В. Еремкин¹, С.А. Цуркан², И.Д. Трещалин¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;

Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1;

²ООО «Фармацевтический научный центр “ФармАксесс”»; Россия, 127322 Москва, ул. Милашенкова, 10, оф. 195

Контакты: Василиса Антоновна Голибродо vasilisa2006@gmail.com

Введение. В настоящее время активно проводится поиск лекарственных средств, направленно воздействующих на специфические молекулярные или клеточные мишени опухолей. Таргетный противоопухолевый препарат аимпила представляет собой нековалентный комплекс альфа-фетопротейна (АФП) с атрактилозидом. Основой для его разработки послужила способность АФП как транспортного белка доставлять цитотоксические агенты в клетки, имеющие рецепторы к АФП.

Цель исследования — изучение токсичности препарата аимпила в хроническом эксперименте на кроликах.

Материалы и методы. В исследовании использовано 60 кроликов породы «Советская шиншилла», самцов и самок. Препарат в виде готовой лекарственной формы — желатиновых капсул — вводили перорально в 1 и 10 терапевтических дозах (0,05 и 0,5 мг/кг соответственно) ежедневно в течение 30 сут. В ходе исследования у животных определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса введений по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии и затем проводили патоморфологическое исследование их внутренних органов.

Результаты. Исследование показало, что ежедневное пероральное применение аимпила в течение 30 сут в дозе, эквивалентной 1 терапевтической, не оказывает влияния на клинико-лабораторные показатели и структуру органов и тканей кроликов. У животных, получавших высокую дозу препарата, были обнаружены признаки гепато-, нефро-, кардио- и гастроинтестинальной токсичности. Повреждения структуры печени, найденные при микроскопическом анализе, клинически выражались в виде достоверного увеличения уровня аспаратаминоотрансферазы в сыворотке крови. Морфологические изменения почек сопровождалось значимым повышением уровней уробилиногена и кетоновых тел в моче. Признаки кардио- и гастроинтестинальной токсичности выявлялись только при патоморфологическом исследовании органов. Обнаруженные изменения были обратимы в течение 30 сут.

Выводы. Выявленные токсические свойства лекарственной формы аимпила дозозависимы и обратимы. Препарат рекомендуется для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: аимпила, альфа-фетопротейн, атрактилозид, хроническая токсичность, кролики

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-61-66

EXPERIMENTAL EVALUATION OF TOXIC PROPERTIES OF TARGET ANTITUMOR DRUG AIMPILA

E.R. Pereverzeva¹, V.A. Golibrodov¹, M.I. Treshchalin¹, N.V. Eremkin¹, S.A. Tsurkan², I.D. Treshchalin¹

¹Gause Institute of New Antibiotics; 11 Bldg. 1 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia;

²Pharmaceutical Scientific Center “PharmAccess” Ltd.; of. 195, 10 Milashenkova St., 127322 Moscow, Russia

Background. Currently, the drugs, acting directly on tumor molecular or cellular targets, are actively designed. Target antitumor drug aimpila is atractyloside alpha-fetoprotein noncovalent complex. The development of this formulation is based on the ability of alpha-fetoprotein, as a transport protein, to deliver cytotoxic agents into the cells that have alpha-fetoprotein receptors.

Objective: to investigate the toxicity of aimpila in chronic experiment on rabbits.

Materials and methods. The study was performed in male and female “Soviet chinchilla” rabbits. Final drug formulation (aimpila in gelatin capsules) was administrated per os at 1 and 10 therapeutic doses (0.05 and 0.5 mg/kg respectively) for 30 days with interval of 24 h. During the study dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. Five animals in each group were sacrificed in days 1 and 30 post treatment, then their internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. The study demonstrates that the treatment with aimpila for 30 days in single therapeutic dose of 0.05 mg/kg had no effect on the clinical and laboratory parameters or the morphological structure of the internal organs of rabbits. Signs of hepato-, nephro-, cardio- and gastrointestinal toxicity were found in group of rabbits, treated with high dose of drug. The structural damages in liver were clinically supported with a significant increase of aspartate aminotransferase level in serum. Pathological changes in the kidneys were accom-

panied by a significant increase of urobilinogen and ketone bodies levels in the urine. Signs of cardio- and gastrointestinal toxicity were documented only by microscopic pathology observation. These abnormalities were reversible within 30 days.

Conclusions. Aimpila formulation displayed dose-dependent and reversible toxicity and can be recommended to further investigation.

Key words: aimpila, alpha-fetoprotein, atractyloside, chronic toxicity, rabbits

Введение

Используемые в настоящее время противоопухолевые препараты обладают низкой избирательностью действия, что приводит к развитию серьезных побочных эффектов. Повышение избирательности действия лекарственных средств может быть достигнуто введением в их состав векторных молекул, способных связываться со специфическими рецепторами, расположенными на поверхности клеток-мишеней [1]. Векторами могут служить различные биомолекулы, в частности онкофетальные белки. Так, для этой цели активно используется альфа-фетопrotein (АФП), рецепторы к которому были найдены в клетках опухолей определенного гистогенеза. К тому же АФП способен выполнять функцию транспортного белка и обладает свойством формировать конъюгаты и комплексы с различными, в том числе противоопухолевыми, агентами [2, 3].

Препарат аимпила, разработанный в ООО «Фармацевтический научный центр “ФармАксесс”», представляет собой нековалентный комплекс АФП с атрактилозидом (АТР). АТР — гликозид природного происхождения, воздействующий на митохондриальную функцию клеток и вызывающий в дальнейшем их апоптоз [4–6]. Аимпила проявила высокую противоопухолевую активность в экспериментальных исследованиях. Для дальнейшего продвижения препарата необходима оценка его побочного действия при длительном пероральном введении. Оптимальной моделью, позволяющей провести изучение токсических свойств лекарственной формы аимпила, рекомендуемой для клинического применения, являются кролики.

Материалы и методы

Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [7].

В эксперименте использовали 60 кроликов породы «Советская шиншилла», самцов и самок с массой тела 1,8–2,0 кг, полученных из питомника «Белый мох». После карантина в течение 2 нед были сформированы 6 групп (по 3 группы самцов и самок) по 10 животных. Кроликам экспериментальных групп перорально вводили желатиновые капсулы с индивидуально рассчитанным на массу тела каждого

кролика количеством капсульной массы. Состав капсульной массы был следующим: 0,001 г субстанции аимпила; 0,02 г лактозы; 0,112 г микрокристаллической целлюлозы 102; 0,007 г кремния диоксида коллоидного. Разовые дозы, эквивалентные 1 и 10 терапевтическим дозам (ТД), составляли 0,05 и 0,5 мг/кг соответственно. Величина ТД для кроликов была получена при пересчете с эффективной ТД для мышей с использованием k_m -фактора [8].

Клинико-лабораторные и патоморфологические исследования проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [9]. Перед началом введения определяли фоновые показатели (массу тела животного, клиническую картину крови). На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, регистрировали изменения массы тела, производили исследование состава периферической крови, устанавливая количество лейкоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, гемоглобина, лейкоцитарную формулу, величину гематокрита при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). Используя автоматический биохимический анализатор ChemWell (Awareness Technology Inc., США), на 1-е и 30-е сутки по окончании курса введений препарата в сыворотке крови животных определяли уровни аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы. В эти же сроки с использованием автоматического анализатора мочи Laura Smart (Erba Lachema, Чехия) производили клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза, нитраты) и регистрировали электрокардиограмму во II стандартном отведении при помощи электрокардиографа ЭК1Т-07 («Аксион», Россия).

Половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 1-е сутки после окончания курса, остальных — спустя 30 сут после окончания курса введений препарата. На вскрытии проводили исследование состояния органов грудной и брюшной полости. Сердце, печень, почки, селезенку и тимус взвешивали при помощи весов CE153-C («Сартогосм», Россия) и определяли их массовые коэффициенты. Участки органов фиксировали в 10 % нейтральном

формалине, по стандартной методике заливали в парафин, срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Полученные количественные данные подвергали статистической обработке при помощи компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel с использованием *t*-критерия Фишера–Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты

Ежедневное 30-кратное введение аимпила в изученных дозах не вызывало гибели животных, не оказывало влияния на прирост массы тела и поведенческие реакции.

На протяжении всего эксперимента клинические показатели периферической крови колебались в пределах физиологической нормы и не отличались от показателей контрольной группы.

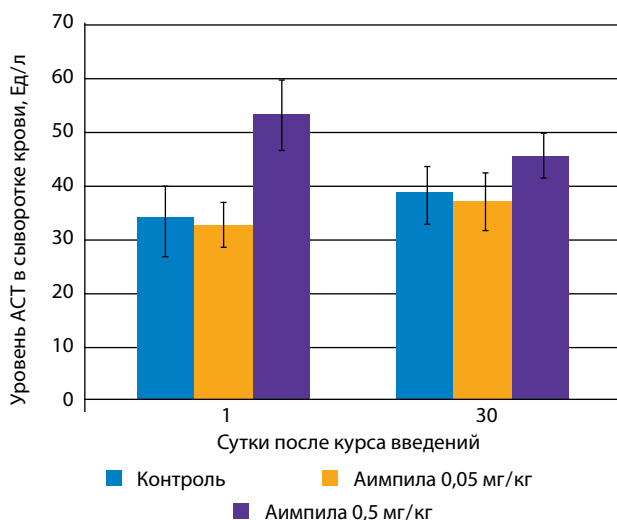


Рис. 1. Активность АСТ в сыворотке крови самцов кроликов на 1-е и 30-е сутки после курса введений аимпила

При биохимическом исследовании сыворотки крови на 1-е сутки после окончания курса введения аимпила в разовой дозе, 10-кратно превышающей ТД, как у самцов, так и у самок было зарегистрировано достоверное увеличение активности АСТ по сравнению с контрольной группой (рис. 1). На этом же сроке наблюдения при патоморфологическом исследовании были обнаружены изменения в ткани печени в виде микронекрозов вблизи порталных трактов и центральных вен, зернистой или вакуольной дистрофии гепатоцитов вокруг отдельных триад (рис. 2). К концу эксперимента уровень АСТ возвращался к нормальным значениям, структура печени восстанавливалась.

При исследовании состава мочи на 1-е и 30-е сутки после курса введений у кроликов, получавших препарат в обеих изученных дозах, было обнаружено достоверное по сравнению с контролем повышение уровня кетонных тел, а у животных, получавших препарат в большей дозе (0,5 мг/кг), — повышение уровня уробилиногена. Десятикратное превышение ТД приводило к возникновению дистрофических изменений эпителия извитых канальцев корковой и юкстамедуллярной зон почек, интерстициального и периваскулярного отека в юкстамедуллярной зоне (рис. 3), появлению клеточного детрита в просвете прямых канальцев мозговой зоны.

К 30-м суткам после курса введений препарата у большинства животных структура почек восстанавливалась. У отдельных животных на месте поврежденных канальцев формировались кисты.

Анализ электрокардиограммы кроликов, получавших препарат в обеих изученных дозах, не выявил его кардиотоксических свойств. При патоморфологическом исследовании было отмечено повреждающее действие препарата на структуру сердечной мышцы только у отдельных животных,

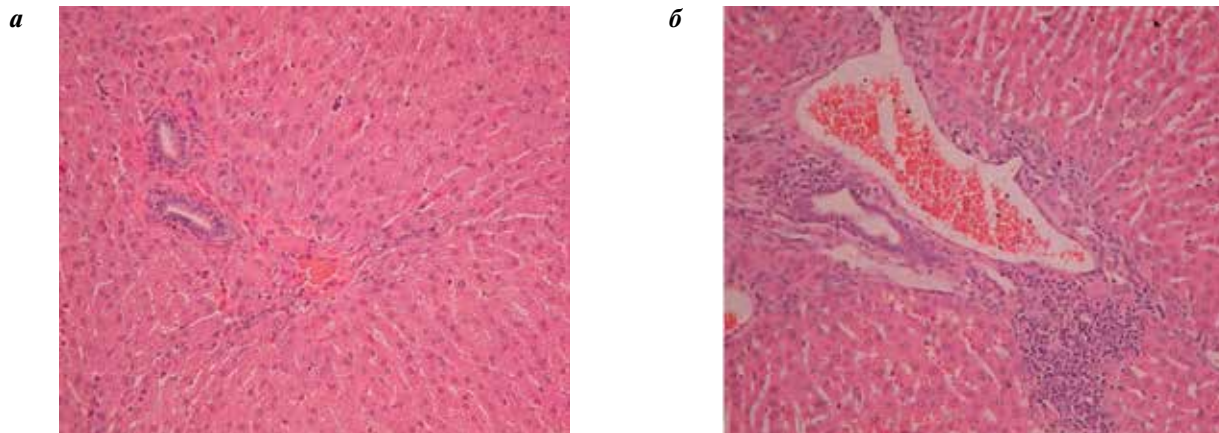


Рис. 2. Печень ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: очаг микронекроза вблизи триады

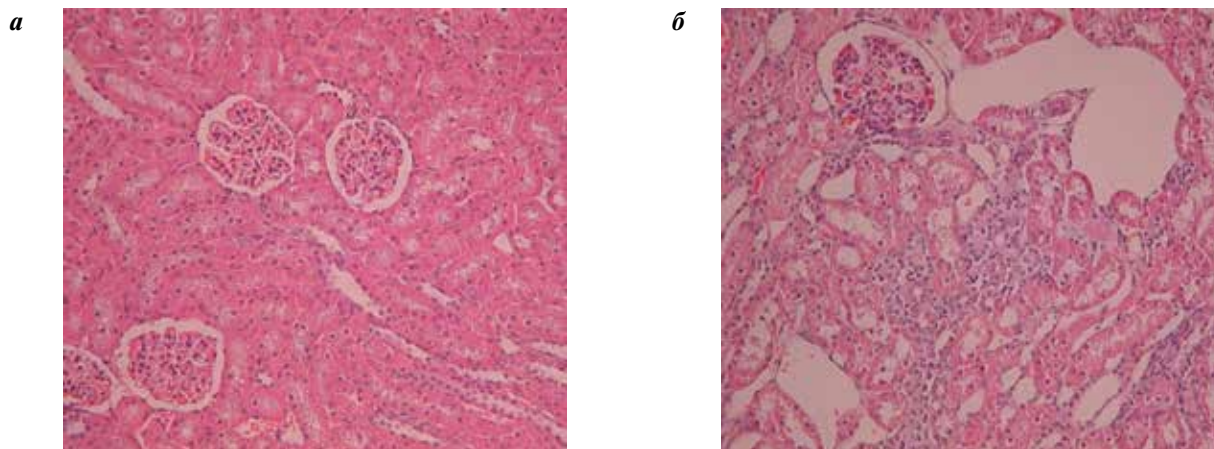


Рис. 3. Почки, юкстамедуллярная зона ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: сильный периваскулярный отек, резкое расширение просвета капсулы клубочка, очаги деструкции извитых канальцев

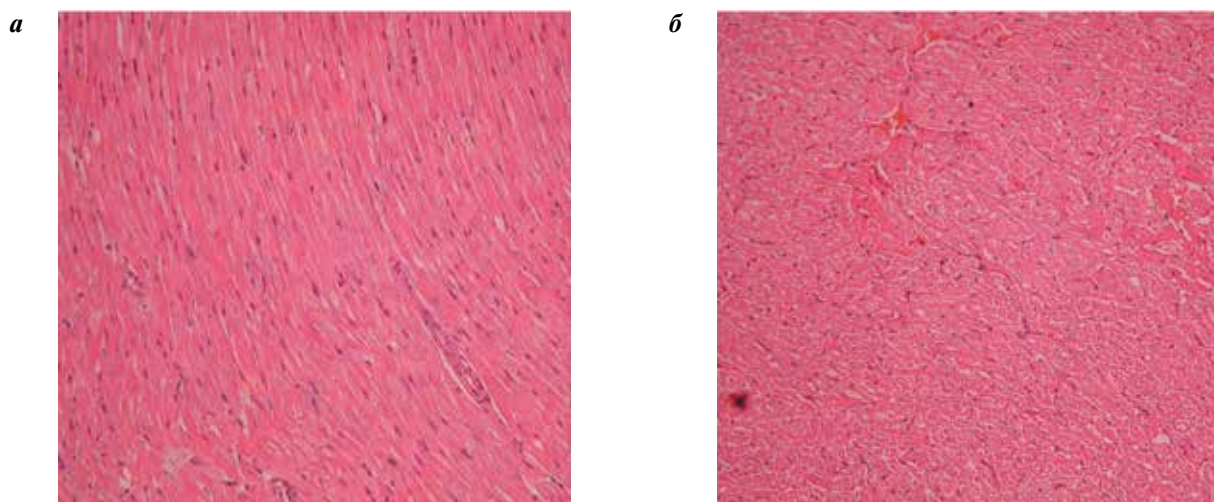


Рис. 4. Миокард ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: мелкие очаги токсической кардиомиопатии

получавших аимпилу в разовой дозе, 10-кратно превышающей ТД. Оно выражалось в появлении множественных мелких очагов токсической кардиомиопатии (рис. 4) и единичных крупных очагов отека интерстиция. К 30-м суткам после курса введений аимпилы происходило полное восстановление структуры миокарда.

Местно-тканевые реакции слизистой оболочки желудка на пероральное введение препарата в ТД были выражены слабо. При 10-кратном превышении ТД они выражались в изменении соотношения главных и обкладочных клеток в железах и умеренной очаговой атрофии эпителия желез и покровно-ямочного эпителия (рис. 5), которые проявлялись сразу после курса введений аимпилы. К 30-м суткам по окончании курса структура слизистой оболочки желудка полностью восстанавливалась.

Обсуждение

Одним из подходов к улучшению терапевтических свойств противоопухолевых препаратов является формирование таргетных конструкций с АФП, который специфически взаимодействует с АФП-рецепторами опухолевых клеток. Разработка векторных композиций такого рода может быть основана на создании конъюгатов, в которых АФП ковалентно связан с антибластомным агентом или же образует с ним нековалентный комплекс [2]. Так, были получены конъюгаты АФП с доксорубицином, блеомицином, карминомицином, дауномицином, эспермицином, исследования которых подтвердили наличие выраженной противоопухолевой активности наряду со снижением токсичности по сравнению со свободным препаратом [2, 10, 11]. Нековалентные АФП-комплексы обладают рядом преимуществ, среди которых наиболее важным является доставка

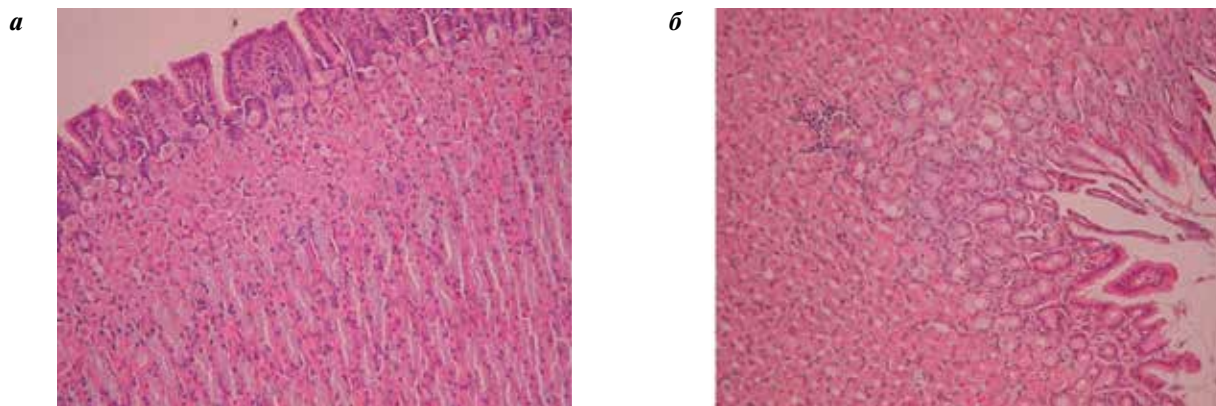


Рис. 5. Желудок ($\times 20$): а — интактный контроль; б — аимпила 0,5 мг/кг $\times$ 30 сут, 1-е сутки после курса введений: очаг атрофии и деструкции покровно-ямочного эпителия, мелкий лимфогистиоцитарный инфильтрат

высокотоксичных агентов непосредственно в опухолевую клетку [2].

Препарат аимпила представляет собой нековалентный комплекс АФП с АТР — токсином, используемым в народной медицине стран Южной Африки. Токсические свойства АТР известны: у людей при отравлении им возникают массивные некрозы в печени и почках [4, 6, 12]. Поскольку АФП даже при длительном применении в высоких дозах не оказывает повреждающего действия на структуру и функцию органов и тканей экспериментальных животных [13], обнаруженные в настоящем исследовании гепато- и нефротоксические эффекты, по-видимому, связаны с влиянием АТР. Одним из механизмов действия АТР является ингибирование окислительного фосфорилирования в митохондриях [4, 6, 12, 14], что обуславливает выраженное влияние этого соединения на клетки, богатые митохондриями, в частности гепатоциты и клетки проксимальных канальцев почек.

Гепато- и нефротоксические свойства АТР при парентеральном введении были изучены в экспериментах на лабораторных животных [4, 15–17]. Клинические и патоморфологические данные о его повреждающем действии на структуру и функцию печени, описанные в ряде работ [4, 16], совпадают с результатами настоящего исследования, что подтверждает предположение о том, что токсические свойства аимпила определяются токсичностью АТР.

При изучении нефротоксичности АТР было показано, что даже однократное внутрибрюшинное введение этого соединения крысам и мышам

в переносимых дозах приводит к повреждению проксимальных канальцев. Влияние на ткань почек морских свинок и кроликов было обнаружено при введении летальных доз АТР [4, 15]. В настоящем исследовании, проведенном на кроликах, аимпила при длительном применении в высокой дозе, 10-кратно превышающей ТД, также проявила нефротоксические свойства, близкие по морфологическим и клиническим проявлениям к тем, которые были описаны для АТР.

Морфологическое проявление кардиотоксичности аимпила, вероятно, объясняется изменением биодоступности АТР к клеткам миокарда, так как, по данным литературы, АТР не оказывает влияния на структуру и функцию сердца [6, 15, 18].

Таким образом, проведенное токсикологическое изучение лекарственной формы препарата аимпила позволяет сделать вывод о ее безвредности при применении в ТД.

Выводы

Курсовое применение пероральной лекарственной формы аимпила в ТД не оказывает влияния на структуру и функции основных органов и систем кроликов. При значительных передозировках возможно проявление гепато-, нефро- и кардиотоксических свойств препарата. Выявленная зависимость повреждающего действия аимпила от величины примененной дозы и обратимость токсических эффектов позволяют рекомендовать изученную лекарственную форму аимпила для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Северин С.Е., Москалева Е.Ю., Посыпанова Г.А. Таргетная терапия рака. Природа 2013;12:71–7.

2. Pak V. The use of a-fetoprotein for the delivery of cytotoxic payloads to cancer cells. Ther Deliv 2014;5(8):885–92.

DOI: 10.4155/tde.14.59. PMID: 25337646.
3. Posypanova G.A., Gorokhovets N.V., Makarov V.A. et al. Recombinant alpha-

- fetoprotein C-terminal fragment: the new recombinant vector for targeted delivery. *J Drug Target* 2008;16(4): 321–8. PMID: 18446611.
4. Daniele C., Dahamna S., Firuzi O. et. al. *Atractylis gummifera* L. poisoning: an ethnopharmacological review. *J Ethnopharmacol* 2005;97:175–81. DOI: 10.1016/j.jep.2004.11.025. PMID: 15707749.
 5. Obatomi D.K., Bach P.H. Selective cytotoxicity associated with *in vitro* exposure of fresh rat renal fragments and continuous cell lines to atractyloside. *Arch Toxicol* 1996;71(1–2):93–8. PMID: 9010590.
 6. Stewart M.J., Steenkamp V. The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* 2000;22(6): 641–9. PMID: 11128230.
 7. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS 1986:123.
 8. Freireich E.J., Gehan E.A., Rall D.P. et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man. *Cancer Chemother Rep* 1966;50(4):219–44. PMID: 4957125.
 9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. Часть I. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 13–24.
 10. Feldman N.B., Kiselev S.M., Gukasova N.V. et al. Antitumor activity of alpha-fetoprotein conjugate with doxorubicin in vitro and in vivo. *Biochemistry* 2000;65(8):967–71. PMID: 11002192.
 11. Nikolskaya E.D., Zhunina O.A., Yabbarov N.G. et al. Development of target delivery system based on actinomycin class drugs and recombinant alpha-fetoprotein. *Dokl Biochem Biophys* 2017;473(1):148–50. DOI: 10.1134/S1607672917020156. PMID: 28510139.
 12. Barceloux D.G. Medical toxicology of natural substances. Foods, fungi, medicinal herbs, plants and venomous animal. California: John Wiley & Sons, 2008. Pp. 514–517.
 13. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротеин. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. С. 104–129.
 14. Obatomi D.K., Thanh N.T., Brant S., Bach P.H. The toxic mechanism and metabolic effects of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices. *Arch Toxicol* 1998;72(8):524–30. PMID: 9765068.
 15. Carpenedo F., Luciani F., Scaravilli F. et al. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Arch Toxicol* 1974;32(3):169–80. PMID: 4479740.
 16. Hedili A., Warnet J., Thevenin M., Martin C. et.al. Biochemical investigation of *Atractylis gummifera* L. hepatotoxicity in the rat. *Arch Toxicol Suppl* 1989;13:312–5. PMID: 2774952.
 17. Koechel D.A., Krejci M.E. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contribute to its acute nephrotoxicity in pentobarbital-anesthetized dogs. *Toxicology* 1993;79(1):45–66. PMID: 8475499.
 18. Gilmour R.F.Jr., Williams E.S., Farmer B.B., Zipes D.P. Effects of carnitine and atractyloside on canine cardiac electrical activity. *Am J Physiol* 1981;241(4):505–12. PMID: 7315975.

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ДИМЕРНОГО МАКРОЦИКЛИЧЕСКОГО ТАНИНА

З.С. Шпрах¹, Е.В. Игнатьева¹, И.В. Ярцева¹, С.А. Сасов¹, О.Л. Орлова¹,
А.П. Полозкова¹, Д.А. Хоченков¹, А.М. Королев², Н.М. Малютина²

¹ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;

Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;

Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11

Контакты: Елена Владимировна Игнатьева chem_analysis@ronc.ru

Введение. В последнее время наблюдается устойчивый интерес к скринингу противоопухолевых и антиангиогенных веществ, блокирующих несколько механизмов активации ангиогенеза в опухоли. В качестве ингибиторов ангиогенеза большое внимание уделяется разработке эффективных и малотоксичных лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья. Настоящая статья посвящена стандартизации лекарственной формы димерного макроциклического танина (ДМТ), выделенного в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из соцветий кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub и представляющего значительный интерес в качестве антиангиогенного средства.

Цель исследования — выбор критериев качества для стандартизации препарата «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Материалы и методы. В работе использованы лекарственная форма «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг» и субстанция ДМТ. Методы исследования: спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография, потенциометрия, поляриметрия.

Результаты. С учетом требований Государственной фармакопеи РФ XIII издания к препаратам для инъекций выбраны критерии качества лиофилизированной лекарственной формы ДМТ и разработаны методики их определения.

Выводы. Путем лабораторных исследований показано, что выбранные критерии качества и разработанные для их определения методики позволяют корректно контролировать качество лекарственной формы «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Ключевые слова: димерный макроциклический танин, физико-химические характеристики, стандартизация, количественный анализ

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-67-73

STANDARDIZATION OF LYOPHILIZED DOSAGE FORM OF DIMERIC MACROCYCLIC TANNIN

Z.S. Shprakh¹, E.V. Ignat'eva¹, I.V. Yartseva¹, S.A. Sasov¹, O.V. Orlova¹,
A.P. Polozkova¹, D.A. Hochenkov¹, A.M. Korolev², N.M. Malyutina²

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;

24 Kashyrskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

²G.F. Gause Institute of New Antibiotics; 11 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119435, Russia

Background. Over the last years the studies have increased interest in screening antitumor and anti-angiogenic substances that block several mechanisms of angiogenesis activation in tumors. A great attention is paid to development of effective and low toxic drugs as inhibitors of angiogenesis which are derived from herbal raw material. The article is devoted to the results of standardization of the dosage form of dimeric macrocyclic tannin (DMT) obtained from *Chamerion angustifolium* (L.) Holub in N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, which has a great potential as an antiangiogenic agent.

Objective: to determine quality criteria for standardization of the drug “DMT, lyophilisate for preparation of solution for injections 100 mg”.

Materials and methods. The study used “DMT, lyophilisate for preparation of solution for injections 100 mg” and DMT substance. Methods: spectrophotometry, infrared spectroscopy, high performance liquid chromatography, potentiometry, polarimetry.

Results. Quality criteria for lyophilized DMT dosage form were determined with the account of Russian State Pharmacopoeia (XIII edn.) requirements to the drugs for injections and methods for their evaluation were defined.

Conclusions. Laboratory studies demonstrated that the determined quality criteria and the defined methods for their evaluation are feasible for adequate quality control of dosage form “DMT, lyophilisate for preparation of solution for injections 100 mg”.

Key words: dimeric macrocyclic tannin, physicochemical characteristics, standardization, quantitative analysis

Введение

В настоящее время активно разрабатываются новые подходы к лекарственному лечению злокачественных новообразований, такие как антиангиогенная терапия, основанная на подавлении роста в опухоли новых сосудов, и васкулярная терапия, направленная на уничтожение уже сформированных опухолевых микрососудов. Обнаружение молекулярных маркеров, дающих возможность адекватно оценивать активность ангиогенеза опухоли, и идентификация сигнальных систем, регулирующих неоангиогенез опухоли, способствуют выявлению новых молекулярных мишеней для разработки противоопухолевых лекарственных препаратов, нацеленных на подавление ангиогенной активности опухоли [1]. В последнее время наблюдается устойчивый интерес к скринингу противоопухолевых и антиангиогенных веществ, блокирующих несколько механизмов активации опухолевого ангиогенеза. В качестве ингибиторов ангиогенеза большое внимание уделяется разработке и внедрению в практику здравоохранения эффективных и малотоксичных лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья [2, 3]. Для получения достоверных результатов доклинических и клинических исследований необходимо, чтобы отобранные в результате скрининга соединения и разработанные на их основе лекарственные формы обладали определенными точно измеренными физическими и химическими параметрами, т. е. были стандартны.

Цель исследования — выбор критериев качества для стандартизации лекарственной формы (ЛФ) димерного макроциклического танина (ДМТ), выделенного в ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» («НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина») Минздрава России из соцветий кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub [4] и представляющего значительный интерес в качестве антиангиогенного средства.

Материалы и методы

Препараты и реактивы. Субстанция-порошок ДМТ и ЛФ «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг» (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России); железа (III) хлорид, ацетонитрил 99,9 % HPLC-gradient grade PAI-ACS для ультрафиолетовой спектроскопии при длине волны 210 нм, муравьиная

кислота 98 % PA-ACS (PanReac AppliChem, Испания); вода деионизированная (Milli-Q Water Purification System, США).

Приборы. Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США), инфракрасный (ИК) Фурье-спектрометр Nicolet-iS10 (детектор DTGS, светоделиитель KBr) (Thermo Fisher Scientific, США), поляриметр Unipol L (Schmidt + Haensch GmbH & Co., Германия), жидкостный хроматограф LC-20 Prominence серии AD с фотодиодно-матричным детектором (Shimadzu Corporation, Япония), весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия), pH-метр pH-211 (Hanna Instruments, Германия), электрошкаф сушильный ED 23 (Binder, Германия).

Методика определения содержания родственных примесей (метод высокoeffективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ)). Для приготовления испытуемого раствора около 6,25 мг (точная навеска) ЛФ ДМТ помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяли в воде дистиллированной и доводили водой до метки. В качестве раствора стандартного образца (СО) использовали раствор субстанции ДМТ в том же разведении. Растворы использовали свежеприготовленными. Перед введением в петлю раствора разводили в 2 раза подвижной фазой А.

Определение содержания примесей проводили с использованием аналитического жидкостного хроматографа LC-20 Prominence серии AD с фотодиодно-матричным детектором. Хроматографирование проводили на колонке Kromasil (AkzoNobel, Швеция) C-18, 5 мкм, длина 250 мм, внутренний диаметр 4 мм. Градиент АВ: 100 % А (0 мин) — 0 % В (15 мин), 0 % А (15 мин) — 100 % В (25 мин). Подвижная фаза А — смесь вода—ацетонитрил—кислота муравьиная в соотношении 900: 99,96: 0,04 (по объему), подвижная фаза В — смесь вода—ацетонитрил—кислота муравьиная в соотношении 300: 699,72: 0,28 (по объему). Скорость потока элюента — 1,0 мл/мин, температура колонки — 25 °С; детектирование проводили при длине волны 263 нм. Объем анализируемой пробы составил 20 мкл, время хроматографирования — 25 мин, время удерживания основного пика ДМТ — $12,40 \pm 0,50$ мин.

Результаты анализа считали достоверными, если выполнялись требования теста «Проверка пригодности хроматографической системы», который проводили, хроматографируя не менее 5 раз раствор СО.

Хроматографическую систему признавали пригодной, если выполнялись следующие условия:

- разрешение между пиком примеси с относительным временем удерживания около 1,59 и пиком основного вещества не менее 11,9 мин;
- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикку основного вещества, не менее 5506 теоретических тарелок;
- относительное стандартное отклонение площади пика основного вещества не более 2 %;
- фактор асимметрии пика не более 1,4.

Содержание любой единичной примеси в препарате (X, %) рассчитывали по формуле

$$X = \frac{S_i}{S_1 + S_2 + \dots + S_i} \times 100,$$

где S_i — площадь пика любой единичной примеси на хроматограмме испытуемого раствора, $S_1 + S_2 + \dots + S_i$ — суммарная площадь пиков на хроматограмме испытуемого раствора.

Методика количественного определения ДМТ в ЛФ (метод спектрофотометрии). Для приготовления испытуемого раствора содержимое флакона растворяли в дистиллированной воде, переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки водой, затем 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки водой. В качестве раствора СО использовали раствор 100 мг ДМТ в том же разведении. Растворы использовали свежеприготовленными.

Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили параллельно с измерением оптической плотности раствора СО относительно воды в максимуме при длине волны 265 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание ДМТ (X, мг) во флаконе вычисляли по формуле

$$X = \frac{D_1 \times a_0 \times P}{D_0 \times 100},$$

где D_1 — оптическая плотность испытуемого раствора, D_0 — оптическая плотность раствора СО, a_0 — навеска СО (мг), P — содержание ДМТ в растворе СО (%).

Результаты и обсуждение

ДМТ, выделенный в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России из соцветий кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) Holub [4], представляет собой комплекс макроциклических танинов, основной частью (около 90 %) которого является димерный танин со структурной формулой, представленной на рис. 1.

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России разработана ЛФ ДМТ в виде

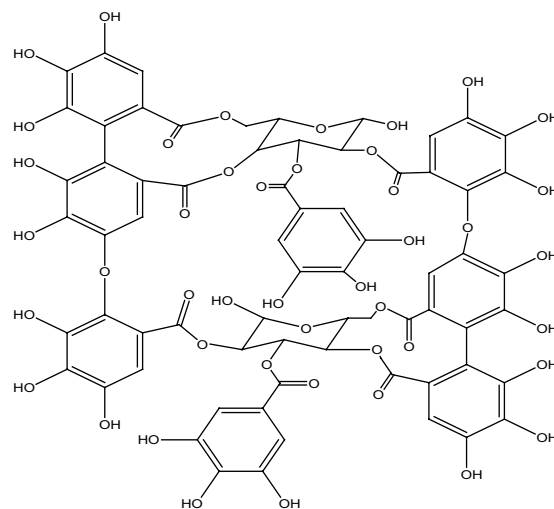


Рис. 1. Химическая структура ДМТ

лиофилизата для приготовления раствора для инъекций, не содержащая вспомогательных веществ.

Химико-фармацевтическое изучение ЛФ ДМТ выполняли с учетом требований нормативной документации к сухим ЛФ для инъекций [5–7]. Исследования проводили на 3 сериях препарата. Все образцы представляли собой сухую пористую массу белого цвета с желтоватым оттенком, без запаха. Средняя масса содержимого флакона составляла от 0,105 до 0,113 г, отклонение массы каждого флакона от средней массы флакона не превышало ± 10 %, что соответствует требованиям Государственной фармакопеи (ГФ) РФ XIII издания. Содержимое флакона образцов ЛФ ДМТ растворяли в 20 мл воды в течение 30 с [8]. Полученные растворы были прозрачны, интенсивность их окраски не превышала интенсивность окраски эталона Y_6 . При наблюдении в проходящем свете в испытуемых растворах не обнаруживались частицы вещества, а величина рН находилась в пределах от 3,5 до 3,6. Все серии ЛФ ДМТ прошли испытания на наличие механических включений [9].

ДМТ является полифенольным соединением (см. рис. 1), поэтому для подтверждения подлинности препарата использовали электронные спектры поглощения (ЭСП) [10], ИК-спектры [11] и цветную качественную реакцию на полифенолы [12]. ДМТ легко окисляется солями окисного железа, образуя окрашенные продукты (при добавлении к водному раствору ЛФ раствора железа (III) хлорида появляется темно-синее окрашивание).

Ароматические циклы, входящие в состав молекулы ДМТ, ответственны за поглощение излучения в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. ЭСП 0,002 % водных растворов образцов ЛФ ДМТ в области от 200 до 350 нм имели максимумы поглощения при длинах волн 215 ± 2 и 265 ± 2 нм и полностью совпадали с ЭСП раствора субстанции ДМТ (рис. 2, 3).

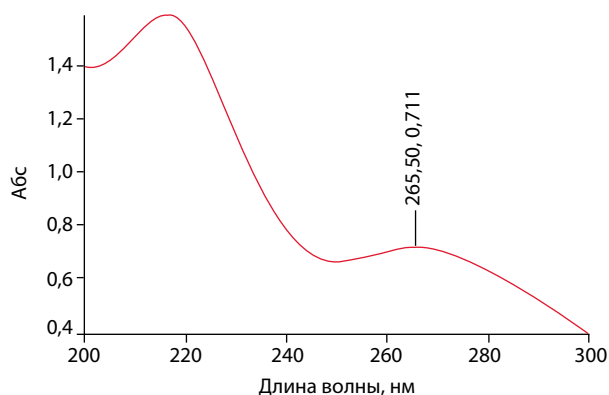


Рис. 2. ЭСП водного раствора субстанции ДМТ

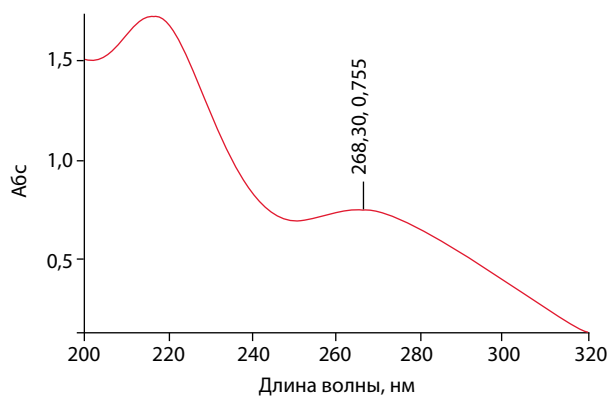


Рис. 3. ЭСП раствора ЛФ ДМТ серии 1

ИК-спектры образцов ЛФ ДМТ в области от 4000 до 400 см^{-1} содержат полосы поглощения, связанные с различными колебаниями связей замещенных бензольных циклов [1616, 1508, 1452, 870, 833, 745, 729 см^{-1}], полосы поглощения, связанные с углеводным циклом [1197, 1033, 600 см^{-1}] и указывающие на присутствие в молекуле пиранозного кольца в конформации C_1 [910, 765 см^{-1}]; в ИК-спектре ДМТ

имеются полосы, соответствующие валентным и деформационным колебаниям связи О—Н [3317, 1318, 1196, 1033 см^{-1}], а также валентным колебаниям карбонильной группы, характерным для альдегидов, карбоновых кислот и сложных эфиров [1729 см^{-1}].

ИК-спектры образцов ЛФ ДМТ (0,5 мг в 100 мг калия бромида) идентичны ИК-спектрам его субстанции, записанным в тех же условиях, имеют специфический рисунок и подтверждают структуру ДМТ (рис. 4).

ДМТ является оптически активным веществом. Величина угла оптического вращения может служить показателем подлинности и качества препарата. Результаты, полученные для исследуемых образцов ЛФ, в которых содержание основного действующего вещества составляло 87–90 % в пересчете на высушенное вещество, укладывались в интервал от $+300^\circ$ до $+315^\circ$.

ДМТ выделен из растительного сырья и даже при очень тщательной очистке содержит примеси полифенольной природы (галловую и валониевую кислоты, их ангидриды и др.). Определение содержания примесей в ЛФ ДМТ проводили методом ВЭЖХ. На хроматограммах были обнаружены пики основного вещества — ДМТ — с временем удерживания (retention time, RT) $12,4 \pm 0,5$ мин, пик основной примеси с RT $19,5 \pm 0,5$ мин и несколько малоинтенсивных пиков с RT от 22 до 24 мин (рис. 5). Основная примесь к ДМТ была выделена с помощью ВЭЖХ. Пик на хроматограмме был уширенным, и его исследование методом масс-спектрометрии показало, что примесь неиндивидуальна и содержит 3 основных вещества с массами m/z 1699,7605; 1556,6610; 1394,5975 [M]⁺. Следует отметить, что, в отличие от ДМТ, вещества из этой смеси не образуют отрицательных ионов, т. е. не содержат карбоксильные группы.

Содержание единичной примеси в препарате рассчитывали методом внутренней нормализации.

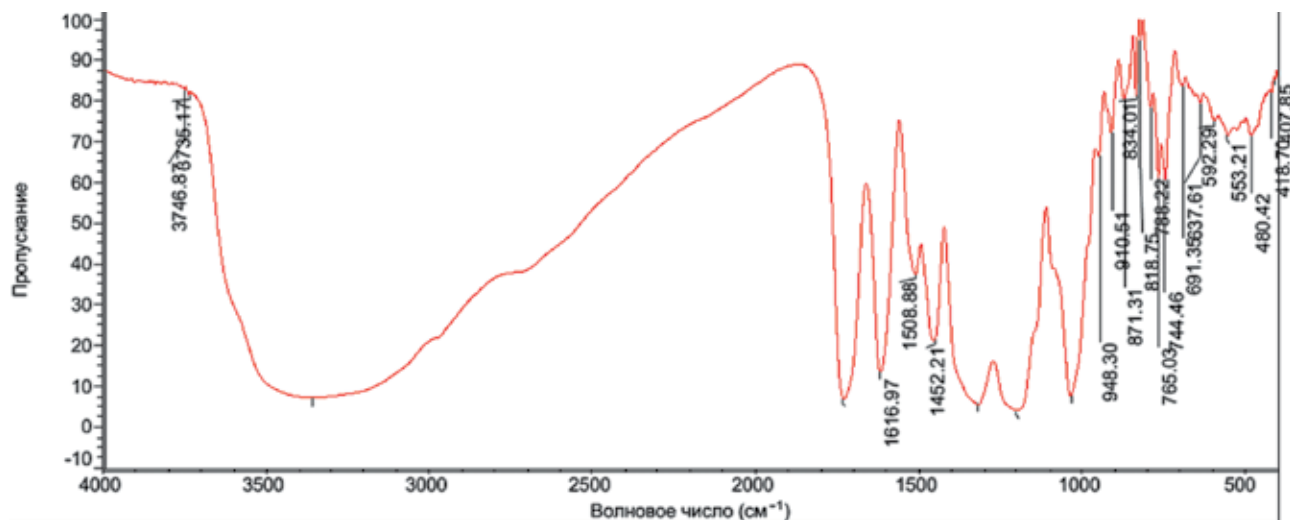


Рис. 4. ИК-спектр ЛФ ДМТ серии 2

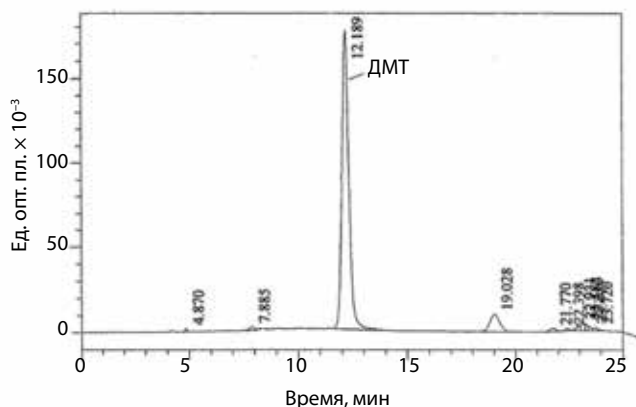


Рис. 5. ВЭЖХ-хроматограмма ЛФ ДМТ

Для всех представленных для анализа серий ЛФ содержание основной примеси с $RT\ 19,5 \pm 0,5$ мин находилось в пределах от 4 до 6 %, суммарное содержание примесей не превышало 12 %.

ДМТ содержит большое число гидроксильных и карбоксильных групп и способен образовывать с низкомолекулярными соединениями (водой, растворителями) вандерваальсовы и ковалентные связи. Изучение условий высушивания ДМТ показало, что в мягких условиях препарат очень медленно теряет массу (табл. 1), однако легко высушивается в течение 3 ч при нагревании при атмосферном давлении в сушильном шкафу при температуре $125\ ^\circ\text{C}$ (табл. 2). Потеря в массе для образцов ЛФ в этих условиях не превышала 3,5 % от массы исходной навески.

Вещество, высушенное таким образом, сохраняет характеристический ИК-спектр (см. рис. 4, 6). Высушивание при более высокой температуре приводит к окислительной деструкции препарата.

Для количественного определения основного действующего вещества в ЛФ ДМТ был выбран метод прямой спектрофотометрии, который прост в исполнении, требует незначительного количества

Таблица 1. Потеря в массе ЛФ ДМТ при высушивании до постоянной массы над P_2O_5 при комнатной температуре и остаточном давлении 7 мм рт. ст.

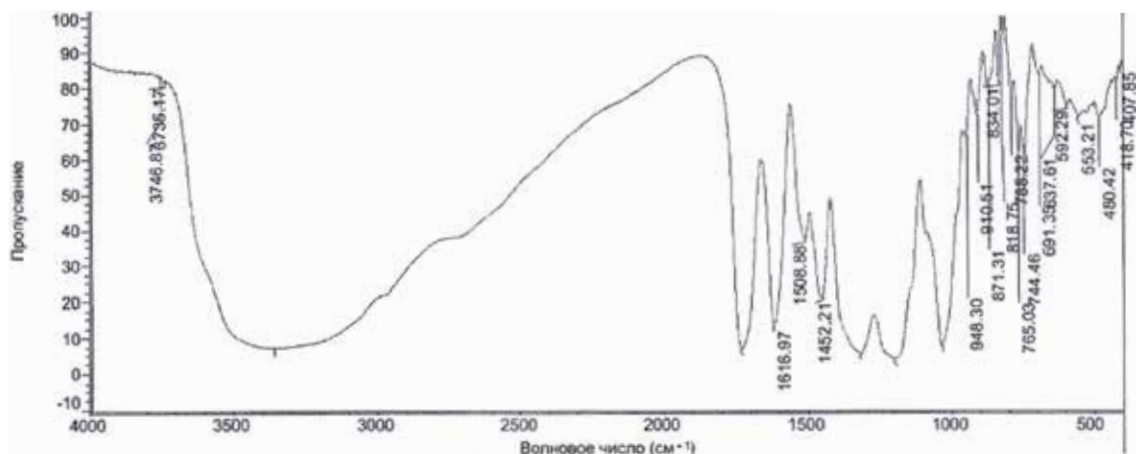
№ серии	Масса навески, г	Время высушивания, сут	Потеря в массе, %
Серия 1	0,11556	0	0
	0,11201	7	3,07
Серия 3	0,10879	0	0
	0,10502	7	3,46

Таблица 2. Потеря в массе ЛФ ДМТ при высушивании в течение 3 ч при нагревании и атмосферном давлении

№ серии	Потеря в массе, %			
	$60\ ^\circ\text{C}$	$80\ ^\circ\text{C}$	$105\ ^\circ\text{C}$	$125\ ^\circ\text{C}$
Серия 1	отсутствует	1,5	2,6	3,1
Серия 2	отсутствует	1,3	2,2	2,6
Серия 3	отсутствует	1,5	2,7	3,3

анализируемого вещества, отличается достаточной точностью (относительная ошибка не превышает $\pm 2\%$) и чувствительностью [10].

В ЭСП водного раствора субстанции ДМТ в области от 200 до 350 нм, как было указано выше, максимумы поглощения наблюдаются при длинах волн 215 ± 2 и 263 ± 2 нм и совпадают с максимумами в ЭСП ЛФ ДМТ (см. рис. 2, 3). Известно, что чем в более коротковолновой области спектра расположена полоса поглощения, тем сильнее (при прочих равных условиях) искажения из-за немонахроматичности излучения [12], поэтому в качестве аналитического сигнала выбран максимум при длине волны 265 нм.

Рис. 6. ИК-спектр ЛФ ДМТ серии 2 после нагревания при температуре $125\ ^\circ\text{C}$

Для проверки соблюдения закона Бугера—Ламберта—Бера при данном максимуме поглощения готовили растворы субстанции ДМТ в воде в диапазоне концентраций от 0,03 до 0,01 мг/мл. График зависимости оптической плотности от концентрации раствора представлен на рис. 7.

Из графика видно, что во всем исследуемом диапазоне концентраций наблюдается линейная зависимость оптической плотности от концентрации раствора, т. е. закон Бугера—Ламберта—Бера соблюдается при данном максимуме поглощения. Рабочей концентрацией раствора ДМТ выбрали концентрацию 0,006–0,008 мг/мл; при этом величина оптической плотности укладывалась в интервал, рекомендуемый ГФ РФ [6]. ЛФ ДМТ не содержит вспомогательных веществ, которые могли бы оказывать влияние на спектральные характеристики действующего вещества, поэтому в качестве раствора сравнения использовали воду. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении действующего вещества в спектрофотометрическую методику ввели способ расчета по СО. В качестве

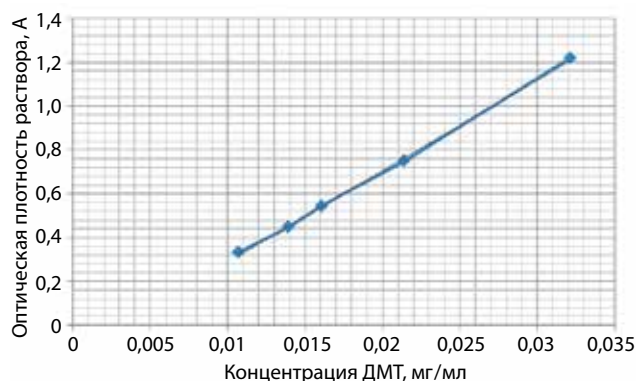


Рис. 7. Зависимость оптической плотности от концентрации раствора ДМТ

СО использовали субстанцию ДМТ, из которой произведены серии испытуемой ЛФ. Ошибка определения ДМТ в ЛФ по данной методике составила около 1 %, что указывает на достаточную точность разработанной методики анализа (табл. 3).

Экспериментальные данные, полученные в результате проведенной работы, представлены в табл. 4.

Таблица 3. Результаты количественного определения ДМТ в его ЛФ

Показатель	№ образца					
	1	2	3	4	5	6
Оптическая плотность	0,856	0,871	0,863	0,851	0,869	0,866
Содержание ДМТ в ЛФ, мг	99,6	101,4	100,5	99,0	101,1	100,8
Метрологические характеристики	$n = 6, f = 5, \bar{x} = 100,4, S^2 = 0,852, S = 0,92304, S_x = 0,37683, P = 95 \%, t_{p, f} = 2,57, \Delta \bar{x} = 0,969, \varepsilon = 0,96 \%$					

Примечание. Масса навески СО = 105,912 мг, содержание ДМТ в СО (Р) = 84,07 %, оптическая плотность СО = 0,765.

Таблица 4. Показатели качества ЛФ «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг»

№ серии	Средняя масса во флаконе, г	Прозрачность раствора	Цветность раствора	pH	Родственные примеси (сумма), %*	Удельное вращение $[\alpha]^{20}_D$	Потеря в массе при высушивании, %	Количественное содержание ДМТ, мг
Серия 1	0,105	Раствор содержимого флакона в 20 мл воды прозрачен	Интенсивность окрашивания раствора, полученного в испытании на прозрачность, не превышает эталон Y_6	3,6	10,2	+307,0	3,1	97,2
Серия 2	0,110	То же	То же	3,5	9,6	+307,0	2,6	100,4
Серия 3	0,113	То же	То же	3,5	11,0	+305,0	3,3	98,2

* Данные ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе».

Выводы

Полученные в настоящей работе данные позволяют выбрать критерии качества лиофилизированной ЛФ ДМТ в соответствии с требованиями ГФ РФ к препаратам для инъекций. Разработана методика определения содержания примесей в ЛФ ДМТ методом ВЭЖХ. Для количественного анализа ЛФ ДМТ разработана спектрофотометрическая методика с использованием

СО, позволяющая с достаточно высокой точностью определять содержание действующего вещества в ЛФ.

Выбранные критерии дают возможность корректно контролировать качество ЛФ ДМТ. Полученный экспериментальный материал использован для составления спецификации и фармакопейной статьи предприятия ЛФ «ДМТ, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

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

1. Карамышева А.Ф. Антиангиогенная терапия: надежды и разочарования. Сигнальные системы, регулирующие ангиогенез опухоли, и их изменение при опухолевой прогрессии. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2013. 250 с.
2. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Григорьева И.Н., Барышников А.Ю. Оценка антиангиогенной активности экстрактов растений и их фракций, произрастающих на территории России. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(2):56.
3. Соломко Э.Ш., Степанова Е.В., Абрамов М.Е. и др. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии. Российский биотерапевтический журнал 2010;9(4):3.
4. Сасов С.А., Толкачев В.Н., Ярцева И.В., Толкачев О.Н. Макроциклические танины кипрея узколистного. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии 2010;10:24–9.
5. ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения».
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. 13-е изд. Т. 1, 2. М., 2015.
7. Федеральный Закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» от 24 марта 2010 г.
8. Игнатьева Е.В., Ярцева И.В., Дмитричева Н.А. и др. Оценка качества лиофилизированной лекарственной формы ДМТ. Материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(спецвыпуск):40–1.
9. ОФС 1.4.2.0005.15 «Видимые механические включения в лекарственных формах для парентерального применения и глазных лекарственных формах».
10. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд., перераб. Л.: Химия, 1986. 431 с.
11. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 200–234.
12. Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т. Органический анализ. Л.: Химия, 1981. С. 75.

ИССЛЕДОВАНИЕ УРОВНЯ И СЕЛЕКТИВНОСТИ НАКОПЛЕНИЯ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТЕТРА-3-ФЕНИЛТИОФТАЛОЦИАНИНА ГИДРОКСИАЛЮМИНИЯ НА ОПУХОЛЕВЫХ МОДЕЛЯХ МЫШЕЙ ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ПЕРЕВИВКИ

Г.А. Меерович^{1,2}, Л.М. Борисова³, А.П. Будько³, М.П. Киселева², Л.Л. Николаева^{2,5},
И.Г. Меерович⁴, А.В. Ланцова³, С.В. Чернова⁵, Н.А. Оборотова^{3,5}

¹ФГБУН «Институт общей физики им. А.М. Прохорова» РАН; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 38;

²Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ»; Россия, 115409 Москва, Каширское ш., 31;

³ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24;

⁴ФИЦ биотехнологии РАН; Россия, 119071 Москва, Ленинский проспект, 33, стр. 2;

⁵ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)» Минздрава России;
Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

Контакты: Геннадий Александрович Меерович meerovich@mail.ru

Введение. Настоящая работа посвящена исследованию уровня и селективности накопления в опухоли инфракрасного фотосенсибилизатора (ФС) тетра-3-фенилтиофталлоцианина гидроксиалюминия в липосомальной лекарственной форме по отношению к нормальным тканям.

Цель исследования — изучение уровня и селективности накопления ФС на опухолевых моделях мышей при внутримышечной и подкожной перевивке с целью выбора оптимального способа перевивки и сроков начала проведения фотодинамической терапии.

Материалы и методы. В работе использовали перевиваемые опухоли мышей: солидные варианты карциномы Эрлиха (ELD) и саркомы S-37, эпидермоидную карциному легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC) и аденокарциному толстой кишки (АКАТОЛ). Исследование провели на половозрелых иммунокомпетентных мышцах-гибридах (CBA × C57Bl/6)F1, (C57Bl/6 × DBA/2)F1 и мышцах линий C57Bl/6 и BALB/c. Для оценки уровня липосомальной лекарственной формы ФС в тканях применяли спектрально-флуоресцентный метод.

Результаты. Карциному Эрлиха (ELD) для обеспечения высокого накопления ФС целесообразно перевивать внутримышечно. Через 5 ч после введения концентрация ФС в опухоли составляет более 7 мг/кг, индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, равен 3. На саркоме S-37 при подкожной перевивке высокая концентрация ФС в ткани опухоли наблюдается через 5 ч после введения и составляет 5,4 мг/кг, индекс селективности накопления достигает 4,3. LLC целесообразно перевивать внутримышечно. Через 5 ч после введения концентрация ФС в опухоли составляет более 7,5 мг/кг, индекс селективности накопления превышает 4. На АКАТОЛ при внутримышечной перевивке через 7 ч после введения концентрация ФС в опухоли составляет 6,8 мг/кг, индекс селективности накопления — около 2.

Выводы. Липосомальная лекарственная форма ФС при внутривенном введении селективно накапливается в ткани опухоли. Полученные экспериментальные данные позволяют рекомендовать способ перевивки представленных опухолевых моделей мышей при исследованиях ФС.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, опухоль, накопление, селективность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-74-79

STUDY OF LEVEL AND SELECTIVITY OF LIPOSOMAL FORM OF PHOTSENSITISER HYDROXYALUMINIUM TETRA-3-PHENYLTHIOPHTHALOCYANINE ACCUMULATION ON TRANSPLANTABLE MICE TUMOR MODELS AT DIFFERENT WAYS OF TRANSPLANTATION

G.A. Meerovich^{1,2}, L.M. Borisova³, A.P. Bud'ko³, M.P. Kiseleva², L.L. Nikolaeva^{2,5},
I.G. Meerovich⁴, A.V. Lantsova³, S.V. Chernova⁵, N.A. Oborotova^{3,5}

¹Prokhorov General Physics Institute, RAS; 38 Vavilova St., Moscow 119991, Russia;

²National Research Nuclear University "MEPhI", 31 Kashirskoe Sh., Moscow 15409, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology; 24 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia;

⁴Research Center of Biotechnology RAS; 33 Bldg. 2 Leninskiy Ave, Moscow 119071, Russia;

⁵I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia;
8 Bldg. 2 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

Background. Current work is devoted to the study in vivo of concentration and selectivity of accumulation of infrared photosensitizer (PS) hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine in liposomal form in intramuscularly and subcutaneously transplanted mice tumor models in comparison to normal tissues.

Objective: to study the level and selectivity of accumulation of hydroxyaluminium tetra-3-phenylthiophthalocyanine liposomal form on mice tumor models in order to optimize the transplantation approach and the starting of photodynamic treatment.

Materials and methods. A range of transplantable mice tumors was used in the study: solid carcinoma Ehrlich (ELD) and solid sarcoma S-37, epidermoid Lewis lung carcinoma (LLC) and colon adenocarcinoma (AKATOL). For the assessment of concentration of PS in tissues was evaluated by fluorescence spectroscopy in vivo.

Results. The optimum transplantation approaches were shown to be as follows. Solid carcinoma Ehrlich (ELD) provided the highest accumulation of PS when transplanted intramuscularly. Five hours after administration concentration of PS in tumor achieves more than 7 mg/kg, with selectivity in comparison to normal tissue 3 : 1. The maximum concentration of PS in sarcoma S-37 was observed with subcutaneous transplantation, achieving at 5 h after administration the value of 5.4 mg/kg with selectivity of accumulation 4.3 : 1. Both LLC and AKATOL showed optimum results with intramuscular transplantation. Maximum concentration of PS in LLC was observed 5 h after administration, achieving 7.5 mg/kg with selectivity exceeding 4. Concentration of photosensitizer in AKATOL 7 h post administration achieved 6.8 mg/kg with selectivity about 2.

Conclusions. Liposomal form of PS with intravenous administration selectively accumulates in tumors. The obtained experimental data allows to recommend the method of listed tumors models transplantation for the studies of PS.

Key words: photosensitizer, tumor, accumulation, selectivity

Введение

Липосомальные лекарственные формы (ЛЛФ) фотосенсибилизаторов (ФС) позволяют использовать новые эффективные гидрофобные и гидрофильные субстанции, повысить селективность накопления ФС в опухоли и эффективность фотодинамической терапии (ФДТ), уменьшить побочные эффекты (фототоксичность) за счет понижения терапевтической дозы [1].

Объектом настоящей работы является ЛЛФ ФС на основе тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия со спектральным максимумом поглощения при длине волны 717 нм [2].

Избирательность противоопухолевого действия при ФДТ обусловлена селективностью накопления ФС в опухоли по сравнению с окружающими тканями и направленным лазерным облучением патологической зоны. ФДТ характеризуется многофакторным влиянием на компартменты опухоли. Фотодинамическое воздействие на опухоль является комплексным вследствие интеграции множественных противоопухолевых ответов. В ряде исследований [3–5] показано, что фотодинамическое воздействие может оказывать как прямое (непосредственное) воздействие на клетки опухоли, вызывая их некроз и апоптоз, так и опосредованное, приводя к нарушению кровотока в сосудах и капиллярах опухоли и вызывая их тромбоз или приводя к геморрагиям. Доминирование того или иного механизма действия связано со свойствами ФС и в значительной мере зависит от режима облучения и временного интервала между внутривенным (в/в) введением ФС и началом облучения. Продолжительность временного интервала между введением ФС и облучением при ФДТ влияет на целый ряд процессов накопления ФС в патологическом очаге, влияние

которых разнонаправленно связано с эффективностью ФДТ. Значительная часть ФС при увеличении этого интервала захватывается органами, богатыми клетками системы мононуклеарных фагоцитов, и/или выводится из организма. С другой стороны, посредством экстравазации через дефектные сосуды происходит накопление в опухоли загруженного в липосомы ФС, длительно циркулирующего в крови. Таким образом, продолжительность временного интервала между введением ФС и началом проведения облучения влияет на проникновение липосом с ФС в клетки опухоли за счет эндоцитоза и, соответственно, на эффективность ФДТ. Это делает актуальным научно обоснованный выбор оптимального интервала времени между введением ФС и началом облучения, при котором терапевтическая эффективность ФДТ будет максимальной.

Цель настоящего исследования — изучение на перевиваемых опухолях мышей динамики и селективности накопления ЛЛФ ФС в опухоли по отношению к нормальным тканям для оптимального выбора способа перевивки и сроков начала проведения ФДТ.

Материалы и методы

Лиофилизат ЛЛФ ФС, содержащий 1,5 мг тетра-3-фенилтиофталоцианина гидроксиалюминия во флаконе, редиспергировали водой для инъекций в объеме 5,8 мл на флакон, при этом концентрация ФС в дисперсии составила 0,25 мг/мл. После регидратации лиофилизата образовалась дисперсия липосом с размером частиц около 180 нм [6, 7], которую вводили мышам однократно струйно в хвостовую вену в дозе 6 мг/кг массы тела мышей на 6-е сутки после перевивки опухолей.

Исследование проводили на половозрелых иммунокомпетентных мышах-гибридах (CBA × C57Bl/6)F1, (C57Bl/6 × DBA/2)F1 и мышах линий C57Bl/6 и BALB/c с массой тела 20–22 г из разведения ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Животных содержали на брикетированном корме, с постоянным доступом к воде. Все эксперименты осуществляли согласно этическим аспектам проведения исследований на биомоделях и лабораторных животных, принятым в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [8].

Для исследования использовали перевиваемые опухоли мышей: солидные варианты карциномы Эрлиха (ELD) и саркомы S-37, эпидермоидную карциному легкого Льюис (Lewis lung carcinoma, LLC) и аденокарциному толстой кишки (АКАТОЛ).

В связи с тем, что выбранные экспериментальные опухолевые модели в соответствии с их морфологическим происхождением различаются по специфике роста и степени васкуляризации, для каждой модели использовали 2 способа перевивки: подкожно (п/к) и внутримышечно (в/м).

Карциному Эрлиха (ELD) и саркому S-37 перевивали мышам в правую голень в/м по 0,1 мл и п/к по 0,05 мл асцитной жидкости, содержащей 10^6 опухолевых клеток при разведении в среде 199. Исследование и поддержание штамма проводили на самках мышей-гибридов (CBA × C57Bl/6)F1 и (C57Bl/6 × DBA/2)F1 соответственно. Штаммы поддерживали внутрибрюшинной перевивкой асцитной жидкости по 0,3 мл в разведении 1 : 10 средой 199.

LLC для исследования перевивали самцам мышей-гибридов (C57Bl/6 × DBA/2)F1. Штамм поддерживали в/м перевивкой опухолевого материала в бедро на мышах-самках линии C57Bl/6.

АКАТОЛ перевивали в область голени самкам мышей линии BALB/c. Штамм поддерживали путем п/к перевивки опухолевого материала в бок мышам-самкам этой же линии.

Для перевивки LLC и АКАТОЛ опухолевую ткань измельчали ножницами до однородной консистенции, добавляли среду 199 до необходимого соотношения и перевивали мышам по 0,05 и 0,1 мл полученной суспензии, что составляет 15 мг опухолевой массы, п/к и в/м соответственно [9].

Исследования по накоплению ФС в опухолях для каждой модели проводили одновременно на 2 отдельных группах с перевивкой п/к и в/м. Результаты усредняли и анализировали по группам. Исследование динамики накопления и селективности ФС при 2 способах перевивки позволит сравнить их и выбрать оптимальный для дальнейших исследований.

В опытах использовали 3-ю генерацию каждой из опухолей. В опытные группы включали по 5 животных.

Оценку уровня и селективности накопления ФС в опухоли по сравнению с нормальной тканью осуществляли спектрально-флуоресцентным методом с использованием спектроанализатора ЛЭСА-01-Биоспек («Биоспек», Россия). Перед исследованием у всех животных был удален шерстный покров с кожи над опухолью и, соответственно, с контралатерального опухоли участка нормальной ткани. Флуоресценцию тканей вызывали с помощью лазерного излучения с длиной волны 632,8 нм и регистрировали в спектральном диапазоне волн 700–760 нм. С целью достижения достоверных результатов при регистрации флуоресценции проводили по 3–6 точечных измерений на опухоли и нормальной ткани. Полученную спектральную информацию обрабатывали с использованием программного обеспечения UnoMomento («Биоспек», Россия) и вычисляли индекс флуоресценции – величину, полученную при делении (нормировке) интегральной интенсивности флуоресцентной полосы (спектральный диапазон интегрирования 700–760 нм) на мощность возбуждающего флуоресценцию лазерного излучения.

Для количественной оценки концентрации ФС в тканях проводили калибровку спектроанализатора с использованием моделирующих фантомов – водных дисперсий с разными концентрациями ЛЛФ ФС, содержащих 1,5 % масс Липофундина МСТ/ЛСТ (Lipofundin MCT/LCT). Оптические свойства таких дисперсий достаточно близки к оптическим свойствам биоткани, что позволяет повысить точность калибровки [10].

Селективность накопления ФС оценивали по соотношению между концентрацией ФС в опухоли и в нормальной ткани [11].

Результаты и обсуждение

Анализ зависимости индекса флуоресценции ЛЛФ ФС от концентрации ФС показывает, что эта зависимость линейна до значения 0,01 мг/мл. Полученные данные позволяют для фиксированных условий исследования (геометрии опыта и настройки аппаратуры) оценить среднюю концентрацию ФС в биотканях по индексу флуоресценции (приняв плотность биоткани равной плотности воды 1 кг/л) и рассчитать его по формуле

$$C = 0,7 \times I_{\text{пр}},$$

где C – средняя концентрация ФС в биотканях (мг/кг), $I_{\text{пр}}$ – индекс флуоресценции ФС.

Карцинома Эрлиха (ELD)

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. Через 5 ч после введения обеспечивается высокое накопление ФС: среднее значение концентрации ФС во в/м перевитых опухолях превышает 7 мг/кг, что в 1,6 раза выше

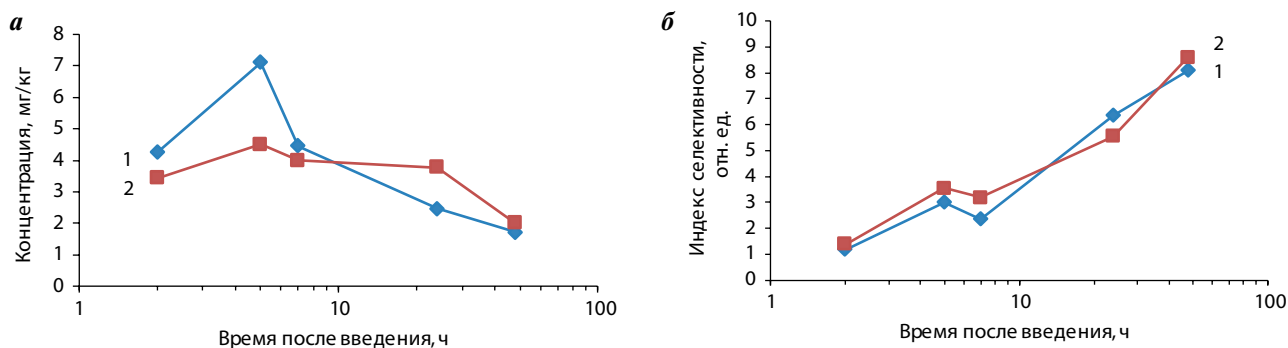


Рис. 1. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (б) ЛЛФ ФС в карциноме Эрлиха (ELD) при в/м (1) и п/к (2) перевивке

среднего значения концентрации в п/к перевитых опухолях (рис. 1). Индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, близок к 3 как при в/м, так и при п/к перевивке. Таким образом, для исследований ФДТ целесообразно использовать в/м перевитую солидную карциному Эрлиха (ELD), начиная облучение через 5 ч после в/в введения ЛЛФ ФС. Результаты исследования показывают, что концентрация ФС в опухоли при в/м перевивке быстро снижается, через 10 ч после введения уменьшаясь в 2 раза по сравнению с максимальным значением. В п/к перевитых опухолях концентрация ФС снижается медленнее: через 24 ч только на 15 %. Поскольку концентрация ФС в нормальной ткани уменьшается быстрее, значение индекса селективности к этому моменту превышает 6.

Саркома S-37

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. При п/к перевивке через 5 ч после введения ФС среднее значение его концентрации в п/к перевитых опухолях достигает 5,3 мг/кг, в 1,8 раза превышая среднее значение концентрации, достигаемое во в/м перевитых опухолях через 7 ч после введения (рис. 2). Индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, при п/к перевивке составляет 4,4, при в/м перевивке — не более 2. Таким образом, для исследований ФДТ целесообразно использовать

п/к перевитую саркому S-37, начиная облучение через 5 ч после в/в введения ЛЛФ ФС.

Эпидермоидная карцинома легкого Льюис (LLC)

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. При в/м перевивке через 7 ч после введения средняя концентрация ФС во в/м перевитых опухолях составляет 5,3 мг/кг, что в 1,5 раза больше максимального значения средней концентрации, достигаемого в п/к перевитых опухолях (рис. 3). Индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, близок к 4 как при в/м, так и при п/к перевивке. Результаты исследования также показывают, что концентрация ФС в опухоли при в/м перевивке уменьшается в 3–4 раза по сравнению с максимальным значением уже через 24 ч после введения ЛЛФ ФС.

Аденокарцинома толстой кишки (АКАТОЛ)

ЛЛФ ФС селективно накапливается в опухоли как при в/м, так и при п/к перевивке. Через 7 ч после введения ФС средняя концентрация ФС во в/м перевитых опухолях составляет 6,8 мг/кг, при п/к перевивке значение концентрации ФС в опухоли в 1,5 раза меньше (рис. 4). Индекс селективности накопления в опухоли по отношению к нормальной ткани в обоих случаях близок к 2. Через 24 ч после введения концентрация ФС во в/м перевитой опухоли составляет 5 мг/кг, в п/к перевитой — около 6 мг/кг, значения индекса селективности накопления — 5,2

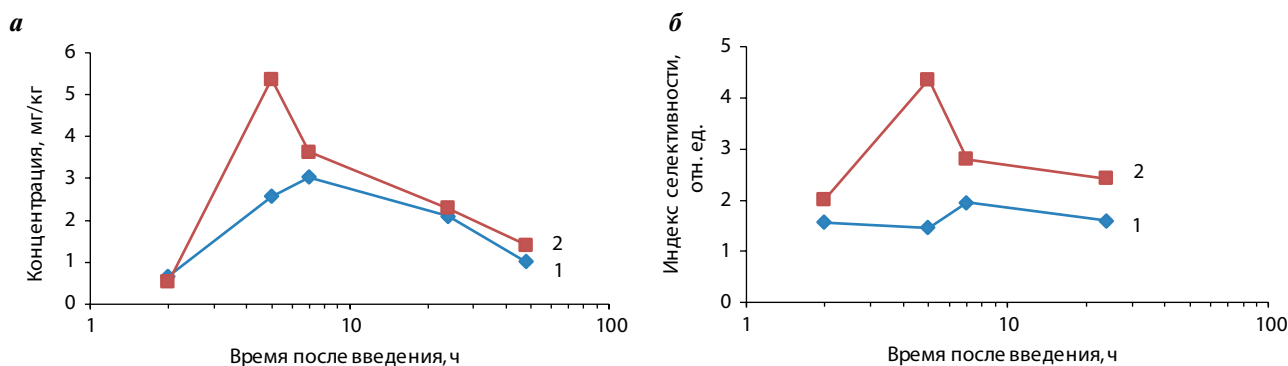


Рис. 2. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (б) ЛЛФ ФС в саркоме S-37 при в/м (1) и п/к (2) перевивке

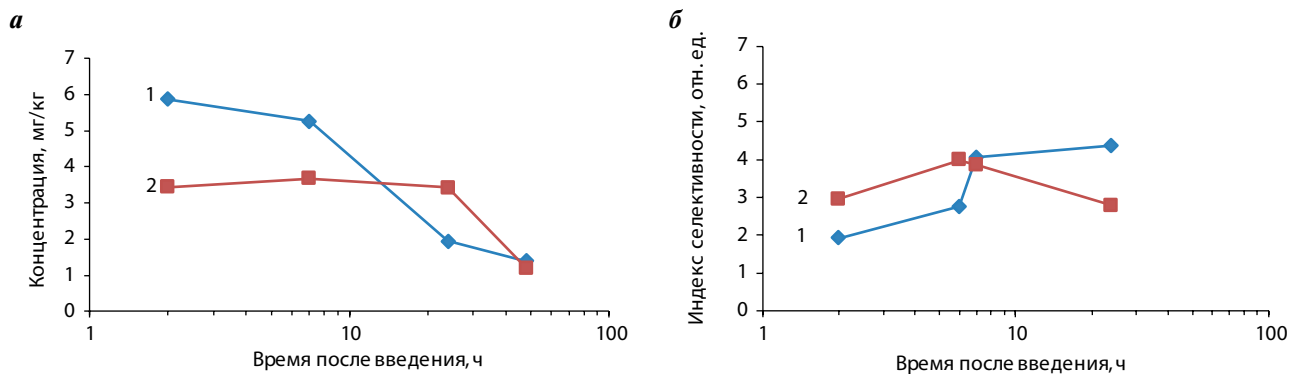


Рис. 3. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (а) ЛЛФ ФС в LLC при в/м (1) и п/к (2) перевивке

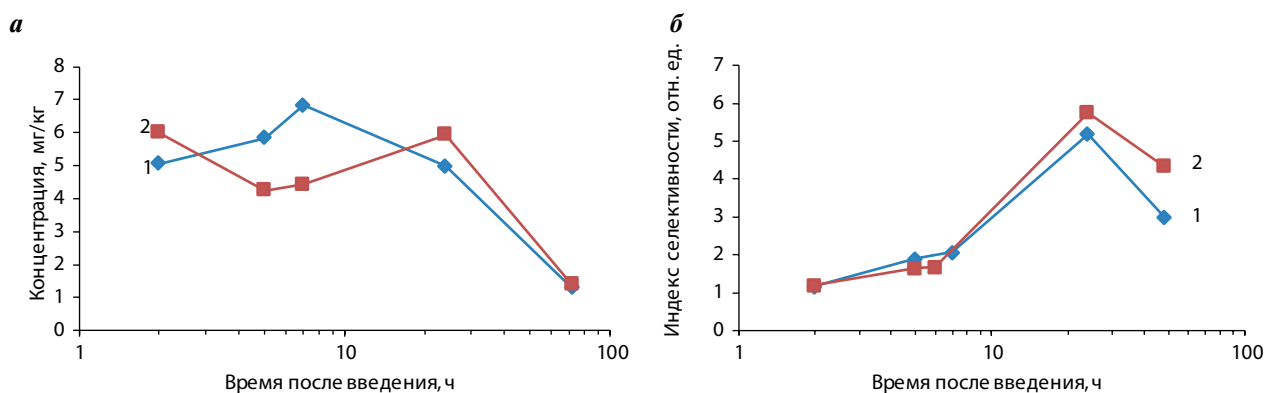


Рис. 4. Концентрация (а) и индекс селективности накопления (б) ЛЛФ ФС в АКАТОЛ при в/м (1) и п/к (2) перевивке

и 5,8 соответственно. Через 72 ч после введения концентрация ФС уменьшается более чем в 4 раза.

Выводы

Спектрально-флуоресцентные исследования на опухолевых моделях мышей показывают, что изучаемый ФС в ЛЛФ при в/в введении селективно накапливается в опухоли.

Сравнение результатов исследований по группам показывает, что:

- солидную карциному Эрлиха (ELD) для обеспечения высокого накопления ФС целесообразно перевивать в/м — в этом случае через 5 ч после введения концентрация ЛЛФ ФС в опухоли составляет >7 мг/кг, в 1,6 раза превышая соответствующее значение при п/к перевивке, а индекс селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, равен 3;
- в саркоме S-37 наиболее высокая концентрация ЛЛФ ФС при п/к перевивке достигается через 5 ч после введения и составляет 5,3 мг/кг, более чем в 1,7 раза превышая соответствующее значение при в/м перевивке, а индекс

селективности накопления в опухоли, по сравнению с нормальной тканью, достигает 4,3;

- LLC целесообразно перевивать в/м. При этом обеспечивается высокое накопление ЛЛФ ФС: через 7 ч после введения средняя концентрация ФС во в/м перевитых опухолях составляет 5,3 мг/кг, в 1,5 раза превышая соответствующее значение при п/к перевивке, а индекс селективности близок к 4;
- в АКАТОЛ при в/м перевивке средняя концентрация ЛЛФ ФС в опухоли через 7 ч после введения составляет 6,8 мг/кг, при п/к перевивке — в 1,5 раза меньше. Индекс селективности накопления в обоих случаях близок к 2. Через 24 ч после введения концентрация ФС во в/м перевитой опухоли составляет около 5 мг/кг, в п/к перевитой — около 6 мг/кг, при этом индекс селективности накопления равен 5,2 и 5,8 соответственно.

Полученные результаты позволяют выбрать оптимальный способ перевивки опухоли для экспериментальных исследований ФС на опухолевых моделях мышей и определить сроки начала проведения ФДТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14.N08.12.0074).

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

1. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Оборотова Н.А. Липосомальные системы доставки лекарственных веществ: свойства и технологические особенности получения. *Биофармацевтический журнал* 2014;6(4):3–13.
2. Барышников А.Ю., Борисова Л.М., Ворожцов Г.Н. и др. Фотосенсибилизатор, липосомальная форма фотосенсибилизатора и способ проведения фотодинамической терапии. Патент РФ № 2257898 от 10.08.2005.
3. Kogan E.A., Meerovich G.A., Torshina N.L. et al. Systemic estimation of the effect of photodynamic therapy of cancer. *Proc SPIE* 1997;3191. DOI: 10.1117/12.297803.
4. Meerovich G.A., Stratonnikov A.A., Loschenov V.B. et al. Different pathways of tumor damage due to PDT: the influence of parameters of laser irradiation. *Proc SPIE* 2001;4156. DOI: 10.1117/12.413726.
5. Meerovich G.A., Stratonnikov A.A., Loschenov V.B. et al. Influence of parameters of laser irradiation on the mechanisms of tumor damage due to PDT. *Proc SPIE* 2001;4248. DOI: 10.1117/12.424441.
6. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Полозкова А.П. и др. Эффективность липосомальной системы доставки гидрофобного противоопухолевого фотосенсибилизатора Тиосенса. *Российские нанотехнологии* 2015;10(5–6): 136–43. DOI: 10.1134/S1995078015030143.
7. Sanarova E., Meerovich I., Lantsova A. et al. Thiosens liposomal dosage form technology development and photodynamic efficiency assessment. *J Drug Deliv Sci Tech* 2014;24(4):315–9. DOI: 10.1016/S1773-2247(14)50068-8.
8. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и лабораторных животных. *Качественная клиническая практика* 2002;1:58–61.
9. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Голдина, А. Кляйна. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.
10. Savel'eva T.A., Ryabova A.V., Andreeva I.V. et al. Combined spectroscopic method for determining the fluorophore concentration in highly scattering media. *Bulletin of the Lebedev Physics Institute* 2011;38(11):334–8. DOI: 10.3103/S1068335611110042.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и Ко, 2012. 664 с.

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО МУЛЬТИТАРГЕТНОГО ПРЕПАРАТА АНТРАФУРАН

Э.Р. Переверзева, М.И. Трещалин, Н.В. Еремкин, А.Е. Щекотихин, И.Д. Трещалин
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1

Контакты: Иван Дмитриевич Трещалин idtivan@yandex.ru

Введение. Один из современных подходов к созданию противоопухолевых лекарств основан на направленном поиске ингибиторов молекулярных мишеней, специфических для опухолевых клеток. Использование таких лечебных средств позволит повысить избирательность действия и снизить побочное действие лекарственной терапии. В ФГБНУ НИИНА разработан оригинальный мультитаргетный противоопухолевый препарат антрафуран (ЛХТА-2034), представляющий собой производное антра [2,3-б] фуран-3-карбоксамида. Препарат проявил высокую противоопухолевую активность *in vivo*.

Цель исследования — доклиническое токсикологическое изучение противоопухолевого препарата антрафуран (ЛХТА-2034).

Материалы и методы. Исследование проведено на 30 беспородных крысах самцах. Препарат вводили внутривентриально ежедневно в течение 14 дней в разовых дозах 3 и 4,5 мг/кг, суммарно составляющих максимально переносимую (МПД) и расчетную дозу, вызывающую гибель 50 % животных (LD_{50}). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализ крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии, определяли массовые коэффициенты сердца, печени, почек, селезенки и тимуса, проводили патоморфологическое исследование внутренних органов.

Результаты. Показано, что внутривентриальное введение ЛХТА-2034 не оказывает влияния на изученные клинико-лабораторные показатели состояния животных. Применение ЛХТА-2034 в дозе, суммарно составляющей МПД, не вызывает повреждений структуры органов и тканей крыс. При патоморфологическом исследовании печени, почек и тонкой кишки у животных, получавших высокую дозу препарата, были выявлены обратимые повреждения структуры. Морфологические признаки кардиотоксичности ЛХТА-2034 были зарегистрированы у отдельных животных через 30 дней после окончания курса введений препарата. **Заключение.** Токсические эффекты, возникающие под действием антрафурана, зависят от величины примененной дозы и являются обратимыми. Это позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения.

Ключевые слова: антрафуран, ЛХТА-2034, хроническая токсичность, кардиотоксичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-80-84

TOXICOLOGICAL CHARACTERISTIC OF NOVEL ANTITUMOR MULTITARGETED AGENT ANTHRUFURAN

E.R. Pereverzeva, M.I. Treschalin, N.V. Eremkin, A.E. Shchekotikhin, I.D. Treschalin
Gause Institute of new antibiotics; 11 Bldg. 1 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow, 119021, Russia

Introduction. One of the modern approaches to development of antitumor drugs is based on oriented search of specific tumor cells molecular targets inhibitors. The application of such therapeutic agents will improve selectivity of action and decrease side effects of antineoplastic therapy. Novel antitumor multitargeted drug anthrafuran (LCTA-2034), obtained in Gause Institute of new antibiotics, represents a derivative of anthra[2,3-b]furan-3-carboxamide. Compound exhibits pronounced antitumor activity *in vivo*.

Objective. The objective of the present study was to investigate the toxicity of LCTA-2034.

Materials and methods. Toxicological study was performed in male outbred rats. The drug was administrated intraperitoneally at the total doses of MTD and LD_{50} (14×3 mg/kg or 14×4.5 mg/kg with 24-h interval). Dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. 5 animals in each group were sacrificed 1 and 30 days post treatment. The mass coefficients of heart, kidneys, liver, spleen and thymus were calculated. The internal organs were subjected to histological evaluation.

Results. The results of the study demonstrate that the intraperitoneal injections of LCTA-2034 don't produce any changes in examined clinical-laboratory parameters. The treatment with LCTA-2034 in total dose of MTD had no effect on morphological structure of the internal organs of rats. The reversible structural damages in liver, kidneys and small intestine were found in group of rats, treated with high dose of the drug. Signs of cardiotoxicity were documented by microscopic pathology observation on day 30 post treatment in individual animals.

Conclusion. Dose dependence and reversibility of toxic effects of LCTA-2034 allows us to recommend it to further advance.

Key words: anthrafuran, LCTA-2034, chronic toxicity, cardiotoxicity, rats

Введение

Антрациклиновые антибиотики используются в химиотерапии для лечения широкого спектра онкологических заболеваний, но их значение для противоопухолевой терапии ограничено риском развития тяжелой кардиомиопатии [1–3]. Многочисленные исследования связи между структурой и активностью производных антрациклиновых антибиотиков позволили определить влияние различных элементов их молекул на терапевтические и токсические эффекты этих соединений, что открыло возможности направленного синтеза веществ с определенными свойствами [4]. При создании нового поколения антрациклинов удалось получить препараты с высоким терапевтическим индексом (идарубицин, эпирубицин, амрубицин и др.), кардиотоксичность которых была значительно снижена [5]. Эффективные противоопухолевые соединения с пониженной кардиотоксичностью были найдены и среди антрацендионов – синтетических препаратов, близких к антрациклиновым антибиотикам по структуре, механизму действия и спектру противоопухолевой активности [6, 7]. Однако развитие множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток в ответ на терапию антрациклинами и антрацендионами определяет необходимость дальнейших исследований в этом направлении.

В ФГБНУ НИИНА было получено производное антрацендиона, на основе которого был разработан противоопухолевый мультитаргетный препарат антрафуран (ЛХТА-2034) (рис. 1), действующий на несколько важных для опухолевого роста мишеней и обладающий высокой активностью в отношении опухолевых клеток с фенотипами множественной лекарственной устойчивости [8].

Цель исследования – изучение токсических свойств разработанного прототипа лиофилизированной дозированной лекарственной формы антрафурана для парентерального применения ЛХТА-2034 [9, 10] в хроническом эксперименте на крысах.

Материалы и методы

Работа выполнена в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных

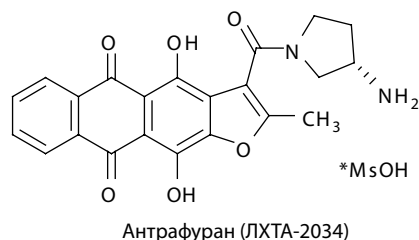


Рис. 1. Структура антрафурана ЛХТА-2034

животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [11]. Оценка токсического воздействия препарата на организм животных проводилась по правилам экспериментального изучения оригинальных фармакологических веществ, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [12].

Исследование проведено на 30 беспородных крысах-самцах массой тела 170–190 г, полученных из Центрального питомника «Андреевка». Животные были разделены на 3 группы по 10 голов в каждой. Лиофилизированную лекарственную форму антрафурана ЛХТА-2034 [10] растворяли в 5 % растворе глюкозы в 0,2 % концентрации и вводили крысам экспериментальных групп внутрибрюшинно в разовых дозах 4,5 и 3 мг/кг ежедневно в течение 14 дней с интервалом 24 ч, что суммарно составило расчетную дозу, вызывающую гибель 50 % животных (LD_{50}), и максимально переносимую дозу (МПД) соответственно. Перед началом введения определяли фоновые показатели (массу тела, клинический анализ крови). На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, регистрировали изменения массы тела, проводили гематологическое исследование. Клинический анализ крови (лейкоциты и лейкоформула, эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, гематокрит) проводили при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия). На 1-й и 30-й дни по окончании курса введений в сыворотке крови определяли уровни аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы (автоматический биохимический анализатор ChemWell, Awareness Technology Inc, США). На 1-й и 30-й дни после курса введений, используя электрокардиограф ЭК1Т-07 (Аксион, Россия), регистрировали электрокардиограмму во 2-м стандартном отведении. На эти же сроки определяли суточный диурез и осуществляли клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза, нитраты) (автоматический анализатор мочи Laura Smart, Лахема, Чехия).

Половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 1-е сутки после окончания курса, остальных – спустя 30 сут после курса. Животных обследовали на предмет внешних патологических признаков. На вскрытии проводили макроскопическое исследование состояния органов грудной и брюшной полости. Сердце, печень, почку, селезенку, тимус взвешивали при помощи весов «CE153-C» (Сартогосм, Россия) и определяли их массовые коэффициенты.

Все полученные количественные данные подвергались статистической обработке при помощи

компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel с использованием t-критерия Фишера–Стьюдента. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Для патоморфологического исследования брали участки различных органов и тканей, фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин. Короткие серии срезов окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты

В результате проведенных исследований показано, что лекарственная форма антрафурана ЛХТА-2034 при 14-кратном ежедневном внутривенном введении в разовых дозах, составляющих 1/14 от МПД (3 мг/кг) и 1/14 от ЛД₅₀ (4,5 мг/кг), хорошо переносится животными, изменений в состоянии и поведении не вызывает. Прирост массы тела подопытных животных не отличается от контроля. При применении ЛХТА-2034 в обеих исследуемых дозах не было выявлено влияния на клинический анализ периферической крови (общее количество и морфологический состав лейкоцитов, количество эритроцитов, тромбоцитов, содержание гемоглобина), биохимические показатели сыворотки крови, ЭКГ, суточный диурез и клинический анализ мочи.

Изучение патологических изменений внутренних органов крыс под действием ЛХТА-2034 показало, что применение ежедневно в течение 14 дней в дозе, суммарно составляющей МПД, не оказывает повреждающего действия на структуру большинства изученных органов и тканей экспериментальных животных. Умеренные патологические изменения в виде периваскулярного отека, который со временем ослаблялся, были найдены лишь в почках.

Введение препарата в высокой дозе приводило к повреждению структуры печени, почки, сердца, двенадцатиперстной и тощей кишки.

В печени изменения в виде единичных микронекрозов, расположенных перипортально, были найдены у 2 из 10 крыс (рис. 2а, б). Через месяц после курса введений очаги некроза в состоянии организации были обнаружены только у 1 животного (рис. 2в).

Повреждающее действие ЛХТА-2034 на миокард также было зарегистрировано у отдельных животных только через 30 дней по окончании введений. В циркулярном мышечном слое были найдены очаги отека мышечных волокон и стромы миокарда, единичные мелкие очаги деструкции кардиомиоцитов, инфильтрированные лимфоцитами и макрофагами (рис. 3).

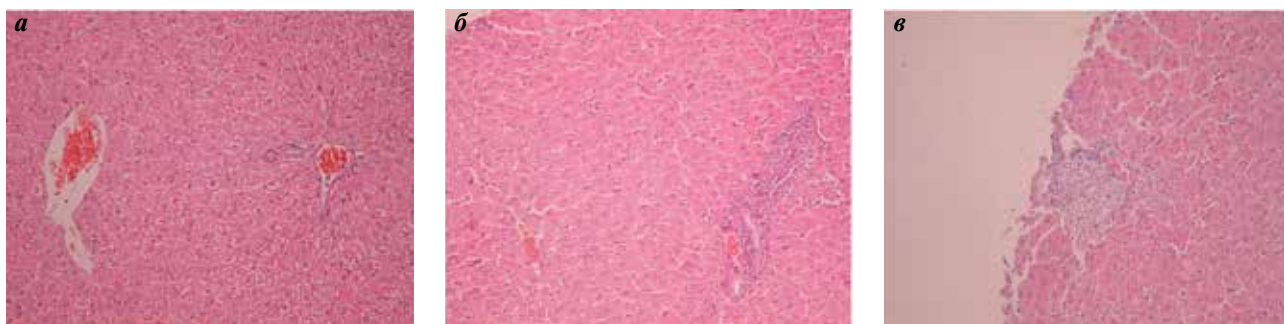


Рис. 2. Печень: а — интактный контроль. $\times 20$; б — ЛХТА-2034, 4,5 мг/кг $\times 14$. 1-е сутки после курса. Очаг микронекроза вблизи портального тракта. Умеренный отек вокруг центральной вены. $\times 20$; в — ЛХТА-2034, 4,5 мг/кг $\times 14$. 30-е сутки после курса. Очаг микронекроза с признаками организации вблизи портального тракта. $\times 20$

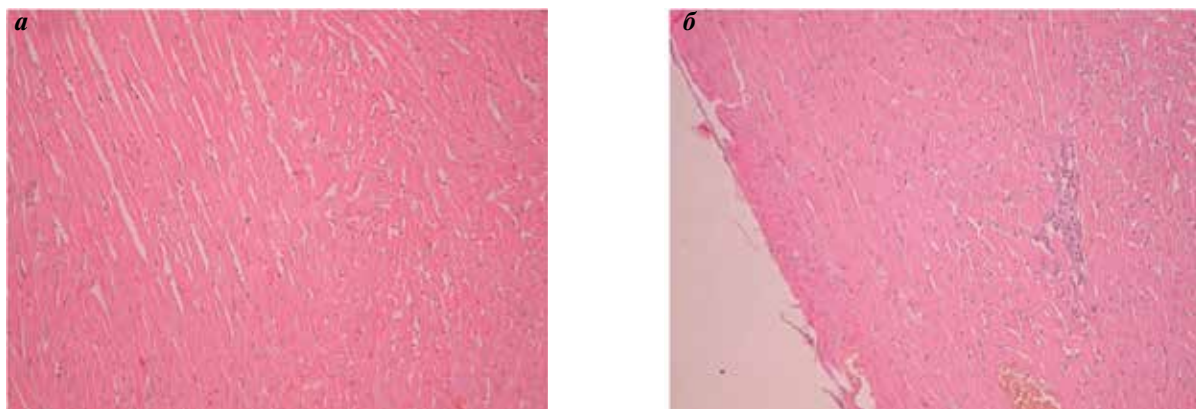


Рис. 3. Сердце: а — интактный контроль. $\times 20$; б — ЛХТА-2034, 4,5 мг/кг $\times 14$. 30-е сутки после курса. Очаг деструкции кардиомиоцитов, инфильтрированный лимфоцитами и макрофагами. $\times 20$

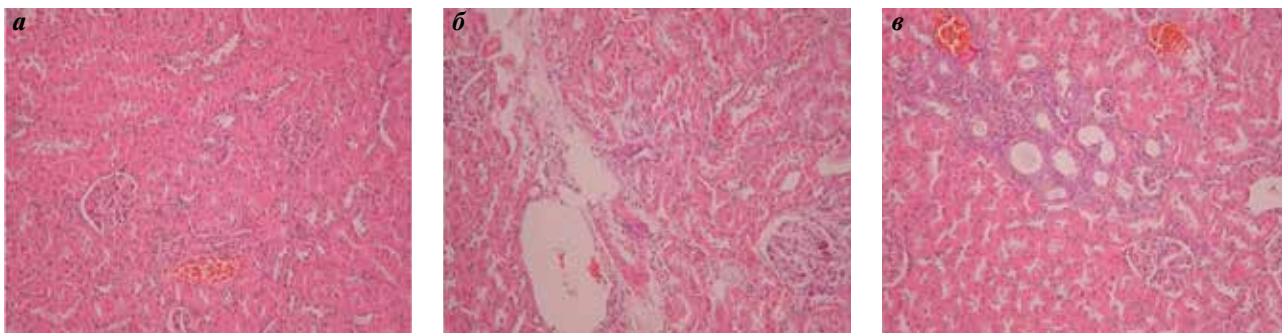


Рис. 4. Почка: а — интактный контроль. Кортикальная зона. $\times 20$; б — ЛХТА-2034. 4,5 мг/кг $\times 14$. 1-е сутки после курса. Кортикальная зона. Сильный периваскулярный отек. Очаговая деструкция капиллярной сети клубочка. Деструкция эпителия в части извитых канальцев. $\times 20$; в — ЛХТА-2034. 4,5 мг/кг $\times 14$. 30-е сутки после курса. Кортикальная зона. Очаг некроза в состоянии организации. Кисты на месте деструкции канальцев и клубочков. $\times 20$

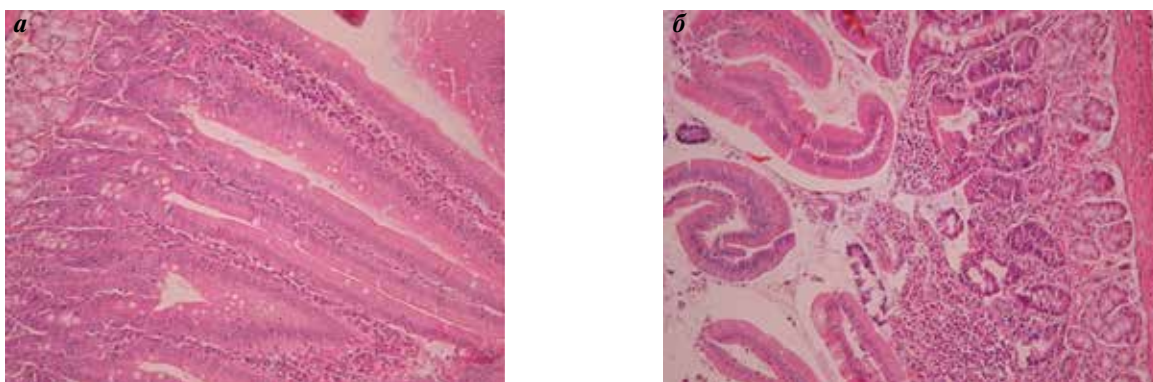


Рис. 5. Двенадцатиперстная кишка: а — интактный контроль. $\times 20$; б — 4,5 мг/кг $\times 14$. 1-е сутки после курса. Деструкция эпителия крипт и ворсин. В просвете кишки клеточный детрит и слущенный цилиндрический эпителий. $\times 20$

Применение ЛХТА-2034 в высокой дозе позволило выявить его нефротоксические свойства. Они проявились в виде резкого периваскулярного отека, очаговых повреждений эпителия извитых канальцев и эндотелия капилляров клубочков в корковой и юкстамедуллярной зонах (рис. 4а, б). У части животных эти изменения оказались стойкими и сохранялись до конца наблюдения, хотя очаги некроза в течение месяца подвергались организации (рис. 4в).

Применение препарата в высокой дозе привело к возникновению очаговых повреждений структуры слизистой оболочки двенадцатиперстной и тощей кишки, которая полностью восстанавливалась к концу эксперимента (рис. 5).

Обсуждение

Среди антрацендионов, полученных синтетическим путем, было обнаружено большое количество производных, обладающих противоопухолевой активностью. Наибольшая эффективность, подтвержденная клиническими испытаниями, отмечена у препаратов митоксантрон и аметантрон. Митоксантрон был внедрен в клиническую практику в начале 1980-х годов и в настоящее время используется для лечения лейкозов и солидных опухолей [13, 14]. Аметантрон

при клинических испытаниях продемонстрировал высокую противоопухолевую эффективность и слабовыраженную кардиотоксичность [15].

Хотя в исследованиях, проведенных на животных, было показано значительное снижение кардиотоксичности митоксантрона по сравнению с доxorubicinom, в клинике она все же была выявлена наряду с другими видами токсичности [13]. Было установлено, что препарат в высоких дозах вызывает лейкоцито-, гранулоцито-, тромбоцито- и эритроцитопению, нарушения функции печени (повышение уровня билирубина, изменение активности аспаратаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы) [7].

В результате целенаправленных исследований связи структура—активность, проведенных в ФГБНУ НИИНА, было показано, что антра [2,3-б] фуран-3-карбоксамиды являются перспективным классом соединений для дальнейшего поиска химиотерапевтических средств [16, 17]. Соединение-лидер этого ряда антрафуран ЛХТА-2034 обладает способностью ингибировать активность нескольких внутриклеточных мишеней, важных для опухолевого роста, включая топоизомеразы I, II и протеинкиназы, и проявляет высокую противоопухолевую активность в экспериментах на животных [8]. Изучение его токсикологи-

ческого профиля, проведенное в данном исследовании, показало, что в переносимых дозах ЛХТА-2034 не оказывает повреждающего действия на структуру и функцию органов и тканей экспериментальных животных. В отличие от митоксантрона даже при применении в дозе, суммарно составляющей ЛД₅₀, препарат не вызывает изменений клинко-лабораторных показателей, характеризующих функцию кроветворной, мочевыделительной, сердечно-сосудистой, пищеварительной систем организма крыс. Обратимые проявления нефро-, гепато- и гастроинтестинальной

токсичности были выявлены только при патоморфологическом исследовании. Умеренно выраженные признаки кардиотоксичности проявились лишь у отдельных животных.

Заключение

Изменения структуры внутренних органов крыс, возникающие под действием антрафурана ЛХТА-2034, зависят от величины примененной дозы и в основном являются обратимыми. Это позволяет рекомендовать его для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. Под ред. Н.И. Переводчиковой. М.: Практическая медицина, 2015. 686 с.
2. Nadas J., Sun D. Anthracyclines as effective anticancer drugs. *Expert Opin Drug Discov* 2006;1:549–568. PMID: 23506066. DOI: 10.1517/17460441.1.6.549.
3. Raj S., Franco V.I., Lipshultz S.E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2014;16:315. PMID: 24748018.
4. Корман Д.Б. Основы противоопухолевой химиотерапии. М.: Практическая медицина, 2006. 503 с.
5. Переводчикова Н.И. Новые препараты группы антрациклинов. В кн.: Новые цитостатики в лечении злокачественных опухолей. Под ред. В.А. Горбуновой. М.: Медицина, 1998. С. 61–73.
6. Johnson R.K., Zee-Cheng R.K., Lee W.W. et al. Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer Treat Rep* 1979;63:425–39. PMID: 427824.
7. Von Hoff D.D., Pollard E., Kuhn J. et al. Phase I clinical investigation of 1,4-dihydroxy-5,8-bis(2-(2-hydroxyethyl)-amino)-9,10-anthracenedione dihydrochloride, a new anthracenedione. *Cancer Res* 1980;40:83–7. PMID: 7370989.
8. Shchekotikhin A.E., Dezhenkova L.G., Tsvetkov V.B. et al. Discovery of antitumor anthra[2,3-b]furan-3-carboxamides: Optimization of synthesis and evaluation of antitumor properties. *Eur J Med Chem* 2016;112:114–29. PMID: 26890118. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.01.050.
9. Щекотихин А.Е., Сенкевич Ю.Б., Деженкова Л.Г. и др. Противоопухолевый антрафурандион и фармацевтические композиции на его основе. Патент РФ № 2554939 от 03.06.15.
10. Treshalina H.M., Romanenko V.I., Kaluzhny D.N. et al. Development and pharmaceutical evaluation of the anticancer Anthrafurane - Cavitron complex, a prototypic parenteral drug formulation. *Eur J Pharm Sci* 2017;109:631–7.
11. Council of Europe. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. ETS. 1986:123.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К., 2012. Ч. 1. С. 13–24.
13. Zee-Cheng K.Y., Cheg C.C. Antineoplastic agents. Structure-activity relationship study of bis (substituted amino-alkyl-amino) anthraquinones. *J Med Chem* 1978;21:291–4. PMID: 628005.
14. Xiao P., Dumur F., Graff B. et al. Cationic and thiol-ene photopolymerization upon red lights using anthraquinone derivatives as photoinitiators. *Macromolecules* 2013;46:6744–6750. DOI: 10.1021/ma401513b.
15. Novak R.F. Anthracycline and anthracenedione-based anticancer agents (Bioactive molecules). Elsevier Science Pub. B.V., Amsterdam, 1988. V.6. 519 p.
16. Shchekotikhin A.E., Glazunova V.A., Dezhenkova L.G. et al. Synthesis and evaluation of new antitumor 3-amino-methyl-4,11-dihydroxynaphtho[2,3-f]indole-5,10-diones. *Eur J Med Chem* 2014;86:797–805. PMID: 25244612. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.021.
17. Tikhomirov A.S., Shchekotikhin A.E., Lee Y.H. et al. Synthesis and characterization of 4,11-diaminoanthra[2,3-b]furan-5,10-diones: tumor cell apoptosis through tNOX-modulated NAD⁺/NADH ratio and SIRT1. *J Med Chem* 2015;58:9522–34. PMID: 26633734. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00859.

ИЗУЧЕНИЕ *IN VIVO* ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ГЛИКОЗИДОВ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА

И.С. Голубева, Н.П. Яворская, О.В. Горюнова

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское ш., 24

Контакты: Ирина Сергеевна Голубева irinagolubewa52@mail.ru

Введение. Добавление в молекулу активных метаболитов, в частности аминокислот, влияет на физико-химические и фармакологические свойства гликозидов индолокарбазола. С помощью методов компьютерной хемоинформатики предсказана вероятность противоопухолевой активности аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола (АПГИК) при низкой вероятности их цитотоксической активности *in vitro*. На основании этих данных провели изучение этих соединений *in vivo*.

Цель исследования — оценка АПГИК как потенциальных противоопухолевых средств.

Материалы и методы. Исследование проводили на опухолевой модели мышей — раке шейки матки РШМ-5. Препараты вводили мышам линии СВА внутривентриально 5-кратно ежедневно с интервалом 24 ч. Наблюдение за животными продолжали до их гибели. Противоопухолевый эффект препаратов оценивали по торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни опытных мышей по сравнению с контрольными.

Результаты. Оттитрована оптимальная доза для данного ряда соединений, равная 100 мг/кг. Оценена противоопухолевая активность АПГИК на РШМ-5.

Выводы. На основе полученных данных предлагается расширенное исследование *in vivo* противоопухолевых свойств отобранных 5 лидерных АПГИК.

Ключевые слова: индокарбазолы, гликозиды и глюкозиды индокарбазолов, аминокислотные производные, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-85-88

RESEARCH *IN VIVO* THE QUALITIES OF POTENTIAL ANTITUMOR AMINO-ACID DERIVATIVES OF GLYCOSIDES OF INDOLOCARBAZOL

I.S. Golubeva, N.P. Yavorskaya, O.V. Goryunova

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology;
23 Kashirskoe Sh., Moscow 115478, Russia

Background. The addition of active metabolites (in particular, amino acids) to the molecule affects the physicochemical and prodrug properties of derivatives of indolocarbazoles. Using computed chemoinformatics, probability antitumor activity of amino-acid derivatives of glycosides of indolocarbazol (AADGI) is predicted with low probability of their cytotoxic activity *in vitro*. Based on these data, a study of these compounds *in vivo* is conducted.

Objective: the assessment of AADGI as potential antitumor medications.

Materials and methods. Research antitumor activity of AADGI was done using murine tumor models — cervical cancer CC-5. Investigated compounds were injected to mice CBA abdominally 5-times daily with interval of 24 h. Observation of animals were continued till their death. Antitumor effect of compounds was assessed by criteria of tumor growth inhibition and increase in life expectancy of mice comparing to control animals.

Results. The optimal dose for these series of compounds was titrated and this dose is 100 mg/kg. Antitumor activity of AADGI was assessed on CC-5.

Conclusions. Based on data received we suggest an extended study *in vivo* of antitumor qualities of selected 5 leader AADGI.

Key words: indolocarbazols, glycosides and glucosides of indolocarbazols, amino-acid derivatives, antitumor activity

Введение

Одной из основных проблем онкологии при проведении химиотерапии является множественная

лекарственная устойчивость. В связи с этим актуальным остается поиск новых препаратов с противоопухолевыми свойствами. В настоящее время

за рубежом проходят II–III фазу клинических испытаний N-гликозилированные производные индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазола [1]. Добавление в молекулу индолокарбазола к имидному атому азота активных метаболитов, каковыми являются аминокислоты, влияет на физико-химические и пролекарственные свойства гликозидов индолокарбазола, как это показано в статье [2]. Это, по-видимому, обусловлено тем, что пути превращения всех аминокислот (например, фосфорилирование и дефосфорилирование их остатков) повсеместно используются в клетке как способ передачи жизненно важных сигналов. Аминокислотные производные гликозидов индолокарбазола (АПГИК) были синтезированы в лаборатории химического синтеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Для этих соединений с помощью методов компьютерной хемоинформатики спрогнозирована высокая вероятность противоопухолевой активности при низкой вероятности цитотоксической активности *in vitro*. Низкая цитотоксическая активность подтверждена в МТТ-тесте на 5 линиях клеток [2].

Цель настоящего исследования — экспериментальная проверка потенциальных противоопухолевых свойств АПГИК, спрогнозированных *in silico* [2].

Материалы и методы

Противоопухолевую активность АПГИК определяли *in vivo* по методике, принятой в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России для экспериментов с использованием солидной модели опухолевого роста мышей — рака шейки матки РШМ-5, выбранной для изучения соединений, предоставленных лабораторией химического синтеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Исследование проводили на мышах-самках линии СВА в возрасте 1,5–2,0 мес с начальной массой тела 19–23 г. Животных получили из питомника «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» и содержали в виварии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в соответствии с санитарными правилами по содержанию лабораторных животных [5].

Перед лечением мышей распределили по группам: в контрольной — 10 мышей, в опытных — по 5–7. Наблюдение за животными проводили до их гибели.

Штамм перевиваемой опухоли получили из банка опухолевых штаммов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина и поддерживали *in vivo* в лаборатории экспериментальной химиотерапии на мышах линии СВА. В опытах использовали 2–10-е пассажи штаммов *in vivo*. Опухоли мышам перевивали

подкожно в область подмышечной впадины передней лапы по стандартным методикам [3, 4]. Лечение мышей в опытных группах начинали через 48 ч после перевивки. Препараты вводили внутривенно ежедневно в течение 5 сут с интервалом 24 ч. Исходные соединения растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и разводили физиологическим раствором до 10 % концентрации ДМСО.

Оценку результатов лечения проводили по показателям торможения роста опухолей (ТРО) и увеличения продолжительности жизни (УПЖ).

ТРО вычисляли по формуле

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

где V_k и V_o — средний объем опухолей (мм^3) в контрольной и опытных группах соответственно, которые для каждой солидной опухоли определяли как произведение размеров 3 перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на каждые 4-е сутки после окончания лечения.

УПЖ мышей в опытных группах по сравнению с контрольной вычисляли по формуле

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

где СПЖ_o и СПЖ_k — средняя продолжительность жизни (сут) животных в контрольной и опытных группах соответственно. Показатели эффективности изучаемого препарата определяли в сравнении с контрольной группой.

Активными в противоопухолевом отношении считали дозы препаратов, вызывающие ТРО ≥ 50 % продолжительностью не менее 8–12 сут после окончания лечения или УПЖ животных ≥ 25 %.

Токсичность препаратов в использованных режимах и дозах оценивали по срокам гибели животных опытных групп в сравнении с контрольной группой. Трупы животных утилизировали в соответствии с санитарными правилами НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Для выполнения экспериментов составляли группы численностью, достаточной для проведения статистического анализа и расчета показателей достоверности. Различия между контрольной и экспериментальными группами считали достоверными при 95 % уровне значимости ($p \leq 0,05$). Статистическая обработка данных выполнена с помощью программы Statistica 5.5 (StatSoft, США).

Результаты

Сравнительное изучение противоопухолевой активности АПГИК *in vivo* проводили на мышах с опухолью РШМ-5.

Результаты изучения противоопухолевых свойств аминокислотных производных гликозидов индолакарбазола ЛХС на мышах с опухолью рака шейки матки РШМ-5

Шифр соединения ЛХС	Доза, мг/кг	ТРО, %								УПЖ, %	Число погибших животных, п	Вероятность эффекта, %**
		Сутки после окончания лечения										
		1	4	8	12	16	21	25	29			
Группа I												
1156	100	93	80	66	77	49	61	—	—	25	0/5	72
1167*	75	74	68	65	52	36	—	—	—	—	1/7	
1166	100	70	58	50	40	7	—	—	—	23	0/5	
Группа II												
1156	100	93	79	80	82	63	60	59	52	25	0/7	72
1233	100	61	69	64	60	49	61	48	—	19	0/6	
1196	100	79	79	69	44	37	—	—	—	—	0/7	
1232	100	78	80	67	56	40	28	25	14	18	0/6	—
Группа III												
1204	100	80	74	59	57	44	43	—	—	—	0/6	74
1227	100	75	67	74	58	53	55	57	30	—	3/7	75
	75	46	50	55	59	46	28	24	16	—	1/7	
Группа IV												
1205	100	45	41	59	51	44	55	—	—	—	1/7	72
1206	100	62	58	64	61	46	59	—	—	—	0/7	69
1231	100	81	79	82	63	49	34	33	—	—	1/7	70
Группа V												
1224	100	60	56	54	50	61	56	54	41	17	0/6	57
1225	100	40	44	46	64	59	51	47	65	20	0/7	62
1226	80	50	64	64	58	57	—	48	—	14	0/7	74
Группа VI												
1229	100	50	52	56	39	42	23	33	—	—	2/6	68
1230	75	46	72	63	64	49	41	—	—	—	0/7	73
Группа VII												
1203	100	71	66	72	67	41	52	—	—	—	1/6	64
1228	100	28	42	35	28	40	23	30	—	—	1/6	63
1177	100	86	53	26	43	29	17	—	—	—	0/6	81

*Внутривенное введение; **вероятность противоопухолевой активности, рассчитанная *in silico* с помощью методов компьютерной хемиоинформатики [2].

Проведенные ранее исследования по оценке противоопухолевой активности соединения ЛХС-1156 позволили выбрать его для отработки доз, стандартного способа и режима введения АПГИК и использовать далее как препарат сравнения.

АПГИК объединили в группы с I по VII, исходя из подобия строения боковых цепей аминокислот,

использованных в их синтезе. Результаты исследования представлены в таблице. Полученные данные подтвердили прогноз *in silico* [2] высокой (63–72 %) вероятности противоопухолевой активности АПГИК. В то же время лечение препаратами, включенными в группы III, IV, VI и VII, сопровождалось гибелью животных либо умеренными значениями ТРО.

В отсутствие остатка аминокислоты в молекуле гликозид индолопирролокарбазола ЛХС-1177, невзирая на 81 % вероятность противоопухолевого эффекта, показал значимый процент ТРО только до 4-х суток после окончания лечения.

Выводы

Таким образом, анализ полученных результатов позволяет предложить для дальнейшего расширенного изучения соединения ЛХС-1156, ЛХС-1224, ЛХС-1225, ЛХС-1226 и ЛХС-1233.

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

1. Butler M.S. Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 2005;22(2):162–95. DOI: 10.1039/b402985m. PMID: 15806196. Апрышко Г.Н., Жукова О.С., Фетисова Л.В. и др. Изучение свойств потенциальных противоопухолевых аминокислотных производных гликозидов индолокарбазолов *in silico* и *in vitro*. Российский биотерапевтический журнал 2017;16(4):46–54. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-46-54
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 I. Под ред. А.Н. Миронина, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильева и др. М.: Гриф и Ко, 2012. С. 640–654.
3. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркина, А. Година, А. Кляйна. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.
4. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1:53.

