

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 НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России

НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

А.В. Караулов, академик РАН, д-р мед. наук, проф.;

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

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

ОСНОВАН В 2002 Г.

2 ^{ТОМ 16}
'17

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

115478 Москва, Каширское ш., 24
ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»
Минздрава России,
НИИ экспериментальной
диагностики и терапии опухолей
Тел.: +7 (499) 324-10-65, 7 (499) 612-81-92;
факс +7 (499) 324-22-74
E-mail: bioterapy_rbj@mail.ru

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

Редактор А.В. Лукина
Корректор Т.Н. Помилуйко
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. № 2. 1–102
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» — 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Буки Веди»
Тираж 1000 экз.
<http://www.ronc.ru/node/1877>
<http://rbjournal.ru/>

Ж У Р Н А Л Ы

www.oncurology.abvpress.ru
ОНКОУРОЛОГИЯ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Онкологическая
КОЛОПРОКТОЛОГИЯ

ИЗДАНИЕ
для специалистов в области
диагностики и лечения
колоректального рака

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

<http://ok.abvpress.ru>

РУССКИЙ
ЖУРНАЛ **ДЕТСКОЙ
НЕВРОЛОГИИ**

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

www.rjcn.ru

О П У Х О Л И
**ЖЕНСКОЙ
РЕПРОДУКТИВНОЙ
СИСТЕМЫ**

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

www.ojrs.abvpress.ru

**Российский
Биотерапевтический
Журнал**

Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Опухоли **ГОЛОВЫ
и ШЕИ**

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ
ЖУРНАЛ

www.ogh.abvpress.ru

**ОНКО
ГЕМАТОЛОГИЯ**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

www.oncohematology.abvpress.ru

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

КЛИНИЦИСТ

УСПЕХИ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ
ОНКОЛОГИИ

Онлайн-версия журнала
доступна по адресу:
<http://umo.abvpress.ru/four>

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

**АНДРОЛОГИЯ
И ГЕНИТАЛЬНАЯ ХИРУРГИЯ**

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

Нервно-мышечные
БОЛЕЗНИ

ЕЖЕКВАРТАЛЬНЫЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

www.nmb.abvpress.ru

Г А З Е Т Ы

Онкология Сегодня

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЕ ИЗДАНИЕ ДЛЯ ОНКОЛОГОВ

Урология сегодня

специализированное издание для урологов

www.oncodoc.ru

Выпуск 2 2017 год

СОВРЕМЕННАЯ
КАРДИОЛОГИЯ

www.cardio.expert

**НЕВРОЛОГИЯ
СЕГОДНЯ**

СПЕЦИАЛИЗИРОВАННАЯ ГАЗЕТА
для неврологов

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 Russian Cancer Research Center"
of the Ministry of Health of Russia

Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors

EDITOR-IN-CHIEF

Z.S. Shprakh, PhD

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

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

EDITORIAL BOARD

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

FOUNDED IN 2002

2 VOL. 16
'17

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

FSBI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center" of the Ministry of Health of Russia, Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors. Tel.: +7 (499) 324-10-65, +7 (499) 612-81-92. Fax: +7 (499) 324-22-74
e-mail: biotherapy_rbj@mail.ru

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

Editor A.V. Lukina
Proofreader T.N. Pomilujko
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: ПИИ № 77-11695
dated 21.01.2002; ПИИ № ФЦ77-53039
dated 04.03.2013

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

ISSN 1726-9784
Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal. 2017. Volume 16. No 2. 1–102

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

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

Г.М. Волгарева

Ассоциирован ли рак предстательной железы с вирусами папилломы человека? 6

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е.Р. Немцова, О.А. Безбородова, Н.Б. Морозова, М.С. Воронцова, Ю.Б. Венедиктова, Т.Н. Андреева, Е.И. Нестерова, Т.М. Андропова, Р.И. Якубовская

Эффективность сочетанного лечения экспериментальных опухолей цитостатическими препаратами и ГМДП-А 13

Л.М. Борисова, М.П. Киселева, В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, З.С. Шпрах

Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение II) 23

М.Ю. Ревтович, Ю.П. Истомина, О.В. Красько, Е.М. Трещалина, А.И. Шмак, П.М. Бычковский, Т.Л. Юркинович, Н.В. Голуб, С.О. Соломевич, Ю.И. Рогов

Оценка целесообразности введения цисплатина в гидрогель с проспидином для внутрибрюшинной терапии 30

Е.М. Уханова, Т.М. Кулинич, Е.А. Кудинова, В.К. Боженко, С.М. Ситдикова, М.С. Калишьян, Е.М. Трещалина

Терапевтические дозовые характеристики химерного пептида MM-D37K при парентеральном введении мышам Balb/c nude с колоректальным раком человека HCT-116. . . 36

Н.П. Ермакова, С.С. Трофимов, Н.Ю. Кульбачевская, О.И. Коняева, В.М. Бухман, Л.М. Михайлова

Влияние бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» на центральную нервную систему 42

О.И. Коняева, Н.Ю. Кульбачевская, В.А. Чалей, Н.П. Ермакова, А.А. Николина, Т.И. Малова, В.М. Бухман

Изучение репродуктивной токсичности лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина 50

Н.В. Андропова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, А.А. Лушникова, Д.В. Филоненко, С.М. Ситдикова, И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина

Способность клеток беспигментной меланомы кожи человека линии mel Ibr/BRAF⁺ и ее субклона к росту у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при подкожной имплантации 60

А.А. Вартамян, О.С. Бурова, И.В. Уласов, М.А. Барышникова

Вовлечение аутофагии в васкулогенную мимикрию при меланоме 66

А.В. Пономарев, В.А. Мисюрин, А.А. Рудакова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова

Изменение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии различных лекарственных форм аранозы и «пустых» липосом 74

Н.В. Пашинцева, Л.С. Еремина, К.В. Лисицкая, А.В. Иванов, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, С.С. Шишкин

Идентификация представителей белкового семейства HNRNP и других белков, обеспечивающих сплайсинг, в культивируемых клетках человека 82

М.С. Саяпина, А.А. Борунова, Т.Н. Заботина, Д.А. Носов

Анализ динамики субпопуляции Т-регуляторных клеток CD4⁺CD25⁺ при метастатическом почечно-клеточном раке 91

С.П. Крыжановский, Б.И. Гельцер, Т.А. Кузнецова, Е.В. Персиянова, Т.С. Запорожец

Эффективность комбинированной терапии дислипидемии аторвастатином и биологически активными веществами из морских гидробионтов 97

REVIEWS

G.M. Volgareva

Is there an association between prostate cancer and human papillomaviruses? 6

ORIGINAL REPORTS

*E.R. Nemtsova, O.A. Bezborodova, N.B. Morozova, M.S. Vorontsova, J.B. Venediktova,
T.N. Andreeva, E.I. Nesterova, T.M. Andronova, R.I. Yakubovskaya*

Efficacy of combined treatment of experimental tumors with cytostatic agents and GMDP-A. 13

*L.M. Borisova, M.P. Kiseleva, V.N. Osipov, L.P. Sushinina,
S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, Z.S. Shprakh*

Cyphetrylin cytotoxic analogues (report II) 23

*M.Yu. Reutovich, Yu.P. Istomin, O.V. Krasko, H.M. Treshalina, A.I. Shmak,
P.M. Bychkovsky, T.L. Yurkshtovich, N.V. Golub, S.O. Solomevich, Y.I. Rogov*

Value of rationality cisplatin addition into prospidin hydrogel for intraperitoneal chemotherapy of Zajdel hepatoma 30

*E.M. Uchanova, T.M. Kulinich, E.A. Kudiniva, V.K. Bozenko,
S.M. Sitdikova, M.S. Kalishjan, H.M. Treshalina*

Therapeutic dose characteristics of the chimeric peptide of MM-D37K at parenteral introduction to the Balb/c nude mice with human colorectal carcinoma HCT-116 36

*N.P. Ermakova, S.S. Trofimov, N.Y. Kulbachevskaya,
O.I. Konyaeva, V.M. Bukhman, L.M. Michailova*

The impact of a binary catalyst system «terefal + ascorbic acid» on the central nervous system 42

*O.I. Konyaeva, N.Yu. Kulbachevskaya, V.A. Chaley, N.P. Ermakova,
A.A. Nikolina, T.I. Malova, V.M. Bukhman*

Reproductive toxicity of the lyophilized liposomal dosage form of the borchlorin 50

*N.V. Andronova, L.F. Morozova, N.M. Suraeva, A.A. Lushnikova,
D.V. Filonenko, S.M. Sitdikova, I.N. Mihailova, H.M. Treshalina*

Ability to the growth into immunodeficient Balb/c nude mice after subcutaneous implantation of human amelanotic melanoma skin cell line mel Ibr/BRAF⁺ and its subclone 60

A.A. Vartanian, O.S. Burova, I.V. Ulasov, M.A. Baryshnikova

The involvement of autophagy in melanoma vasculogenic mimicry 66

A.V. Ponomarev, V.A. Misyurin, A.A. Rudakova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova

The influence of aranoza drug formulations and «empty» liposomes on the expression of PD-L1 и PD-L2 in human melanoma cell lines 74

*N.V. Pashintseva, L.S. Eremina, K.V. Lisitskaya, A.V. Ivanov,
L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva, S.S. Shishkin*

Proteomic identification of hnRNP family members and other proteins involved in splicing in human cultured cells. 82

M.S. Sayapina, A.A. Borunova, T.N. Zabolina, D.A. Nosov

Analysis of changes in subpopulation of T-regulatory cells CD4⁺CD25⁺ in metastatic renal cell carcinoma 91

S.P. Krizhanovsky, B.I. Geltser, T.A. Kuznetsova, E.V. Persyanova, T.S. Zaporozhets

The effectiveness of combined therapy of dyslipidemia by atorvastatin and biologically active substances from marine hydrobionts. 97

АССОЦИИРОВАН ЛИ РАК ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ВИРУСАМИ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА?

Г.М. Волгарева

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

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

В России и в мире в целом заболеваемость раком предстательной железы (РПЖ) и смертность от него неуклонно возрастают. В России в 2014 г. РПЖ в структуре онкологической заболеваемости мужчин составил 14,3 %. По сравнению с 2004 г. рост смертности от РПЖ был самым высоким среди всех опухолей мужчин. Этиология этой формы рака изучена недостаточно. Остается, в частности, неясной роль вирусов папилломы человека (ВПЧ) типов высокого онкогенного риска, которые в ряде других органов человека являются сильными канцерогенами. Из разных лабораторий мира продолжают поступать сообщения, авторы которых делают взаимоисключающие выводы относительно участия этих вирусов в генезе РПЖ. Решение данного вопроса представляется актуальным как в теоретическом аспекте, в плане уточнения природы такой распространенной формы рака, какой является РПЖ, так и в практическом: при подтверждении ассоциированности РПЖ с онкогенными ВПЧ открывается перспектива профилактики РПЖ путем введения мальчикам профилактических вакцин, разработанных для предупреждения рака шейки матки. Обзор содержит анализ данных литературы о возможном участии ВПЧ в генезе РПЖ.

Ключевые слова: предстательная железа, рак, вирусы папилломы человека

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-6-12

IS THERE AN ASSOCIATION BETWEEN PROSTATE CANCER AND HUMAN PAPILLOMAVIRUSES?

G.M. Volgareva

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

Prostate cancer (PC) incidence and mortality are growing steadily the world over including Russia. PC incidence in 2014 made up 14.3 % of all male tumors in the Russian Federation. PC mortality growth rate since 2004 turned out to be topmost among all men's cancers. PC etiology is poorly understood yet. Thus the role of human papillomaviruses (HPV) belonging to the highly oncogenic types is unclear while in some other human organs they were proven to be powerful carcinogens. Communications keep on emerging from various laboratories by authors who make mutually exclusive conclusions on the role of these viruses in PC genesis. It seems urgent to clarify the given problem from both theoretical and practical viewpoints. Firstly, this is the way to specify the origin of such a common cancer type as PC is. Secondly, if PC association with oncogenic HPV is confirmed the outlook for PC prevention is discovered by means of inoculating of boys with the vaccines designed for cervical cancer prevention. The present review of the literature contains analysis of data on possible HPV involvement in PC genesis.

Key words: prostate, cancer, human papillomaviruses

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) в мире занимает 2-е место среди злокачественных опухолей у мужчин, хотя между разными странами частота РПЖ различается в 30 раз, а смертность от него — в 18 раз [1]. Отмечено, что в тех странах, где большинство жителей отказались от курения, РПЖ стал обгонять по частоте рак легкого [2]. По некоторым прогнозам, к 2030 г. число новых случаев заболеваемости РПЖ в мире составит 1,7 млн, а число смертельных исходов этого заболевания — около 0,5 млн [3].

В России в 2014 г. РПЖ в структуре онкологической заболеваемости мужчин составил 14,3 %, заняв 2-е место после рака легкого. По сравнению с 2004 г. рост заболеваемости РПЖ был самым высоким среди всех опухолей мужчин, стандартизованный показатель заболеваемости на 100 тыс. мужского населения за 10 лет вырос на 166,68 % со среднегодовым темпом прироста 7,11 %; в структуре онкологической смертности мужчин РПЖ составил 7,43 % и занял 3-е место после рака легкого и желудка; по сравнению с 2004 г. рост смертности от РПЖ также был

самым высоким среди всех опухолей мужчин, стандартизованный показатель смертности на 100 тыс. мужского населения за 10 лет вырос на 26,17 % со среднегодовым темпом прироста 2,29 % [4].

Исчерпывающего понимания причин возникновения РПЖ пока нет. Высокие показатели заболеваемости и смертности, а также высокие темпы роста этих показателей свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ и поиска способов его профилактики.

Колебания показателей заболеваемости РПЖ в разных регионах мира обусловлены генетическими факторами, различиями в образе жизни населения, а также в принципах диагностики и лечения данного заболевания. Установлены 3 фактора риска развития этой патологии: пожилой возраст, принадлежность к негроидной расе, наличие в семье случаев РПЖ [5].

Одним из этиологических факторов РПЖ могут быть онкогенные вирусы папилломы человека (ВПЧ). Несмотря на то что вопрос о возможной ассоциации РПЖ с ВПЧ обсуждается длительное время, он остается открытым. Актуальность решения этого вопроса невозможно переоценить: в случае подтверждения участия ВПЧ в генезе РПЖ открывается перспектива предупреждения этого заболевания путем прививок мальчиков вакцинами, созданными для профилактики рака шейки матки (РШМ).

В случае РШМ злокачественное превращение эпителиальной клетки осуществляется под воздействием белковых продуктов 2 генов онкогенных ВПЧ, Е6 и Е7, связывающихся, соответственно, с клеточными белками – супрессорами опухолевого роста p53 и pRb, в результате чего эти клеточные белки деградируют. Клетка, в которой экспрессируются указанные вирусные онкогены, утрачивает ряд важнейших функций, в частности, способность к контролируемой пролиферации, апоптозу, репарации генома [6, 7].

Попытки исследования роли инфекционных агентов в возникновении РПЖ

Изучением роли инфекционных агентов в этиологии РПЖ исследователи занимаются в течение долгого времени. В связи с этим традиционными стали иммунологические и молекулярно-генетические тесты на выявление таких вирусов, как ВПЧ нескольких типов, вирусы простого герпеса 1-го и 2-го типов, цитомегаловирус человека, а также ряда микроорганизмов: *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Escherichia coli*. Связь между конкретным инфекционным агентом и риском РПЖ при этом чаще всего не обнаруживают, поэтому однозначный вывод о роли инфекции в генезе РПЖ пока не сделан [8].

В приведенном перечне ВПЧ занимают особое место, поскольку некоторые из них (типы 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 и 59), относящиеся к вирусам высокого онкогенного риска, канцерогенны для человека: они вызывают РШМ, а также некоторые другие формы аногенитального рака, рака головы и шеи [9, 10]. Онкобелки Е6 и Е7 ВПЧ высокого риска взаимодействуют со многими белками зараженной клетки, нарушая их функционирование; при этом главными среди этих эффектов, как уже было отмечено, принято считать инактивацию супрессоров опухолевого роста pRb и p53.

Возможную связь между РПЖ и ВПЧ обсуждают в научной литературе давно. Первые результаты были рассмотрены в нескольких обзорах, авторы которых отметили их противоречивость [11–13]. Целью настоящей работы стал анализ данных литературы, преимущественно последних лет, о возможной роли ВПЧ в возникновении этой формы рака. Поскольку заболеваемость РПЖ в разных регионах мира сильно варьирует, мы далее упоминаем географическое происхождение публикаций.

РПЖ у лиц с иммунодефицитами

Аргументом в пользу участия инфекционного агента в возникновении злокачественного новообразования нередко служат данные об увеличении частоты развития этой патологии у лиц с иммунодефицитами – у носителей вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а также у пациентов, получавших иммуносупрессирующие препараты в связи с проведенной трансплантацией какого-либо органа. На возможную роль биологических факторов в возникновении РПЖ указывает факт 2-кратного учащения данной формы рака у лиц, которым была трансплантирована почка, по сравнению со среднепопуляционным показателем. При этом частота РШМ у женщин – реципиентов почки превысила среднепопуляционную в 5 раз [14].

Итоги метаанализа данных литературы о частоте развития РПЖ у ВИЧ-инфицированных лиц и пациентов с пересаженными органами, проведенного А. Grulich и соавт., также не исключают возможности участия инфекционных агентов в возникновении РПЖ [15]. Однако в более поздних работах, выполненных в Великобритании и США, повышения риска возникновения РПЖ после трансплантации органов выявлено не было. Одной из причин этого, возможно, стал недостаточный срок наблюдения за пациентами после проведения трансплантации – в некоторых случаях он не превышал 3 лет. В пользу данной гипотезы свидетельствует отсутствие повышения или увеличение всего лишь в 2 раза риска РШМ среди параллельно наблюдавшихся женщин с пересаженными органами [16, 17].

Результаты детекции ДНК ВПЧ в образцах РПЖ

Два исследовательских коллектива из Латинской Америки сообщили о том, что в значительной части случаев РПЖ в опухолевых клетках присутствует ДНК ВПЧ [18, 19]. Группа авторов из Аргентины представила результаты детекции ВПЧ в образцах гиперплазий и аденокарцином предстательной железы (ПЖ) методом трансректальной биопсии [18]. ВПЧ-положительными, по результатам полимеразной цепной реакции (ПЦР) и гибридизации по Саузерну, оказались 17 (41,5 %) образцов РПЖ из 41, тогда как все 30 исследованных образцов гиперплазий были ВПЧ-отрицательными. В 5 образцах РПЖ присутствовал ВПЧ 16-го типа, в 2 – ВПЧ 11-го типа (его относят к группе ВПЧ низкого онкогенного риска), в остальных 10 ВПЧ-положительных образцах тип вируса определен не был. Обнаружение в части образцов РПЖ ВПЧ 16-го типа, основного типа вируса, ответственного за возникновение РШМ, авторы расценивают как свидетельство причастности ВПЧ к генезу РПЖ. Ответа на вопрос о путях проникновения ВПЧ в ПЖ исследователи не дают, отмечая, что различие между ВПЧ-статусом гиперплазий и РПЖ не оказалось бы столь резким, если бы вирусы попадали в ПЖ из соседних органов, где их нередко выявляют (уретра, прямая кишка, мочевого пузыря) [20–22].

В свою очередь, исследователи из Мексики, используя ПЦР, провели сравнение частоты ВПЧ-положительности в 55 образцах от больных РПЖ, полученных методом трансректальной биопсии, и 75 образцах, полученных методом трансуретральной резекции от лиц, вошедших в контрольную группу (пациенты с хроническим простатитом, гиперплазией или атрофическими изменениями ткани ПЖ). ДНК ВПЧ была обнаружена в 11 образцах РПЖ (20,0 %) и 4 образцах из контрольной группы (5,3 %). Тип вируса удалось определить в 6 случаях (в 5 образцах РПЖ и 1 контрольном), при этом в 3 из них обнаружено одновременное наличие нескольких типов ВПЧ. ВПЧ высокого онкогенного риска присутствовали в 4 из 5 образцов РПЖ, а также в контрольном образце. Присутствие ДНК ВПЧ в клетках ПЖ повышало риск развития РПЖ приблизительно в 4 раза [19].

Данные, свидетельствующие об участии ВПЧ в генезе РПЖ, представила также группа исследователей из Индии [23]. Детекцию ВПЧ методом ПЦР они провели в 95 образцах РПЖ и 55 образцах, полученных от пациентов с доброкачественной гиперплазией ПЖ. Среди РПЖ 41 % образцов был ВПЧ-положительным, тогда как среди образцов гиперплазии – 20 %. Преобладающим типом в РПЖ оказался ВПЧ 16-го типа (32 % всех образцов), следующим по частоте обнаружения был ВПЧ 18-го типа (6 % образцов). Что касается доброкачественной гиперплазии, то здесь только

в 5 % образцов была обнаружена ДНК ВПЧ 16-го типа.

Вместе с тем попытка детекции ДНК ВПЧ, а также ВПЧ-специфичных транскриптов, предпринятая в Австралии, дала полностью отрицательные результаты [24, 25].

Обнаружение онкобелка E7 ВПЧ в клетках РПЖ

Аргументом в пользу участия ВПЧ в генезе РПЖ могли бы явиться данные о функциональной активности вирусного генома в клетках РПЖ. Такой аргумент получен группой итальянских исследователей [26]. Проведя ретроспективный анализ 150 случаев первичного РПЖ, которые были диагностированы в период 1992–1994 гг., авторы с помощью иммуногистохимического метода обнаружили онкобелок E7 ВПЧ в хирургически удаленной опухолевой ткани 122 образцов (74,67 %). В работе была использована смесь моноклональных антител Cervimax, позволяющая обнаруживать онкобелок E7 всех типов ВПЧ высокого онкогенного риска, а также 4 типов ВПЧ, у которых до настоящего времени онкогенный потенциал в эпителии слизистых оболочек обнаружен не был [27]. Во всех случаях, когда удавалось выделить ДНК из этих образцов и определить тип вируса путем секвенирования, им был ВПЧ 16-го типа. При этом общая выживаемость больных, опухоли которых, по результатам окрашивания антителами к E7 ВПЧ, оказались положительными, была значительно ниже, чем у пациентов с отрицательными опухолями: 4,59 и 8,24 года соответственно. По результатам анализа, проведенного М. Pascale и соавт., ВПЧ-статус оказался независимым фактором прогноза общей выживаемости больных РПЖ наряду с другими традиционно используемыми факторами, которые также учитывались в данной работе: возраст, показатель по шкале Глисона (служащий для гистологической оценки нарушения дифференцировки РПЖ) и степень анаплазии ядер (nuclear grade) [28, 29]. Таким образом, М. Pascale и соавт. не только обнаружили онкобелок E7 ВПЧ в каждом 3 из 4 изученных ими образцах РПЖ, но и выявили неблагоприятное влияние присутствия этого белка в опухоли на общую выживаемость больных.

Результаты эпидемиологических исследований

Неоднократно предпринимались попытки уточнить роль ВПЧ в возникновении РПЖ с помощью эпидемиологических подходов. При планировании подобных работ исследователи преодолевали очевидное методическое затруднение, связанное с невозможностью получения ткани ПЖ от здоровых лиц для формирования контрольной группы. Поэтому в таких работах присутствие ВПЧ оценивали не в ткани органа, а в крови по результатам

серологического теста. Так, методом иммуноферментного анализа (ИФА) у обследуемых мужчин определяли наличие антител класса IgG к белкам L1 и L2, образующим капсид вирусной частицы [30–32], или антител к вирусоподобным частицам (virus-like particles), т. е. к белку L1 [8, 33, 34]. Международная группа экспертов по папилломавирусам посчитала этот метод весьма полезным в эпидемиологических исследованиях для оценок экспозиции к ВПЧ [9]. К его достоинствам (помимо того, что данный подход позволяет обойтись без биопсий) можно отнести возможность кумулятивной оценки предыдущих эпизодов проникновения вируса в организм за длительный период, а также отсутствие трудностей, сопряженных с применением ПЦР (угроза контаминации, зависимость от характеристики используемого опухолевого образца (свежезамороженного или формализованного) и того, амплификация какого именно участка генома проведена, и т. д.). Среди ограничений метода следует указать на невозможность учета элиминации вируса из организма под действием иммунитета. Например, при заражении ВПЧ эпителия шейки матки это происходит быстро [9, 35], вследствие чего присутствие антител к белкам капсида ВПЧ в крови не может быть расценено как безусловное свидетельство инфицированности человека на момент взятия образца крови. Напротив, отрицательный результат ИФА не исключает присутствия в организме ВПЧ в момент взятия образца крови. Так, у женщин, у которых в эпителии шейки матки присутствие ВПЧ было подтверждено микроскопически и с помощью лабораторных тестов на ДНК вируса, IgG к белкам капсида ВПЧ присутствовал в сыворотке крови лишь у половины обследованных [9]. Наконец, положительный результат ИФА в данном случае не позволяет судить о том, какой конкретно орган заражен на настоящее время или был инфицирован ВПЧ ранее.

Группа финских авторов, использовавших гнездовой метод «случай – контроль», показала ассоциацию РПЖ с ВПЧ 16-го и 18-го типов, но не с ВПЧ 11-го и 33-го типов. При наличии антител к ВПЧ 16-го и 18-го типов риск РПЖ возрастал в 2,4 и 2,6 раза соответственно [30].

В работе, выполненной методом «случай – контроль» в Швеции, исследователи не подтвердили наличие связи РПЖ с ВПЧ 16-го и 18-го типов, но получили данные, указывающие на возможную ассоциацию РПЖ с ВПЧ 33-го типа, при этом относительный риск составил 1,6, а для лиц с особенно высокими титрами антител – 2,3 [31]. Позже в масштабном проспективном исследовании, проведенном гнездовым методом «случай – контроль» среди норвежских, шведских и финских мужчин, в общей сложности на более чем 200 тыс. лиц, повышения

риска возникновения РПЖ не было выявлено ни при интегральной оценке антител к вирусам всех 3 типов (16, 18 и 33), ни при учете результатов отдельно для каждого типа ВПЧ, ни при анализе данных из каждой страны-участницы, ни при учете разного содержания антител [32]. Итогом работы стал вывод о том, что серологические маркеры ВПЧ 16, 18 и 33-го типов не связаны с риском развития РПЖ.

F. Sitas и соавт., применив метод «случай – контроль», не выявили наличия ассоциации с присутствием в сыворотке крови антител к ВПЧ 16-го типа у чернокожих ВИЧ-отрицательных больных РПЖ в Южной Африке [33]. Убедительность этих данных возрастает ввиду того, что авторы зафиксировали ассоциацию между ВПЧ 16-го типа и РШМ.

Ассоциаций между сероположительностью по ВПЧ 16, 18 и 31-го типов и риском развития РПЖ не было обнаружено и в проспективном исследовании, проведенном методом «случай – контроль» в США. Однако повышение концентрации IgG к ВПЧ 16-го и 31-го типов имело место у части больных, у которых рак был выявлен в последней биопсии (при завершении исследования) и опухоль характеризовалась высоким показателем по шкале Глисона (>7 баллов) [34].

Участие ВПЧ в возникновении РПЖ ставят под сомнение результаты работы, проведенной методом «случай – контроль» в Чехии [8]. Сопоставив путем ИФА содержание антител в сыворотке крови к ВПЧ 6, 11, 16, 18, 31 и 33-го типов для 2 групп обследуемых: 329 больных РПЖ и 105 пациентов с доброкачественной гиперплазией ПЖ, авторы не обнаружили различий между ними по доле случаев, сероположительных по ВПЧ 6, 11, 16, 31 и 33-го типов. Что касается сероположительности по ВПЧ 18-го типа, то она значимо преобладала в контрольной группе по сравнению с группой РПЖ. Вместе с тем у больных РПЖ серопозитивность по ВПЧ 6-го типа сопровождалась достоверно более высокими значениями показателя по шкале Глисона, т. е. большей степенью анаплазии опухолевых клеток.

Итак, данные эпидемиологических исследований, посвященных ассоциации РПЖ с ВПЧ, противоречивы. Преобладают сообщения об отсутствии связи между РПЖ и экспозицией организма к ВПЧ типов высокого онкологического риска. При интерпретации этих данных важно учитывать упомянутые выше ограничения иммунологического метода оценки экспозиции к ВПЧ. К тому же признанным индикатором экспозиции организма к развивающейся в нем ВПЧ-ассоциированной опухоли служит присутствие в сыворотке крови иммуноглобулинов к ранним белкам вируса Е6 и Е7, а не к белкам капсида вирусной частицы [36, 37]. Насколько нам

известно, работы, в которых у больных РПЖ было бы проверено наличие в сыворотке крови антител класса IgG к вирусным онкобелкам Е6 и Е7, отсутствуют, поэтому исследования в данном направлении весьма актуальны.

Трансформация нормальных эпителиальных клеток ПЖ с помощью ДНК онкогенного ВПЧ

В случаях, когда работы, проводимые на клиническом материале, дают противоречивые результаты, возрастает значимость данных, полученных на экспериментальных моделях. В связи с этим принципиально важны сообщения Р.С. Weijerman и соавт., опубликованные в 1994–1998 гг., в которых описано проведение успешной трансформации нормальных эпителиальных клеток ПЖ человека с помощью ДНК ВПЧ 18-го типа. Именно этот ВПЧ обладает высоким сродством к железистому эпителию, и потому он нередко может быть обнаружен в клетках аденогенного РШМ. Клетки полученной этими исследователями линии-трансфектанта приобрели способность к длительной пролиферации *in vitro* (около 100 пассажей), тогда как исходные нормальные клетки погибали через 4 пассажа; в них начался синтез онкобелка Е6 и проявились нарушения кариотипа, указывающие на их клоновую природу. По сравнению с культурами нормальных клеток ПЖ, полученными без участия ВПЧ, в них многократно возросло содержание мРНК, соответствующей простатспецифическому антигену. В то же время опухолеродностью при подкожной прививке бестимусным мышам эти клетки не обладали [38–40]. Авторы высказали предположение о том, что, приобретая способность к неограниченной пролиферации *in vitro* (став «иммортальными») под действием ВПЧ 18-го типа, в дальнейшем эти клетки за счет усилившейся генетической нестабильности могут спонтанно приобретать и опухолеродность. Полученную клеточную линию они предложили рассматривать как модель реального канцерогенеза в ПЖ, происходящего с участием ВПЧ высокого онкогенного риска.

Результаты скрининга российских мужчин на присутствие ДНК ВПЧ в мочеполовой системе

Публикации, посвященные анализу возможной связи между ВПЧ и РПЖ у российских больных, нам неизвестны. В рамках темы настоящего обзора представляют интерес данные скрининга неслучайной выборки здоровых российских мужчин на присутствие ДНК ВПЧ в мочеполовой системе [22]. Были проанализированы материалы от 752 лиц, проходивших обследование в клиниках Санкт-Петербурга на предмет возможных заболеваний, передаваемых половым путем. Помимо обычных в таких случаях тестов на ряд бактерий и вирусов, при получении

информированного согласия у мужчин были взяты мазок из дистального отдела мочеиспускательного канала, а затем – выделенный секрет предстательной железы (ВСПЖ). Процедура взятия проб позволяла минимизировать вероятность контаминации ВСПЖ вирусами из эпителия уретры. По результатам ПЦР 47,9 % обследованных мужчин оказались ВПЧ-положительными хотя бы в 1 из 2 органов (ПЖ, мочеиспускательный канал); 42,0 % были положительными по ВПЧ типов высокого онкогенного риска и 12,6 % – положительными одновременно по нескольким типам ВПЧ. ВПЧ-положительными были 32,6 % образцов ВСПЖ, 27,7 % из них содержали ВПЧ типов высокого онкогенного риска. Среди образцов, полученных из дистального отдела мочеиспускательного канала, ВПЧ-положительными были 25,9 %, а 24,5 % – положительными по ВПЧ типов высокого онкогенного риска. Только у 10,6 % обследованных мужчин положительными по ВПЧ оказались одновременно образцы ВСПЖ и эпителия уретры, а тип вируса совпал в образце ВСПЖ и уретры у 6,4 %. В обеих сериях образцов наиболее часто обнаруживали ВПЧ 16-го типа. Одновременное присутствие ВПЧ нескольких типов в ВСПЖ имело место чаще, чем в эпителии дистального отдела мочеиспускательного канала: 8,1 и 5,2 % соответственно. В старших возрастных группах обнаружение ВПЧ и в мочеиспускательном канале, и в ВСПЖ было отмечено достоверно реже, чем у молодых мужчин. Значения прочих изученных параметров (возраст начала половой жизни, число партнеров, наличие на момент обследования заболеваний, передаваемых половым путем) не коррелировали с ВПЧ-статусом ВСПЖ и эпителия мочеиспускательного канала. Таким образом, тестирование образцов ВСПЖ в 2 раза повысило частоту обнаружения ВПЧ в мочеполовой системе мужчин из обследованной выборки. Авторы считают, что ВПЧ попадает в образцы ВСПЖ не из эпителия уретры, аргументируя эту точку зрения тем, что нередко (21,9 % случаев) тестирование ВСПЖ давало положительный результат, а тестирование эпителия уретры – отрицательный, а также тем, что далеко не всегда у лиц с положительным статусом по ВПЧ и ПЖ, и уретры типы ВПЧ в обоих органах совпадали. Наиболее вероятным источником попадания ВПЧ в ВСПЖ они считают клетки ПЖ, хотя не исключают и эпителий соседних органов [22].

Указанная работа – первая попытка детекции ВПЧ в ВСПЖ. ВСПЖ оказался подходящим источником для выявления степени зараженности мужских контингентов ВПЧ, в том числе для детекции этих вирусов у лиц с отрицательным ВПЧ-статусом дистальных отделов мочеиспускательного канала. Полученные данные имеют прямое отношение к проблеме ассоциированности РПЖ и других форм

рака у мужчин с ВПЧ; их необходимо учитывать при анализе путей передачи ВПЧ в популяции.

Неблагоприятные медицинские последствия инфицированности мужчин ВПЧ

В целом инфицированность мужчин ВПЧ до недавнего времени привлекала значительно меньшее внимание врачей и биологов, нежели инфицированность женщин. Ситуация начала меняться с момента доказательства способности ВПЧ типов высокого риска оказывать канцерогенное действие не только на эпителий шейки матки и влагалища, но и на области прямой кишки и гениталий мужчин, а также возможности поражения ротоглотки лиц обоего пола ВПЧ-положительными карциномами. По некоторым оценкам, в Европе приблизительно каждый 4-й вновь выявляемый случай рака у мужчин относится к категории ВПЧ-положительных, а подавляющее большинство из них – к положительным по ВПЧ 16-го или 18-го типов [41]. Важно отметить, что соответствующие расчеты проведены только для тех форм рака, для которых этиологическая роль ВПЧ доказана (рак прямой кишки, полового члена, ротоглотки); РПЖ в их число не входит. Помимо того, что мужчины заболевают ВПЧ-положительными формами рака, они служат резервуаром, обеспечивающим поддержание ВПЧ-инфекции в популяции в целом, причем эта роль мужской части населения остается во многом неясной. Установление факта конкордантности типов ВПЧ в супружеских парах может быть стимулом для дальнейших исследований в этом направлении [42, 43].

Заключение

В 2007 г. международной группой экспертов РПЖ был отнесен к злокачественным опухолям, в отношении которых недостаточно фактов (inadequate evidence) для окончательного вывода об участии ВПЧ в их возникновении [9]. О сложности этой проблемы свидетельствуют и рассмотренные в настоящем обзоре данные литературы, опубликованные преимущественно в последующие годы.

Отдельного упоминания заслуживают результаты метаанализа публикаций, посвященных возможной ассоциации РПЖ с ВПЧ, который провели L. Yang и соавт. [44]. Эти авторы обобщили данные 46 исследований, охвативших в общей сложности 4919 случаев РПЖ, и установили, что показатели распространенности ВПЧ в опухолях данной локализации существенно варьировали в зависимости от региона исследования, метода выявления ВПЧ (непосредственно в ткани РПЖ – с помощью ПЦР или иного метода, либо серологически – в сыворотке крови больных РПЖ) и степени агрессивности протестированных образцов РПЖ, которую оценивали по индексу Глисона. Несмотря на это, авторы пришли к заключению о том, что связь между инфицированностью ВПЧ и РПЖ существует.

С учетом важности рассмотренной проблемы для практического здравоохранения возможность участия онкогенных ВПЧ в развитии РПЖ заслуживает самого пристального внимания и дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Torre L.A., Siegel R.L., Ward E.M., Jemal A. Global cancer incidence and mortality rates and trends – an update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2016;25(1):16–27. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-15-0578.
- Имянитов Е.Н. Эпидемиология и биология рака простаты. *Практическая онкология* 2008;9(2):57–64.
- Schröder F.H., Roobol M.J. Prostate cancer epidemic in sight? *Eur Urol* 2012;61(6):1093–5. DOI: 10.1016/j.eururo. 2012.03.019.
- Злокачественные новообразования в России в 2014 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИИОИ им. П.А. Герцена. 250 с.
- Заридзе Д.Г. Профилактика рака. М.: ИМА-Пресс, 2009. 222 с.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50. DOI: 10.1038/nrc798.
- zur Hausen H. To vaccination and beyond. *Biochemistry (Moscow)* 2008;73(5):498–503. PMID: 18605974.
- Hrbacek J., Urban M., Hamsikova E. et al. Serum antibodies against genitourinary infectious agents in prostate cancer and benign prostate hyperplasia patients: a case-control study. *BMC Cancer* 2011;3(11):53. DOI: 10.1186/1471-2407-11-53.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Human papillomaviruses*. Vol. 90. Lyon, 2007. 689 p.
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens. Part B. *Biological agents*. Vol. 100. Lyon, 2011. 502 p.
- Ruijter E., van de Kaa C., Miller G. et al. of prostate carcinoma. *Endocr Rev* 1999;20(1):22–45. DOI:10.1210/edrv. 20.1.0356.
- Zambrano A., Kalantari M., Simoneau A. et al. Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections. *The Prostate* 2002;53(4):263–76. DOI:10.1002/pros. 10157.
- Taylor M.L., Mainous A.G., Wells B.J. Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis. *Family Medicine* 2005;37(7):506–12. PMID: 15988645.
- Kasiske B.L., Snyder J.J., Gilbertson D.T., Wang C. Cancer after kidney transplantation in the United States. *Am J Transplant* 2004;4(6):905–13. DOI:10.1111/j. 1600-6143.2004.00450. x.
- Grulich A.E., van Leeuwen M.T., Falster M.O., Vajdic C.M. Incidence

- of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 2007;370(9581):59–67. DOI:10.1016/S0140-6736(07)61050-2.
16. Collett D., Mumford L., Banner N.R. et al. Comparison of the incidence of malignancy in recipients of different types of organ: A UK Registry Audit. *Am J Transplant* 2010;10(8):1889–96. DOI: 10.1111/j. 1600-6143.2010.03181. x.
 17. Engels E.A., Pfeiffer R.M., Fraumeni J.F. Jr. et al. Spectrum of cancer risk among US solid organ transplant recipients. *JAMA* 2011;306(17):1891–901. DOI: 10.1001/jama. 2011.1592.
 18. Leiros G.J., Galliano S.R., Sember M.E. et al. Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina. *BMC Urology* 2005;24(5):15. DOI:10.1186/1471-2490-5-15.
 19. Martinez-Fierro M.L., Leach R.J., Gomez-Guerra L.S. et al. Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer. *BMC Cancer* 2010;10(6):326. DOI: 10.1186/1471-2407-10-326.
 20. Deschoolmeester V., Van Marck V., Baay M. et al. Detection of HPV and the role of p16INK4A overexpression as a surrogate marker for the presence of functional HPV oncoprotein E7 in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010;10(4):117. DOI: 10.1186/1471-2407-10-117.
 21. Golovina D.A., Trofimova O.B., Ermilova V.D. et al. Complex of molecular genetic and immunohistochemical methods for detection of human papillomavirus in the bladder cancer epithelium. *Bull Exp Biol Med* 2014;157(1):70–3. DOI: 10.1007/s10517-014-2494-0.
 22. Smelov V., Eklund C., Bzhalava D. et al. Expressed prostate secretions in the study of human papillomavirus epidemiology in the male. *PLOS One* 2013;8(6):625–30. DOI: 10/1371/journal. pone. 0066630.
 23. Singh N., Hussain S., Kakkar N. et al. Implication of high risk human papillomavirus HR-HPV infection in prostate cancer in Indian population – a pioneering case-control analysis. *Sci Rep* 2015;5(1):7822. DOI: 10.1038/srep07822.
 24. Yow M.A., Tabrizi S.N., Severi G. et al. Detection of infectious organisms in archival prostate cancer tissues. *BMC Cancer* 2014;14(8):579. DOI: 10.1186/1471-2407-14-579.
 25. Yow M.A., Tabrizi S.N., Severi G. et al. Characterization of microbial communi- ties with aggressive prostate cancer tissues. *Infect Agent Cancer* 2017;12(1):4. DOI: 10.1186/s13027-016-0112-7.
 26. Pascale M., Pracella D., Barbazza R. et al. Is human papillomavirus associated with prostate cancer survival? *Dis Markers* 2013;35(6):607–13. DOI: 10.1155/2013/735843.
 27. Faoro V., Barbazza R., Bonin S. et al. Detection of HPV E7 oncoviral protein in cervical lesions by a new antibody. *Appl Immun Mol Morphol* 2013;21(4):341–50. DOI: 10.1152/jappphysiol. 00236.2013.
 28. Montironi R., Mazzuccheli R., Scarpelli M. et al. Gleason grading of prostate cancer in needle biopsies or radical prostatectomy specimens: contemporary approach, current clinical significance and sources of pathology discrepancies. *BJU Int* 2005;95(8):1146–52. DOI:10.1111/j1464-410X. 2005.05540. x.
 29. Thompson I.M., Ankerst D.P., Chi C. et al. Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(8):529–34. DOI: 10.1093/jnci/dij131.
 30. Dillner J., Knekt P., Boman J. et al. Seroprevalence and epidemiological association between human-papillomavirus infection and risk of prostate cancer. *Int J Cancer* 1998; 75(4):564–7. PMID: 9466657.
 31. Adami H.O., Kuper H., Andersson S.O. et al. Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: a population-based case control study. *Cancer Epidem Biomark Prev* 2003;12(9):872–5. PMID: 14504197.
 32. Korodi Z., Dillner J., Jellum E. et al. Human papillomavirus 16, 18 and 33 infections and risk of prostate cancer: a Nordic nested case control study. *Cancer Epidem Biomark Prev* 2005; 14(12):2952–5. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0602.
 33. Sitas F., Urban M., Stein L. et al. The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population. *Infect Agent Cancer* 2007;2(3):6. DOI: 10.1186/1750-9378-2-6.
 34. Sutcliffe S., Viscidi R.P., Till C. et al. Human papillomavirus types 16, 18 and 31 serostatus and prostate cancer risk in the Prostate Cancer Trial. *Cancer Epidem Biomark Prev* 2010;19(2): 614–8. DOI: 10.1158/1055-9965. EPI-09-1080.
 35. Franco E.L., Villa L.L., Sobrinho J.P. et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papilloma infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999;180(5):1415–23. DOI:10.1086/315086.
 36. Zumbach K., Kisseljov F., Sacharova O. et al. Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer* 2000;85(3):313–8. PMID: 10652419.
 37. Gillison M.L., Shah K.V. Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003;31:57–65. PMID: 12807947.
 38. Weijerman P.C., König J.J., Wong S.T. et al. Lipofection-mediated immortalization of human prostatic epithelial cells of normal and malignant origin using human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Res* 1994;54(21):5579–83. PMID: 7923200.
 39. Weijerman P.C., van Druenen E., König J.J. et al. Specific cytogenetic aberrations in two novel human prostatic cell lines immortalized by human papillomavirus type 18 DNA. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;99(2):108–15. PMID: 9398864.
 40. Weijerman P.C., Zhang Y., Shen J. et al. Expression of prostatic factors measured by reverse transcription polymerase chain reaction in human papillomavirus type 18 deoxyribonucleic acid immortalized prostate cell lines. *Urology* 1998;51(4):657–62. PMID: 9586625.
 41. Hartwig S., Syrjänen S., Dominik-Felden G. et al. Estimation of the epidemiological burden of human papillomavirus-related cancers and non-malignant diseases in men in Europe. *BMC Cancer* 2012;12(1):30. DOI: 10.1186/1471-2407-12-30.
 42. Reiter P.L., Pendergraft W.F., Brewer N.T. Meta-analysis of human papillomavirus infection concordance. *Cancer Epidem Biomark Prev* 2010; 19(11):2916–31. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0576.
 43. de Lima Rocha M.G., Faria F.L., Gonçalves L. et al. Prevalence of DNA-HPV in male sexual partners of HPV infected women and concordance of viral types in infected couples. *PloS One* 2012;7(7):40988. DOI: 10.1371/journal. pone. 0040988.
 44. Yang L., Xie S., Feng X. et al. Worldwide prevalence of human papillomavirus and relative risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* 2015;5(10):14667. DOI: 10.1038/srep14667.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОЧЕТАННОГО ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ОПУХОЛЕЙ ЦИТОСТАТИЧЕСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ И ГМДП-А

Е.Р. Немцова¹, О.А. Безбородова¹, Н.Б. Морозова¹, М.С. Воронцова¹, Ю.Б. Венедиктова¹,
Т.Н. Андреева¹, Е.И. Нестерова², Т.М. Андропова², Р.И. Якубовская¹

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

²ЗАО «Пептек»; Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10 (Институт биоорганической химии РАН)

Контакты: Елена Романовна Немцова nemtz@yandex.ru

Цель исследования – оценка фармакологического действия препарата *N*-ацетилглюкозаминил-*N*-ацетилмурамил-*L*-аланил-*D*-глутаминовая кислота (ГМДП-А) как модификатора биологических реакций: экспериментальное изучение его модифицирующего действия в отношении химиотерапии традиционными препаратами.

Материалы и методы. Препараты: ГМДП-А, цисплатин, гемцитабин, циклофосфамид, 5-фторурацил. Перевиваемые опухоли мыши: лимфолейкоз P-388 и саркома S-37 (солидный и асцитный варианты), меланома B-16, плоскоклеточный рак шейки матки РШМ-5, аденокарцинома толстой кишки С-26, карцинома толстой кишки АКАТОЛ (солидные варианты). Оценка эффективности: торможение роста опухоли, увеличение продолжительности жизни животных.

Результаты. На моделях перевиваемых опухолей у конвенциональных животных изучено влияние ГМДП-А при варьировании дозы, кратности введения, срока начала лечения, пути и места введения на терапевтическую эффективность химиопрепаратов цисплатина (P-388, S-37, B-16, РШМ-5), 5-фторурацила (С-26, АКАТОЛ), гемцитабина и циклофосфамида (P-388). Показано, что ГМДП-А проявляет модифицирующие свойства в отношении биологической активности ряда цитостатических препаратов: цисплатина, гемцитабина и циклофосфамида, усиливая их противоопухолевое действие, причем независимо от места его введения относительно опухолевого узла.

Заключение. Полученные результаты подтвердили потенциал ГМДП-А как модификатора биологических реакций.

Ключевые слова: глюкозаминилмурамилдипептид, модификатор биологических реакций, химиотерапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-13-22

EFFICACY OF COMBINED TREATMENT OF EXPERIMENTAL TUMORS WITH CYTOSTATIC AGENTS AND GMDP-A

E.R. Nemtsova¹, O.A. Bezborodova¹, N.B. Morozova¹, M.S. Vorontsova¹, J.B. Venediktova¹,
T.N. Andreeva¹, E.I. Nesterova², T.M. Andronova², R.I. Yakubovskaya¹

¹P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Centre of the Ministry of Health of the Russia; 3, 2nd Botkinskiy proezd, Moscow 125284, Russia;

²JSC «Peptek»; 16/10, Miklukho-Maklaya Str., Moscow 117997, Russia (Institute of Bioorganic Chemistry, RAS)

Objective of the study. To evaluate the pharmacological effects of *N*-acetylglucosaminyl-*N*-acetylmuramyl-*L*-alaninyl-*D*-glutamic acid (GMDP-A) as a modifier of biological reactions, i. e. to study its modifying action in regard to traditional cytostatic chemotherapy.

Materials and methods. The used drug agents were GMDP-A, cisplatinum, gemcitabine, cyclophosphamide, 5-fluorouracil. The transplanted murine tumors were P-388 lymphocytic leukemia and S-37 sarcoma (solid and ascites variants), B-16 melanoma, CC-5 squamous cell carcinoma of the cervix uteri, C-26 adenocarcinoma of the colon, and AKATOL carcinoma of the colon (solid tumor variants). Efficacy indices were inhibition of tumor growth, and increase of life span of animals.

Results. In the models of transplanted tumors in conventional mice, the influence of GMDP-A has been studied on therapeutic efficacy of cisplatinum (P-388, S-37, B16, CC-5), 5-fluorouracil (C-26, AKATOL), gemcitabine and cyclophosphamide (P-388) by using variations in single and total doses, time of the start of the treatment, as well as the route and site of the injection. It has been shown that GMDP-A has modified the efficacy of some cytostatic agents (cisplatinum, gemcitabine and cyclophosphamide) enhancing their antitumor activity irrespective of the location of the site of injection in regard to the tumor node.

Conclusion. The obtained results proved the potency of GMDP-A as a modifier of biological reactions.

Key words: glucosaminylmuramyl dipeptide, modifier of biological reactions, chemotherapy

Введение

Химиотерапия и ее сочетание с другими консервативными методами являются основными способами лечения больных с распространенными злокачественными процессами, однако во многих случаях эффективность этих способов до настоящего времени остается ограниченной [1]. Поэтому поиски возможностей повысить терапевтическую эффективность консервативного противоопухолевого лечения очень актуальны.

Начиная с конца прошлого столетия одним из активно разрабатываемых направлений стало создание лекарственных препаратов на основе производных мурамилдипептидов, обладающих иммуномодулирующими свойствами и противоопухолевой активностью [2].

N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (МДП) является минимальной функционально активной структурной единицей муреина – пептидогликана клеточных стенок грамотрицательных бактерий. Его производное – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин (ГМДП), который отличается от МДП наличием остатка N-ацетилглюкозамина, присоединенного к N-ацетилмурамовой кислоте, проявляет сходные с МДП физиологические свойства. ГМДП при этом имеет ряд преимуществ по сравнению с МДП: он менее токсичен и проявляет большую противоопухолевую и адьювантную активность.

Механизм действия ГМДП обусловлен наличием 2 взаимосвязанных биомишеней: YB1 – полифункционального белка, который участвует в процессах пролиферации, дифференцировки, иммунных процессах и ответе клеток на стрессовые воздействия, и внутриклеточного рецептора врожденного иммунитета NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) [3–5]. Эти мишени расположены в одном компартменте клеток – цитозоле, и показано, что образование комплекса между ГМДП, YB1 и NOD2 опосредует биологическую активность ГМДП. В последние годы было доказано, что взаимодействие ГМДП и NOD2 является абсолютно специфичным [6]. NOD2-рецепторы были обнаружены в основном в фагоцитирующих клетках – моноцитах/макрофагах, гранулоцитах, дендритных клетках, которые обеспечивают различные фазы иммунного ответа. Связывание ГМДП с YB1 и NOD2-рецептором приводит к каскаду процессов, ответственных за стимуляцию иммунитета: активации фактора транскрипции NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), которая вызывает его транслокацию в ядро и активацию транскрипции генов, кодирующих цитокины [7]. Это, в свою очередь, приводит к стимуляции эффекторных функций фагоцитов, пролиферации T- и B-лимфоцитов, восстановлению T-хелперного

баланса и повышению синтеза специфических антител. В то же время ГМДП-индуцированная стимуляция синтеза ряда интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) обуславливает активацию противоопухолевого иммунного ответа [8–10]. Усиление продукции колониестимулирующих факторов приводит к стимуляции лейкопоэза, а увеличение синтеза γ -интерферона – к повышению активности естественных киллеров. Известна также способность ГМДП дозозависимо увеличивать экспрессию опухоль-ассоциированных антигенов на трансформированных клетках, что усиливает иммуногенность последних и тем самым повышает вероятность развития эффективного противоопухолевого иммунного ответа [11]. Таким образом, ГМДП активировал многие звенья и врожденной, и адаптивной иммунной системы, что характеризует его как представителя малых молекул с иммунными свойствами [12].

Выявлено также, что ГМДП ингибирует систему цитохрома P-450, в результате чего снижается скорость окисления ксенобиотиков [13]. Это коррелирует со способностью ГМДП потенцировать действие некоторых цитостатиков, возможно, за счет замедления их метаболизма [14].

Y. Dong и соавт. [15] выявили, что МДП, конъюгированный с паклитакселом, значительно усиливал противоопухолевую и антиметастатическую активность цитостатика на модели карциномы легких Льюис у мышей. Авторы предположили, что механизм действия МДП связан именно с его способностью ингибировать NOD2-сигналинг, обуславливающий развитие воспалительных реакций и усиливающий пролиферацию клеток. На клетках плоскоклеточного рака языка человека YD-10B были получены аналогичные результаты: МДП ингибировал NOD2-сигналинг, что приводило к индукции апоптоза и ингибированию пролиферации клеток [16]. Ранее потенцирование противоопухолевого эффекта цисплатина и ФНО- α наблюдали при их сочетании с ГМДП на различных по гистогенезу опухолевых клетках: выживаемость клеток линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), U-937 (гистиоцитарная лимфома человека), B-16 (меланома мыши), L-929 (фибросаркома мыши) и асцитной карциномы Эрлиха мыши значительно снижалась при применении комбинаций ГМДП/цисплатин/ФНО- α , ГМДП/цисплатин или ГМДП/ФНО- α по сравнению с индивидуальным применением цитостатика или цитокина [17]. В то же время ГМДП не изменял цитотоксичность цисплатина или ФНО- α в отношении нормальных клеток – лимфоцитов и перитонеальных макрофагов человека и клеток костного мозга мыши.

Все вышесказанное обуславливает перспективность включения иммунотерапевтического лекарствен-

ного средства ГМДП – представителя 3-го поколения иммунопрепаратов – в схемы противоопухолевой терапии. Однако из-за высокой пирогенности ГМДП не нашел применения в онкологической клинической практике. В связи с этим актуален поиск производных ГМДП, близких ему по фармакологическим свойствам, но менее пирогенных.

В ЗАО «Пептек» разработан способ получения близкого аналога ГМДП – N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовой кислоты (ГМДП-А) [18], имеющего многократно меньшую пирогенность, чем ГМДП. Было выявлено, что при подкожном введении ГМДП-А демонстрирует широкий спектр иммуномодулирующего действия, механизм которого близок к механизму действия ГМДП.

Настоящая работа посвящена изучению фармакологического действия препарата ГМДП-А как модификатора биологических реакций, а именно экспериментальному изучению его модифицирующего действия в отношении химиотерапии традиционными препаратами.

Материалы и методы

Животные

В работе использовали мышей, полученных из питомника Научного центра биомедицинских технологий РАМН (филиал «Андреевка»):

C57Bl/6j, самки;

Valb/c, самки;

B6D2F1 – (C57Bl/6j x DBA2) F1, самки.

Возраст мышей: 7–8 нед.

Вес тела мышей перед инокуляцией опухоли: 18–25 г.

Экспериментальные опухоли

В работе использовали модели опухолей мыши: лимфолейкоз Р-388 (мышь В6D2F1, самки), меланому В-16 (мышь С57Bl/6j, самки), рак шейки матки РШМ-5 и саркому S-37 (мышь В6D2F1, самки), аденокарциному толстой кишки С-26 и аденокарциному толстой кишки АКАТОЛ (мышь Valb/c, самки).

Для получения солидного варианта роста (опухоль В-16, РШМ-5, S-37, С-26 и АКАТОЛ) опухолевый материал прививали подкожно (п/к) на правый бок животных, для получения асцитного варианта (опухоль S-37 и Р-388) – внутривенно (в/в).

Препараты, дозы, путь введения

Субстанцию ГМДП-А (ЗАО «Пептек») перед введением растворяли в стерильной воде для инъекций до концентрации 1 мг/мл (0,1 %) и вводили мышам ежедневно п/к в разовой дозе 3,75 мг/кг: 5-кратно (курсовая доза 18,75 мг/кг), 10-кратно (курсовая доза 37,5 мг/кг) или 20-кратно (курсовая доза 75,0 мг/кг). Дизайн исследования для каждой модели опухоли описан в разделе «Результаты».

Готовую лекарственную форму «ГМДП-А, раствор для подкожного введения 10 мг/мл» (ОАО «ВНЦ БАВ») перед введением разводили в 10 раз водой для инъекций до концентрации 1,0 мг/мл, вводили мышам ежедневно п/к в разовой дозе 3,75 мг/кг (аналогично субстанции), кратность введения зависела от модели опухоли, суммарная доза указана в разделе «Результаты» для каждой модели.

Цисплатин-ТЕВА (Pharmachemie B.V., Нидерланды, для Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Израиль), международное непатентованное наименование (МНН) – цисплатин, вводили внутривенно (в/в) однократно в дозе 4 мг/кг: 1/2 терапевтической дозы (ТД) через 24 ч или на 5-е (10-е) сутки после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на моделях опухолей Р-388, S-37, РШМ-5 и В-16.

Фторурацил-ЛЭНС (ООО «ЛЭНС-Фарм», дочерняя компания ОАО «ВЕРОФАРМ», Россия), МНН – 5-фторурацил, вводили однократно в/в в дозе 125 мг/кг (1/2 ТД) через 24 ч или на 5-е сутки после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на моделях опухолей С-26 и АКАТОЛ.

Гемзар (ЗАО «Биокад», Россия), МНН – гемцитабин, вводили в/в однократно в дозе 120 мг/кг (1/2 ТД) через 24 ч после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на модели опухоли Р-388.

Циклофосфан (Baxter Oncology GmbH, Германия), МНН – циклофосфамид, вводили однократно в/в в дозе 50 мг/кг (1/5 ТД) через 24 ч после инокуляции опухоли за 1 ч до 1-го введения ГМДП-А. Использовали на модели опухоли Р-388.

Лечение в опытных группах животных с солидными опухолями S-37, В-16, С-26 проводили на ранние сроки развития опухолей и отсроченно (1-е и 5-е сутки после инокуляции опухоли соответственно) в различных режимах: при 5-, 10- или 20-кратном ежедневном введении ГМДП-А п/к в зону, близко расположенную к опухоли. Мышам с асцитной формой опухоли ГМДП-А вводили 10-кратно в/в.

На моделях РШМ-5, АКАТОЛ и Р-388 сравнивали влияние сочетанного лечения ГМДП-А при п/к введении в зону, близко расположенную к опухоли, и симметричную область на противоположной стороне тела мыши.

За животными наблюдали до конца их жизни, регистрировали общее состояние животных, размеры опухоли и сроки гибели животных. У половины от общего числа животных в экспериментальных группах проводили аутопсию для оценки генерализации опухолевого процесса: у мышей с лимфолейкозом Р-388 – на 23-и сутки после инокуляции опухолевого материала, с меланомой В-16 – на 22-е

сутки, с опухолями РШМ-5, АКАТОЛ и С-26 — на 40–41-е сутки после прививки опухоли.

Оценка противоопухолевой и антиметастатической эффективности

Противоопухолевую эффективность сочетанного лечения оценивали по общепринятым критериям: динамика изменения объема опухоли ($v, \text{мм}^3$) = $d_1 \times d_2 \times d_3 \times 0,52$, где d_1, d_2 и d_3 — 3 взаимно перпендикулярных диаметра опухоли, уровень торможения роста опухоли (ТРО, %) = $(V_k - V_{\text{оп}}) / V_k \times 100$, где $V_{\text{оп}}$ — объем опухоли в опытной группе, V_k — объем опухоли в контрольной группе, и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) животных [19].

Влияние лечения на генерализацию опухолевого процесса у мышей с лимфолейкозом Р-388 и на моделях с лимфогенным метастазированием опухоли (РШМ-5, S-37) оценивали по частоте обнаружения вторичных опухолевых очагов (А, % — процент животных с метастазами в лимфатических узлах по отношению к общему количеству животных в группе) и уровню торможения их роста (ТА, %) = $M_{\text{оп}}(V_k) - M_{\text{оп}}(V_{\text{оп}}) / M_{\text{к}}(V_k) \times 100$, где $M_{\text{оп}}(V_{\text{оп}})$ — средняя суммарная масса пораженных опухолью лимфатических узлов в пересчете на 1 мышью в опытной группе, $M_{\text{к}}(V_k)$ — средняя суммарная масса пораженных опухолью лимфатических узлов в пересчете на 1 мышью в контрольной группе.

На моделях меланомы В-16, карцином С-26 и АКАТОЛ оценивали частоту метастазирования опухоли в легкие (ЧМ, %) и уровень торможения метастазирования (ТМ, %), рассчитанный по величинам средней массы легких у животных в опытной и контрольной группах [20].

Критериями эффективности противоопухолевых свойств лекарственных средств являлись ТРО ≥ 70 %, УПЖ ≥ 50 %, ТА (ТМ) ≥ 75 % [19].

Статистический анализ

Для анализа результатов исследования использовали стандартную компьютерную программу STATISTICA версии 8. Для цифровых данных, объема опухоли, лимфатических узлов и веса лимфатических узлов или легких вычисляли групповое среднее арифметическое (М) и стандартную ошибку среднего ($\pm m$). Для оценки достоверности различий между опытной и контрольной группами применяли Т-критерий Стьюдента. Различия между группами считали статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах оценили эффективность противоопухолевого действия ГМДП-А в монотерапии (данные не представлены). Биологически значимое влияние ГМДП-А на рост первичных

и/или вторичных (метастатических) очагов экспериментальных перевиваемых опухолей (солидные и асцитные варианты) не было выявлено ни для одной из перечисленных выше опухолей (см. раздел «Материалы и методы»).

Однако на моделях иммунозависимых опухолей (лимфолейкоз Р-388, меланома В-16, рак шейки матки РШМ-5) прослеживалась тенденция к противоопухолевому действию ГМДП-А по торможению роста первичных очагов. Учитывая данные литературы, можно предположить, что этот эффект обусловлен воздействием ГМДП-А на иммунную систему животных. На моделях Р-388 и РШМ-5 не было отмечено значимого различия в эффективности лечения мышей при введении ГМДП-А в зону, близко расположенную к опухоли, или в зону, удаленную от места инокуляции опухоли. Это свидетельствует в пользу дистантного действия ГМДП-А, которое свойственно различным иммуномодулирующим средствам, и может косвенно подтверждать иммунный механизм воздействия.

Полученные в предварительных опытах результаты послужили основанием для развития исследований с использованием химиоиммунологической комбинации и изучения ГМДП-А в качестве модификатора биологических реакций, а именно изучения его модифицирующего действия в отношении эффективности химиотерапии традиционными цитостатическими препаратами.

Исследовали как субстанцию, так и готовую лекарственную форму ГМДП-А. Они не различались по физиологическому действию на различных моделях, поэтому в дальнейшем будут приведены объединенные данные по обоим лекарственным средствам.

На модели лимфолейкоза Р-388 (солидный вариант) сравнили эффективность сочетанного лечения мышей цисплатином и ГМДП-А при различных схемах воздействия: при раннем и отсроченном начале лечения (курсовая доза ГМДП-А 37,5 мг/кг), при раннем начале лечения и различной курсовой дозе ГМДП-А (37,5 и 78,5 мг/кг), а также при п/к введении ГМДП-А (курсовая доза 78,5 мг/кг) в зону, близко расположенную к опухоли, или в симметричную область тела на противоположном боку животного.

Показано, что введение ГМДП-А достоверно повышало терапевтическое действие химиотерапии с использованием низкоэффективной дозы цисплатина ($1/2$ ТД). При этом выраженное улучшение результатов лечения по показателям ТРО и ТА наблюдалось не только при раннем, но и при отсроченном начале лечения: ТРО и ТА в группах сочетанной терапии на 30–40 % превышало таковое в группах цисплатина (рис. 1, табл. 1). Однако продолжительность жизни животных во всех группах оставалась

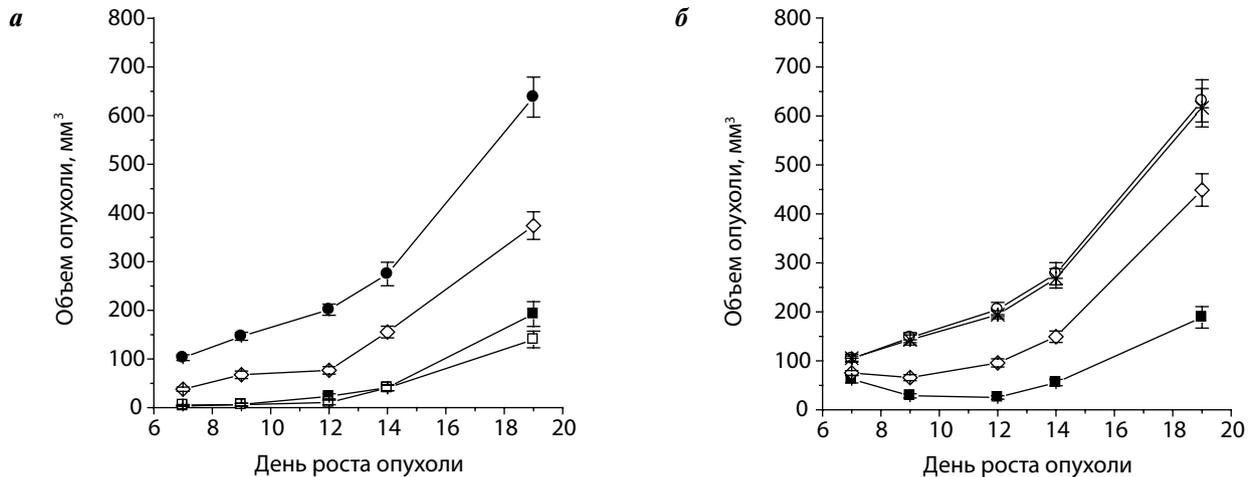


Рис. 1. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина у мышей BDF1 с солидным вариантом лимфолейкоза P-388 в зависимости от режима воздействия. Начало лечения на 1-е сутки (а) или на 5-е сутки (б) после инокуляции опухоли. Воздействие: ■ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 10-кратно; □ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 20-кратно; ◇ – цисплатин внутривенно однократно; * – вода для инъекций подкожно 10-кратно; ● – вода для инъекций подкожно 20-кратно; ○ – без воздействия. Дозы: ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг; цисплатин – 4 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm m$ ($n = 10$)

Таблица 1. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей с солидным вариантом лимфолейкоза P-388, получавших лечение цисплатином, в зависимости от режима воздействия

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	А, %	ТА, %
Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли					
1	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	25 ± 1	4	100	88
2	Цисплатин + ГМДП-А, 20-кратно	27 ± 1	13	100	80
3	Цисплатин	23 ± 1	-4	100	49
4	Вода для инъекций, 20-кратно	24 ± 1	0	100	4
Начало лечения на 5-е сутки роста опухоли					
5	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	25 ± 3	4	100	83
6	Цисплатин	24 ± 1	0	100	50
7	Вода для инъекций, 10-кратно	24 ± 1	0	100	-1
8	Без воздействия	24 ± 1	-	100	-

Примечание. Цисплатин – 4 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг п/к. СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; А – частота обнаружения вторичного поражения лимфатических узлов; ТА – торможение роста вторичных опухолевых очагов.

сходной. Не обнаружено достоверных различий в модифицирующем действии ГМДП-А при п/к введении субстанции в непосредственной близости от опухоли или в отдаленной от опухоли симметричной области тела (рис. 2а, табл. 2).

Усиление терапевтического действия цитостатиков по всем исследованным показателям – ТРО, УПЖ и ТА, независимо от отдаленности места введения ГМДП-А по отношению к опухолевому очагу, было получено на модели P-388 с использованием гемцитабина и циклофосфида (рис. 2б, в, табл. 2).

На модели меланомы В-16 отмечено модифицирующее влияние ГМДП-А на терапевтическую эффективность цисплатина как при раннем, так и при отсроченном начале лечения. При этом на фоне слабого потенцирующего действия на эффект цитостатика в отношении ингибирования роста первичного очага меланомы (рис. 3) добавление в схему лечения мышей ГМДП-А в курсовой дозе 18,75 или 37,5 мг/кг приводило к выраженному торможению метастазирования опухоли, а при раннем начале лечения – к достоверному УПЖ животных (табл. 3).

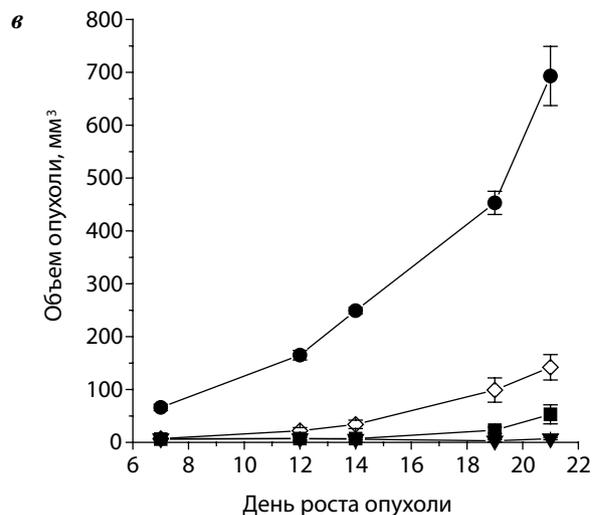
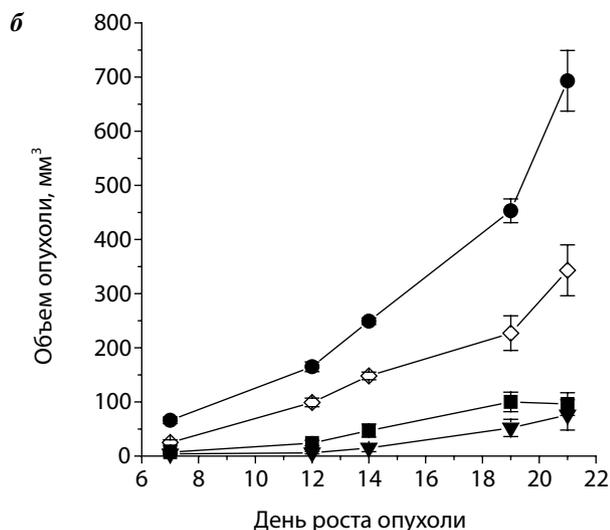
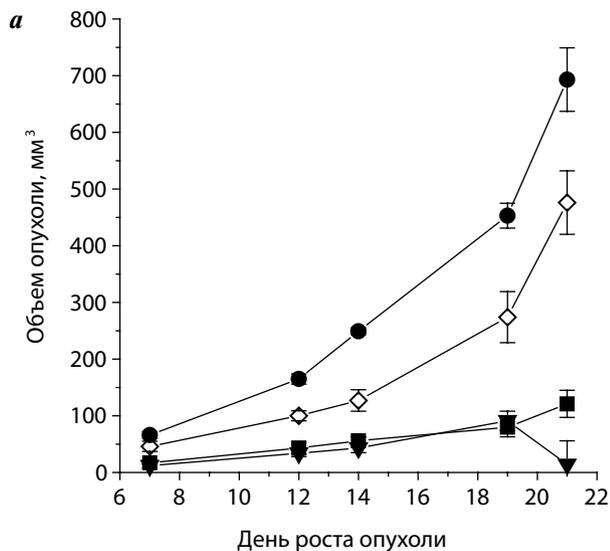


Рис. 2. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина (а), гемцитабина (б) и циклофосфамида (в) у мышей BDF1 с солидным вариантом лимфолейкоза Р-388 в зависимости от места введения ГМДП-А. Начало лечения на 1-е сутки после инокуляции опухоли. Воздействие: ■ – цитостатик однократно и ГМДП-А 20-кратно, введение подкожно рядом с опухолевым узлом; ▼ – то же, введение ГМДП-А в симметричную область на противоположной стороне тела животного; ◇ – цитостатик внутривенно однократно; ● – вода для инъекций подкожно 20-кратно. Дозы: ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг; цисплатин – 4 мг/кг; гемцитабин – 120 мг/кг; циклофосфамид – 50 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm m$ ($n = 10$)

На модели плоскоклеточного рака шейки матки РШМ-5 оценили влияние ГМДП-А на эффективность терапевтического действия цисплатина при начале лечения через 1 сут после инокуляции опухолевого материала и через 10 сут (срок обусловлен медленным ростом опухоли).

Выявлено, что при раннем начале лечения ГМДП-А усиливал терапевтическое действие цисплатина, особенно при длительном (10-кратном) введении (курсовая доза 37,5 мг/кг) (рис. 4). Показатели ТРО, УПЖ и ТА в группах животных, получавших сочетание цисплатина и ГМДП-А, были выше, чем в группе животных, получавших только цисплатин. Однако более позднее начало лечения с применением указанных схем оказалось неэффективным (табл. 4).

Увеличение разовой дозы ГМДП-А до 7,5 мг/кг и курсовой дозы до 150,0 мг/кг не приводило к увеличению выраженности противоопухолевого эффекта сочетанного воздействия. Как и на других

опухолевых моделях, у мышей с опухолью РШМ-5 не выявлено отличий в эффекте модифицирующего действия при введении ГМДП-А рядом с подкожной опухолью или в симметричную область на противоположной стороне тела животного (данные не представлены).

Таким образом, сравнительная оценка эффективности потенцирующего действия ГМДП-А на чувствительных моделях (Р-388, В-16 и, в меньшей степени, РШМ-5) показала, что в схемах сочетанной терапии с редуцированными дозами цитостатиков препарат позволяет обеспечить уровень терапевтического действия, отвечающий требованиям эффективности по критериям, принятым для оценки активности противоопухолевых средств.

На других опухолевых моделях – саркоме S-37 (солидный и асцитный варианты), аденокарциномах толстой кишки С-26 и АКАТОЛ – не отмечено увеличения противоопухолевого действия цитостатических препаратов (цисплатин, 5-фторурацил)

Таблица 2. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей с солидным вариантом лимфолейкоза Р-388, получавших лечение цитостатиками, в зависимости от места подкожного введения ГМДП-А

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	А, %	ТА, %
Цисплатин и ГМДП-А					
1	Цисплатин + ГМДП-А*	29 ± 2	21	100	55
2	Цисплатин + ГМДП-А**	34 ± 2	39	100	51
3	Цисплатин	26 ± 1	9	100	40
Гемцитабин и ГМДП-А					
5	Гемцитабин + ГМДП-А*	38 ± 4	57	100	73
6	Гемцитабин + ГМДП-А**	34 ± 2	43	100	70
7	Гемцитабин	29 ± 2	21	100	69
Циклофосфамид и ГМДП-А					
8	Циклофосфамид + ГМДП-А*	39 ± 2	61	100	88
9	Циклофосфамид + ГМДП-А**	37 ± 3	54	100	90
10	Циклофосфамид	31 ± 2	30	100	89
11	Вода для инъекций, 20-кратно	24 ± 3	0	100	-3
12	Без воздействия	24 ± 1	—	100	—

Примечание. Цисплатин — 4 мг/кг в/в однократно; гемцитабин — 120 мг/кг в/в однократно; циклофосфамид — 50 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А — разовая доза 3,75 мг/кг п/к 20-кратно; *рядом с опухолевым узлом, **симметричная область на противоположной стороне тела животного. Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли. СПЖ — средняя продолжительность жизни; УПЖ — увеличение продолжительности жизни; А — частота обнаружения вторичного поражения лимфатических узлов; ТА — торможение роста вторичных опухолевых очагов.

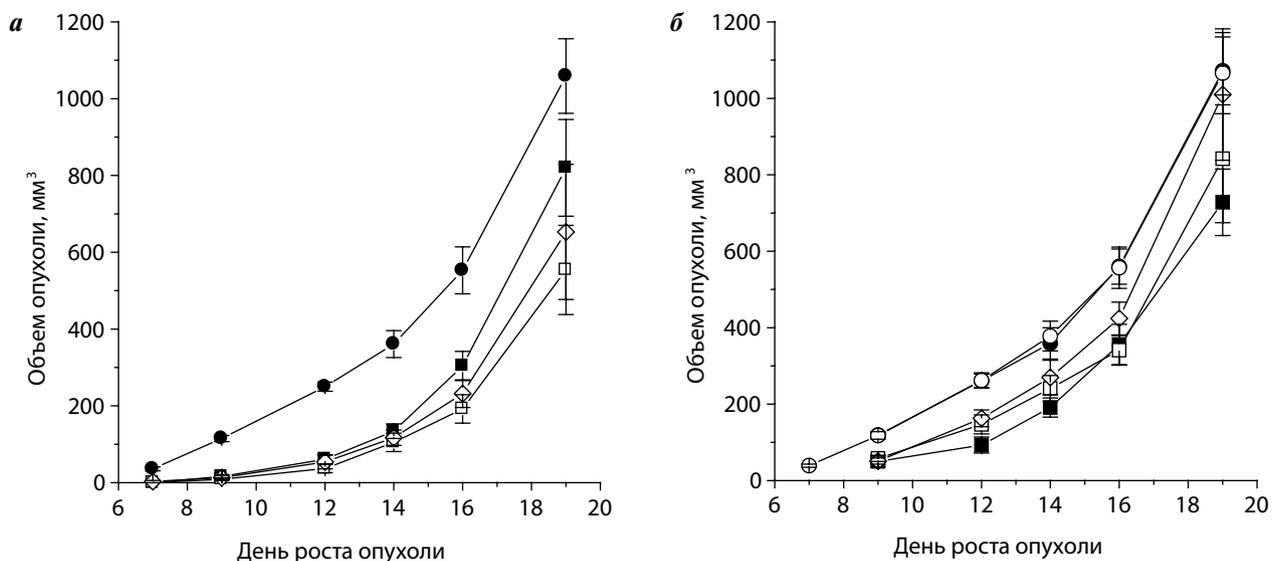


Рис. 3. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина у мышей С57В1/6j с подкожно привитой меланомой В-16, в зависимости от режима воздействия. Начало лечения на 1-е сутки (а) или на 5-е сутки (б) после инокуляции опухоли. Воздействие: ■ — цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 5-кратно; □ — цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 10-кратно; ◇ — цисплатин внутривенно однократно; ● — вода для инъекций подкожно 10-кратно; ○ — без воздействия. Дозы: цисплатин — 4 мг/кг, ГМДП-А — разовая доза 3,75 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm m$ ($n = 10$)

при их сочетании с ГМДП-А в различных дозах и режимах. То есть, как и при монотерапии ГМДП-А, эффективность его добавления в схему химиотера-

певтического воздействия зависела от гистологической формы опухоли и проявлялась только в отношении иммунозависимых опухолей.

Таблица 3. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей C57Bl/6j с подкожно привитой меланомой В16, получавших лечение цисплатином, в зависимости от режима воздействия

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	ЧМ, %	ТМ, %
Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли					
1	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	29 ± 3	38	20	99
2	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	39 ± 1	86	20	99
3	Цисплатин	28 ± 3	33	20	99
4	Вода для инъекций, 10-кратно	22 ± 5	5	100	0
Начало лечения на 5-е сутки роста опухоли					
5	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	31 ± 4	48	20	99
	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	28 ± 6	33	30	83
6	Цисплатин	25 ± 3	19	100	11
7	Вода для инъекций, 10-кратно	21 ± 2	0	100	0
8	Без воздействия	21 ± 3	–	100	–

Примечание. Цисплатин – 4 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А – п/к, разовая доза 3,75 мг/кг. СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; ЧМ – частота метастазирования в легкие; ТМ – торможение роста метастазов в легких.

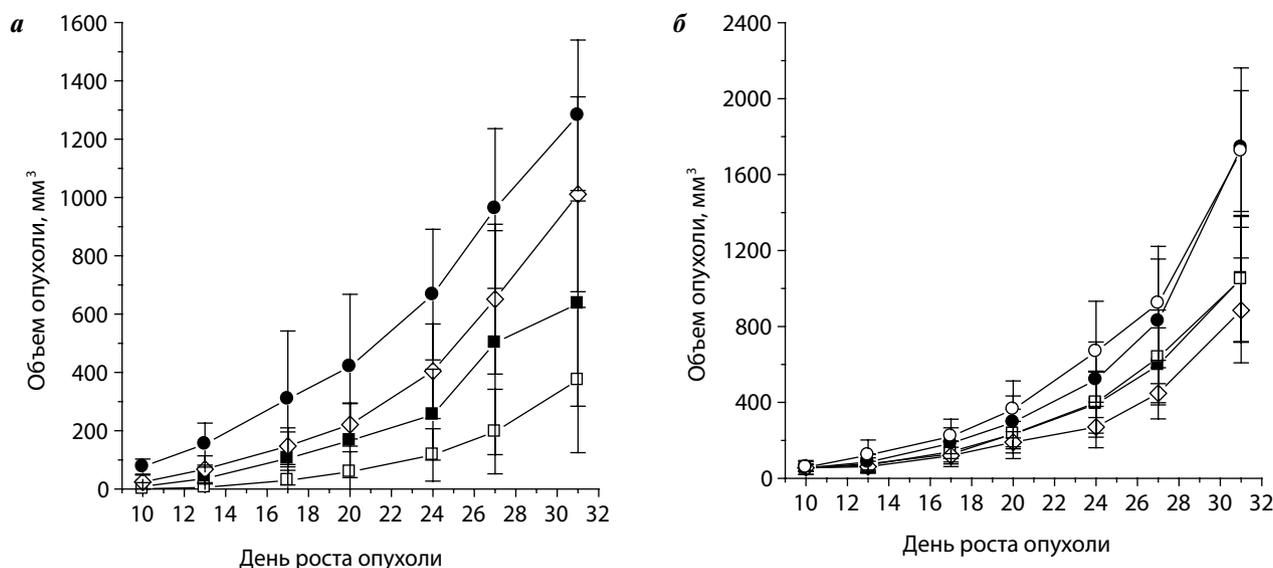


Рис. 4. Влияние ГМДП-А на лечебное действие цисплатина у мышей-гибридов F1 с подкожно привитым РШМ-5 в зависимости от режима воздействия. Начало лечения на 1-е сутки (а) или на 10-е сутки (б) после инокуляции опухоли. Воздействие: □ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 10-кратно; ■ – цисплатин внутривенно однократно и ГМДП-А подкожно 5-кратно; ◇ – цисплатин внутривенно однократно; ● – вода для инъекций подкожно 10-кратно; ○ – без воздействия. Дозы: цисплатин – 4 мг/кг; ГМДП-А – разовая доза 3,75 мг/кг. Кривые отражают динамику роста первичной опухоли, данные представлены в виде $M \pm t$ ($n = 10$)

Полученные данные коррелируют с результатами экспериментальных исследований противоопухолевой активности ГМДП, близкого аналога ГМДП-А, в различных моделях перевиваемых опухолей [14], в которых отмечена способность ГМДП угнетать рост экспериментальных опухолей и их метастазирование *in vivo*. На основании анализа экспериментальных данных авторы предполагают, что отмеченные

эффекты обусловлены активирующим влиянием ГМДП на врожденный иммунитет и увеличением экспрессии опухолевых маркеров на трансформированных клетках. В обзоре также приведены доказательства потенцирующего действия ГМДП на эффекты цитостатических препаратов и его способности восстанавливать гемопоэз, нарушенный в результате химиотерапии.

Таблица 4. Влияние ГМДП-А на показатели продолжительности жизни и генерализации опухолевого процесса у мышей с подкожно привитым РШМ-5, получавших лечение цисплатином, в зависимости от режима воздействия

Группа	Режим воздействия	СПЖ, дни	УПЖ, %	А, %	ТА, %
Начало лечения на 1-е сутки роста опухоли					
1	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	69 ± 6	50	100	51
2	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	61 ± 11	33	100	44
3	Цисплатин	51 ± 5	11	100	33
4	Вода для инъекций, 10-кратно	43 ± 4	-7	100	21
Начало лечения на 10-е сутки роста опухоли					
5	Цисплатин + ГМДП-А, 10-кратно	49 ± 4	7	100	0
6	Цисплатин + ГМДП-А, 5-кратно	55 ± 5	20	100	13
7	Цисплатин	51 ± 3	11	100	36
8	Вода для инъекций, 10-кратно	43 ± 3	-7	100	0
9	Без воздействия	46 ± 2	—	100	—

Примечание. Цисплатин – 4 мг/кг в/в однократно; ГМДП-А – п/к, разовая доза 3,75 мг/кг. СПЖ – средняя продолжительность жизни; УПЖ – увеличение продолжительности жизни; А – частота обнаружения вторичного поражения лимфатических узлов; ТА – торможение роста вторичных опухолевых очагов.

Заключение

В настоящем исследовании на моделях мышинных опухолей показано, что ГМДП-А при п/к введении проявляет модифицирующие свойства в отношении ряда цитостатических препаратов: цисплатина, гемцитабина и циклофосамида, усиливая их противоопухолевое действие, что подтверждает потенциал ГМДП-А

как модификатора биологических реакций. Поскольку наиболее выраженный эффект ГМДП-А отмечен на модели лимфолейкоза Р-388, этот препарат может быть рекомендован для клинических испытаний при химиотерапии больных с онкогематологическими заболеваниями в качестве агента, потенцирующего противоопухолевое действие цитостатиков.

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. 236 с.
2. Sorbara M. T., Philpott D. J. Peptidoglycan: a critical activator of the mammalian immune system during infection and homeostasis. *Immunol Rev* 2011;243(1):40–60. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2011.01047.x. PMID: 21 884 166.
3. Girardin S. E., Boneca I. G., Viala J. et al. NOD2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* 2003; 278(11):8869–72. DOI: 10.1074/jbc.C200651200. PMID: 12527755.
4. Laman A. G., Lathe R., Savinov G. V. et al. Innate immunity: bacterial cell-wall muramyl peptide targets the conserved transcription factor YB-1. *FEBS Lett* 2015;589(15):1819–24. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.028. PMID: 26026270.
5. Lyabin D. N., Eliseeva I. A., Ovchinnikov L. P. YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5(1):95–110. DOI: 10.1002/wrna. 1200. PMID: 24217978.
6. Grimes C. L., Ariyananda L. Z., Melnyk J. E., O'Shea E. K. The innate immune protein NOD2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J Am Chem Soc* 2012;134(33):13535–7. DOI: 10.1021/ja303883c. PMID: 22857257.
7. Meshcheryakova E., Makarov E., Philpott D. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine* 2007;25(23):4515–20. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.04.006. PMID: 17481783.
8. Pan Q., Mathison J., Fearn C. et al. MDP-induced interleukin-1 beta processing requires NOD2 and CIAS1/NALP3. *J Leukoc Biol* 2007;82(1):177–83. DOI: 10.1189/jlb.1006627. PMID: 17403772.
9. Windheim M., Lang Ch., Peggie M. et al. Molecular mechanisms involved in the regulation of cytokine production by muramyl dipeptide. *Biochem J* 2007;404(2):179–90. DOI: 10.1042/BJ20061704. PMID: 17348859.
10. Yang S., Tamai R., Akashi S. et al. Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid

- to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect. Immun.* 2001;69(4):2045–53. DOI: 0.1128/IAI.69.4.2045–2053.2001. PMID: 11254557.
11. Valyakina T.I., Malakhov A., Malakhova N. et al. Glucosaminylmuramyl dipeptide induced changes in phenotype of melanoma cells result in their increased lysis by peripheral blood cells. *Int J Oncol* 1996;9(5):885–91. PMID: 21541591.
 12. Hoos A. Development of immune-oncology drugs – from CTLA4 to PDI to the next generations. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15(4):235–47. DOI: 10.1038/nrd.2015.35. PMID: 26965203.
 13. Trescec A., Iskrić S., Ljevaković D. et al. The effects of immunomodulating peptidoglycan monomer and muramyl dipeptide on hepatic microsomal UDP-glucuronyltransferase and beta-glucuronidase. *Int J Immunopharmacol* 1987;9(3):371–8. DOI: 10.1016/0192–0561(87)90063–4. PMID: 3112033.
 14. Козлов И.Г., Воронина Е.В., Валякина Т.И. и др. Липопид в иммунотерапии опухолей: обзор экспериментальных исследований. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2011;10(2):2–7.
 15. Dong Y., Wang S., Wang C. et al. Antagonizing NOD2 signaling with conjugates of Paclitaxel and muramyl dipeptide derivatives sensitizers Paclitaxel therapy and significantly prevents tumor metastasis. *J Med Chem* 2017;60(3)1219–24. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b01704. PMID: 28075581.
 16. Yoon H.E., Ahn M.Y., Kwon S.M. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2) activation induces apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells. *J Oral Pathol Med* 2016;45(4):262–7. DOI: 10.1111/jop.12354. PMID: 26332444.
 17. Петрова Е.Е., Валякина Т.И., Комалева Р.Л. и др. Глюкозаминилмурамилдипептид потенцирует действие ФНО- α и цисплатина на трансформированные клеточные линии *in vitro*. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2007;143(2);251–4.
 18. Андропова Т.М., Добрушина Е.П., Нижник Е.В. и др. Патент RU № 2573991 «Способ получения N-ацетилглюкозаминил-N-ацетилмурамил-L-аланил-D-глутаминовой кислоты». Оpubл. 27.01.2016.
 19. 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.
 20. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. Под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 637–651.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ЦИФЕТРИЛИНА (СООБЩЕНИЕ II)

Л.М. Борисова, М.П. Киселева, В.Н. Осипов, Л.П. Сушинина, С.В. Устинкина,
Л.И. Смирнова, З.С. Шпрах

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

Контакты: Лариса Михайловна Борисова larib@inbox.ru

Введение. Поиск активных соединений среди аналогов цифетрилина является одним из перспективных направлений в синтезе новых производных, имеющих более высокую устойчивость к ферментативному расщеплению. В сообщении I был представлен синтез новых производных цифетрилина с различными функциональными заместителями (тиазолидином, нафтилом, ремантадином, хлорфенацилом и цифелином), наличие которых при связывании с рецепторами на поверхности опухолевых клеток позволит усилить цитотоксический эффект модифицированных соединений цифетрилина на опухоль.

Цель исследования — изучение противоопухолевой активности синтезированных аналогов цифетрилина, модифицированных цитотоксическими агентами.

Материалы и методы. Исследования проведены на перевиваемых опухолях мышей: аденокарциноме молочной железы Ca-755 и меланоме B-16. Растворы препаратов готовили *ex tempore* с применением диметилсульфоксида или этилового спирта, разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до 10 % концентрации и вводили самкам мышей-гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) ежедневно подкожно в дозах 5, 10, 20 и/или 30 мг/кг в течение 5 дней. Критериями противоопухолевого эффекта служили торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) подопытных животных по сравнению с контрольными.

Результаты. Вос-Cys (Thp) — Phe-D-Trp-Lys (ClPhe) — Thr-OMe — пентапептид, модифицированный по N^ε-группе лизина хлорфенацилом, в дозе 5 мг/кг на аденокарциноме молочной железы Ca-755 показал кратковременный противоопухолевый эффект непосредственно после окончания лечения (ТРО = 73 %). Вос-Phe-D-Trp-Lys (Ac-Sar-Val) — Thr-OMe — тетрапептид, модифицированный по N^ε-группе лизина цифелином, в дозе 10 мг/кг вызывал торможение роста меланомы B-16 на 75–85 % в течение 4 дней после окончания лечения и увеличивал продолжительность жизни (УПЖ) мышей на 29 %.

Заключение. Из 7 модифицированных цитотоксическими агентами аналогов цифетрилина 2 проявили противоопухолевую активность, что свидетельствует о перспективности их дальнейшего исследования как противоопухолевых соединений на других опухолевых моделях.

Ключевые слова: аналоги цифетрилина, цитотоксические агенты, перевиваемые опухоли, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-23-29

CYPHETRYLIN CYTOTOXIC ANALOGUES (REPORT II)

L.M. Borisova, M.P. Kiseleva, V.N. Osipov, L.P. Sushinina, S.V. Ustinkina,

L.I. Smirnova, Z.S. Shprakh

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

Introduction. Search of active compounds among cyphetrylin analogues is one of prospective directions in synthesis of new compounds that have higher resistance to fermentation. The report I presented the synthesis of new cyphetrylin compounds with various functional substituents (thiazolidin, naphthyl, rimantadine, chlorophenacyl and cyphelin), their presence on the surface of tumor cells when binding to receptors would enhance the cytotoxic effect of modified cyphetrylin compounds on tumor.

Objective. The study of anti-tumor activity of the synthesized analogues cyphetrylin modified by cytotoxic agents.

Materials and methods. The research was carried out on the transplanted murine tumors: breast adenocarcinoma Ca-755 and melanoma B-16. Drug solutions were prepared *ex tempore* with the use of dimethylsulfoxide or ethanol diluted with saline to a concentration of 10 % and was administered to female mice-hybrids F1 (C57Bl/6 × DBA/2) daily subcutaneous injection in doses of 5, 10, 20 and/or 30 mg/kg for 5 days. The criteria of antitumor effect served the tumor growth inhibition (TGI, %) and the increase in lifespan (ILS, %) of test animals compared to the controlled.

Results. Вос-Cys(Thp) — Phe-D-Trp-Lys(ClPhe) — Thr-OMe — pentapeptide modified by chlorophenacyl lysine at N^ε-group in a dose of 5 mg/kg on breast adenocarcinoma Ca-755 showed a short-term antitumor effect directly after the end of the treatment (TGI = 73 %). Вос-Phe-D-Trp-Lys (Ac-Sar-Val) — Thr-OMe — tetrapeptide modified by cyphelin lysine at N^ε-group in a dose of 10 mg/kg caused melanoma B-16 growth inhibition for 75–85 % within 4 days after the end of the treatment and increased lifespan (ILS) of mice for 29 %.

Conclusion. 2 of 7 cyphetrylin analogues, modified by cytotoxic agents, showed antitumor activity, that indicate the prospects for their further research as antitumor compounds on other tumor models.

Key words: cyphetrylin analogues, cytotoxic agents, transplanted tumors, antitumor activity

Введение

Химиотерапия гормонозависимых опухолей остается одним из актуальных направлений в лечении онкологических заболеваний. Повышенное внимание к проблеме гормонозависимости опухолей в аспекте их возможной химиотерапии создает условия для применения гормонов в качестве противоопухолевых средств. В этом ключе ведется активный поиск противоопухолевых соединений среди агентов, способных избирательно воздействовать на гормонозависимые опухоли через рецепторы гормонов. К таким агентам относятся пептидные гормоны гипоталамуса, в частности соматостатин [1–3].

Прямое цитотоксическое действие соматостатина реализуется через специфическое взаимодействие активного центра молекулы с рецепторами, локализованными на поверхностной мембране клеток тканей-мишеней, и осуществляется путем ингибирования внутриклеточной тирозинфосфатазы, блокады митогенных сигнальных путей и индукции апоптоза. Непрямой антипролиферативный эффект обусловлен снижением секреции ряда гормонов и факторов роста опухолей (соматотропного гормона, инсулиноподобного фактора роста, гастрин, глюкагона, вазоактивного интестинального пептида, инсулина, холецистокинина, мотилина, серотонина и др.) и подавлением неоваскуляризации [4–6].

Имеется 5 типов рецепторов соматостатина (SSTR₁₋₅), которые в разной степени экспрессируются как в тканях различных областей центральной нервной системы (в передней доле гипофиза, в гипоталамусе, спинном мозге), так и в тканях желудочно-кишечного тракта (преимущественно поджелудочной железы, желудка, верхних отделов тонкого кишечника) и легких [7, 8].

В связи с двойным механизмом действия аналога соматостатина обладают широким спектром биологического действия, в частности при нейроэндокринных опухолях органов брюшной полости, забрюшинной клетчатки, включая карциноидные опухоли [9–11].

Необходимо отметить, что особенность пептидных гормонов состоит в высокой избирательности их действия и отсутствии токсичности. Однако недостатком соединений этого класса является их быстрый гидролиз под действием протеинкиназ. Время полураспада природных соматостатинов в крови составляет 1–3 мин, что делает их мало пригодными в качестве лекарственных средств для практического

применения [12, 13]. В связи с этим синтезирован ряд аналогов соматостатина, на основе которых созданы препараты для применения в клинической практике [14]. Синтетический аналог соматостатина – сандостатин (Октреотид), разработанный в 80-е годы XX века, используется для купирования карциноидного синдрома, характерного для нейроэндокринных опухолей. В последние годы появились сообщения об антипролиферативном действии высоких доз аналогов соматостатина [6, 15–17].

Исследования по поиску потенциальных противоопухолевых соединений в ряду аналогов соматостатина активно проводятся в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» (РОНЦ им. Н. Н. Блохина) Минздрава России. В лаборатории химического синтеза классическими методами пептидной химии с использованием современных защитных групп и методов конденсации синтезирован ряд аналогов соматостатина [18, 19]. Среди них цифетрилин показал высокую противоопухолевую активность в системе скрининга. Цифетрилин представляет собой защищенный по функциональным группам пентапептид – метиловый эфир N^α-трет-бутилокси-карбонил-S-тетрагидропиранил-L-цистеинил-L-фенилаланил-D-триптофил-N^α-карбобензоксид-L-лизил-L-треонина. Углубленное изучение цифетрилина привело к созданию лекарственной формы препарата для перорального применения и проведению доклинических исследований [20–22].

В сообщении I был представлен синтез новых производных цифетрилина, в которых молекулы синтетического аналога выступают в качестве специфического носителя цитотоксических групп, ответственных за связывание с рецептором с целью повышения прямого цитотоксического эффекта на опухоль. Подтверждены строение и чистота синтезированных аналогов цифетрилина, содержащих цитотоксические группы [23].

Цель настоящего исследования состоит в изучении противоопухолевой активности синтезированных аналогов цифетрилина, модифицированных цитотоксическими агентами.

Материалы и методы

В качестве изучаемых соединений представлены 7 синтезированных цитотоксических аналогов цифетрилина:

- Boc-Cys(Thp) – Phe-D-Trp-Lys(CIPhe) – Thr-OMe – пентапептид, содержащий по N^ε-группе лизина хлорфенацил (соединение I);

- Boc-Thz-Phe-D-Trp-Lys(Boc) – Thr-OMe – тетрапептид, содержащий по N^α-группе фенилаланина Boc-тиазолидин (соединение II);
- Boc-Cys(Boc) – Phe-D-Trp-Lys(Boc) – Thr-NH-naphthyl – пентапептид, модифицированный нафтилом (соединение III);
- ClPhe-Cys(Thp) – Phe-D-Trp-Lys(Z) – Thr-OMe – пентапептид, содержащий по N^α-группе цистеина хлорфенацил (соединение IV);
- Z-Phe-D-Trp-Lys(Boc) – Thr-remantadyl – тетрапептид, модифицированный ремантадином (соединение V);
- Ac-Sar-Val-Cys(Thp) – Phe-D-Trp-Lys(Z) – Thr-OMe – пентапептид, содержащий по N^α-группе цистеина цифелин (соединение VI);
- Boc-Phe-D-Trp-Lys(Ac-Sar-Val) – Thr-OMe – тетрапептид, модифицированный по N^ε-группе лизина цифелином (соединение VII).

Предполагается, что наличие в молекуле цифетрилина различных цитотоксических агентов: тиазолидина, нафтила, ремантадина, хлорфенацила и цифелина позволит усилить цитотоксический эффект модифицированных соединений цифетрилина при связывании с рецепторами соматостатина на поверхности опухолевых клеток.

Исследование противоопухолевой активности цитотоксических аналогов цифетрилина проводили на солидных, различных по метаболическим типам перевиваемых опухолях мышей – аденокарциноме молочной железы Ca-755 и меланоме В-16. Известно, что Ca-755 является незаменимой моделью при изучении соответствующих гормональных или опосредуемых эндокринной системой эффектов [24]. Предварительная оценка уровня экспрессии рецепторов соматостатина была проведена в лаборатории гистохимии и электронной микроскопии НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Методом иммуногистохимического анализа в аденокарциноме молочной железы Ca-755 выявлена экспрессия соматостатиновых рецепторов 1, 2 и 5-го типов (SSTR₁, SSTR₂ и SSTR₃), в меланоме В-16 – 2-го и 5-го типов (SSTR₂, SSTR₅).

Изучение противоопухолевой эффективности аналогов цифетрилина проводили на самках мышей-гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) с массой тела 20–22 г. Мышей получали из филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России» и содержали в виварии с естественным освещением на брикетированном корме и постоянном доступе к воде. Перевиваемые опухоли мышей Ca-755 и В-16 получены из банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина». Штаммы аденокарциномы молочной железы Ca-755 и мела-

номы В-16 поддерживали на самках линейных мышей C57Bl/6. Для опытов опухоли перевивали мышам-гибридам F1 (C57Bl/6 × DBA/2) подкожно (п/к) в правую подмышечную область по 0,5 мл (50 мг) взвеси опухолевых клеток при разведении 1 : 10 в среде № 199.

Группы животных формировали с учетом получения статистически достоверных результатов: контрольная группа состояла из 10 мышей, опытные группы – из 8 мышей. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухолей.

В период наблюдения оценивали состояние и поведение мышей, следили за возможной гибелью животных.

Экспериментальные исследования выполнялись в соответствии с рекомендованными методиками [24, 25].

Представленные к изучению аналоги цифетрилина не растворяются в воде, поэтому навески соединений I, II, III, IV и V по 4 и 20 мг растворяли в диметилсульфоксиде или спирте этиловом и разводили 0,9 % раствором натрия хлорида до 10 % концентрации для получения препаратов с концентрацией 1 и 5 мг/мл соответственно. Соединения VI и VII готовили в растворе крахмального клейстера и вводили подопытным животным в концентрации 1 мг/мл.

Аналоги цифетрилина – соединения I, II, III и IV изучали на аденокарциноме молочной железы Ca-755 мышей при ежедневном п/к введении в течение 5 дней. Соединения I и II вводили в дозах 5, 10, 20 и 30 мг/кг, соединения III и IV – в дозах 5, 10 и 20 мг/кг.

Соединения I, V, VI и VII исследовали на меланоме В-16 в дозах 5, 10 и 20 мг/кг при ежедневном п/к введении в течение 5 дней. Выбор п/к способа введения сделан на основании известных свойств пептидных соединений, связанных с продолжительностью терапевтического воздействия, при применении их классических аналогов в клинической практике (Октреотид, Ланреотид) [15].

Препаратом сравнения являлась лекарственная форма цифетрилина в виде таблеток с содержанием 6 мг действующего вещества, которые растворяли в крахмальном клейстере до концентрации 1 мг/мл. Цифетрилин вводили в терапевтической дозе 10 мг/кг при ежедневном 5-кратном пероральном применении.

Экспериментальное изучение новых аналогов цифетрилина проходило в соответствии с требованиями международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [26–28].

Противоопухолевый эффект оценивали по критериям: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %)

подопытных животных по сравнению с контрольными.

ТРО вычисляли по формуле:

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

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

V_o – средний объем опухолей в опытной группе (мм^3).

УПЖ вычисляли по формуле:

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

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 % [25].

Статистическая обработка

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы STATISTICA версии 6.0. Различия между сравниваемыми группами считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

Представленные соединения изучены в дозах 5, 10 и 30 мг/кг при ежедневном п/к введении в течение 5 дней. Из данных табл. 1 видно, что при первичном исследовании противоопухолевой активности синтезированных аналогов цифетрилина в отношении аденокарциномы молочной железы Са-755 мышей соединение I в дозе 5 мг/кг проявило статистически значимый противоопухолевый эффект непосредственно в 1-й день после окончания лечения (ТРО = 73 %). Далее наблюдалось снижение эффекта соединения I до значений ниже минимального критерия активности. В дозах 10 и 30 мг/кг получено близкое к минимальному критерию активности ТРО, равное 51 и 59 % соответственно, также сразу после окончания лечения. Далее активность соединения I в этих дозах понижалась и к 5-му дню составляла 36 и 38 % соответственно.

Соединение II в дозах 20 и 30 мг/кг показало ТРО Са-755, близкое к минимальному критерию активности, непосредственно после окончания лечения: 48 и 59 % соответственно. В последующие дни наблюдения в исследуемых дозах противоопухолевого эффекта не отмечалось.

Соединение III на Са-755 в дозах 5, 10 и 20 мг/кг при ежедневном 5-кратном п/к введении оказалось

Таблица 1. Изучение противоопухолевого действия аналогов цифетрилина на аденокарциному молочной железы Са-755 при подкожном введении препаратов

Соединение	№ группы	Доза (мг/кг)/ интервал (ч) × число введений	ТРО, %				УПЖ, %
			Дни после окончания лечения				
			1	5	8	11	
I	1	5/24 × 5	73*	34	22	–	11
	2	10/24 × 5	51	36	14	–	13
	3	30/24 × 5	59*	38	8	–	10
II	4	5/24 × 5	33	1	+6	–	10
	5	20/24 × 5	48	32	11	–	12
	6	30/24 × 5	59*	0	+33	–	11
III	7	5/24 × 5	31	40	+4	13	14
	8	10/24 × 5	38	40	7	6	23
	9	20/24 × 5	32	43	4	6	19
IV	10	5/24 × 5	6	18	+11	+21	18
	11	10/24 × 5	+24***	33	+7	+9	15
	12	20/24 × 5	+13	46	16	+2	38
Цифетрилин (перорально)	13	10/24 × 5	79**	63	50	24	11

Примечание. ТРО – торможение роста опухоли; УПЖ – увеличение продолжительности жизни. * $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** $p > 0,05$ между группами I и 13; ***знак «+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 2. Изучение противоопухолевого действия аналогов цифетрилина на меланому В-16 при подкожном введении препаратов

Соединение	№ группы	Доза (мг/кг)/ интервал (ч) × число введений	ТРО, %					УПЖ, %
			Дни после окончания лечения					
			1	3–4	7–8	10–11	15	
I	1	5/24 × 5	35	31	0	+4	–	20
	2	10/24 × 5	24	+5***	+9	+44	–	14
	3	20/24 × 5	16	16	+7	+19	–	8
V	4	5/24 × 5	9	22	13	16	–	6
	5	10/24 × 5	33	27	12	0	–	19
	6	20/24 × 5	10	16	+3	+15	–	4
VI	7	5/24 × 5	40	17	+4	+1	0	10
	8	10/24 × 5	67*	34	+2	9	14	11
VII	9	5/24 × 5	71*	36	36	38	42*	41
	10	10/24 × 5	75*	85*	42*	39*	47*	29
	11	20/24 × 5	74*	52*	24	12	27	14
Цифетрилин (перорально)	12	10/24 × 5	55**	18	+2	+14	–	1

Примечание. ТРО – торможение роста опухоли; УПЖ – увеличение продолжительности жизни. * $p < 0,05$ по отношению к контролю; ** $p < 0,05$ между группами 10 и 12, 11 и 12; ***знак «+» означает стимуляцию роста опухоли.

неэффективным. В изученных дозах ТРО наблюдалось до 5-го дня после окончания лечения (ТРО = 31–43 %) и было ниже минимального критерия активности.

Соединение IV в дозе 20 мг/кг проявило близкое к минимальному критерию, но кратковременное противоопухолевое действие в отношении Са-755 на 5-й день после окончания лечения (ТРО = 46 %). При этом продолжительность жизни леченых мышей по сравнению с контрольными животными увеличилась на 38 %, что оказалось выше минимального критерия активности (УПЖ ≥ 25 %).

Цифетрилин при 5-кратном пероральном применении в терапевтической дозе 10 мг/кг показал высокое противоопухолевое действие в отношении Са-755 непосредственно в 1-й день после окончания лечения (ТРО = 79 %). Активность препарата сохранялась до 8-го дня наблюдения и составляла 50 % ТРО.

Таким образом, при изучении соединений I, II, III и IV на аденокарциноме молочной железы Са-755 мышей при ежедневном п/к введении в течение 5 дней только соединение I в дозе 5 мг/кг показало близкий по силе действия к цифетрилину (ТРО = 79 %) кратковременный противоопухолевый эффект сразу после окончания лечения: ТРО = 73 % ($p > 0,05$ по отношению к цифетрилину).

Далее проведены исследования противоопухолевой активности соединений I, V, VI и VII на меланоме В-16 мышей (табл. 2).

Из данных табл. 2 следует, что соединения I и V в дозах 5, 10 и 20 мг/кг при ежедневном 5-кратном п/к введении мышам с меланомой В-16 противоопухолевого эффекта не проявили. Показатели ТРО и УПЖ были ниже минимальных критериев активности.

При изучении действия соединения VI на меланому В-16 в дозах 5 и 10 мг/кг при ежедневном п/к введении в течение 5 дней выяснилось, что доза 10 мг/кг оказала умеренный противоопухолевый эффект сразу после окончания лечения: ТРО = 67 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю).

Соединение VII при ежедневном 5-кратном п/к введении в дозе 5 мг/кг вызывало кратковременный противоопухолевый эффект по отношению к контролю непосредственно в 1-й день после окончания лечения (ТРО = 71 %). При этом УПЖ леченых животных по сравнению с контрольными составило 41 %.

В дозе 10 мг/кг (суммарная доза 50 мг/кг) соединение VII в сравнении с цифетрилином оказывало высокий статистически значимый противоопухолевый эффект в течение 4 дней после окончания лечения (ТРО = 75–85 %). Далее эффект снижался и к 15-му дню соответствовал близкому по минимальному критерию активности результату: ТРО = 47 % ($p < 0,05$). Ежедневное 5-кратное п/к введение соединения VII в дозе 10 мг/кг также вызывало УПЖ

леченых мышей по сравнению с контрольными на 29 %.

При повышении дозы до 20 мг/кг (суммарная доза 100 мг/кг) противоопухолевый эффект соединения VII наблюдался в течение 4 дней после окончания лечения: ТРО = 74–52 % ($p < 0,05$), тогда как цифетрилин при 5-кратном пероральном применении в терапевтической дозе 10 мг/кг проявлял близкий к минимальному критерию активности противоопухолевый эффект непосредственно в 1-й день после окончания лечения: ТРО = 55 %. В последующие дни наблюдения противоопухолевого действия цифетрилина не отмечалось.

Таким образом, при исследовании действия цитотоксических аналогов цифетрилина – соединений I, V, VI и VII в отношении меланомы В-16 показана противоопухолевая активность соединения VII – тетрапептида, модифицированного по N^ε-группе лизина цифелином (Woc-Phe-D-Trp-Lys (Ac-Sar-Val) – Thr-OMe). В дозе 5 мг/кг соединение VII вызывало УПЖ = 41 % ($p < 0,05$), однако противоопухолевый эффект наблюдался только в 1-й день после окончания лечения. В дозе 10 мг/кг при ежедневном 5-кратном п/к введении соединение VII проявило высокий противоопухолевый эффект в течение 4 дней после окончания лечения: ТРО = 75–85 % ($p < 0,05$) и УПЖ = 29 %.

Следует отметить, что во всех экспериментах в указанные сроки наблюдения гибели животных не отмечалось.

Заключение

Изучена противоопухолевая активность 7 синтезированных цитотоксических аналогов цифетрилина

в сравнении с исходным цифетрилином на перевиваемых опухолях мышей, экспрессирующих рецепторы соматостатина: аденокарциноме молочной железы Ca-755 и меланоме В-16.

В результате исследования представленных аналогов цифетрилина на Ca-755 отмечен кратковременный противоопухолевый эффект соединения Woc-Cys(Thp) – Phe-D-Trp-Lys(ClPhe) – Thr-OMe – пентапептида, модифицированного по N^ε-группе лизина хлорфенацилом (соединение I), в дозе 5 мг/кг (суммарная доза 25 мг/кг) при п/к введении непосредственно после окончания лечения: ТРО = 73 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю). При изучении действия соединения I на меланому В-16 дозы 5, 10 и 20 мг/кг при таком же режиме и способе введения оказались неэффективными: показатели ТРО и УПЖ были ниже минимальных критериев активности.

На меланоме В-16 показана противоопухолевая активность соединения Woc-Phe-D-Trp-Lys(Ac-Sar-Val) – Thr-OMe – тетрапептида, модифицированного по N^ε-группе лизина цифелином (соединение VII). Так, при ежедневном 5-кратном п/к введении соединения VII в дозе 10 мг/кг ТРО составило 75–85 % ($p < 0,05$ по отношению к цифетрилину) в течение 4 дней после окончания лечения, а УПЖ – 29 %.

Полученные данные свидетельствуют о возможности продолжения изучения модифицированных аналогов цифетрилина, содержащих цитотоксические агенты хлорфенацил и цифелин, на других опухолевых моделях и о перспективности их дальнейшего исследования как противоопухолевых соединений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Михайлич Е.И. и др. Перспективность создания лекарственной формы отечественного аналога гипоталамического гормона соматостатина для лечения гормонозависимых опухолей (обзор). *Биофармацевтический журнал* 2016;8(2):13–8.
2. Schally A.V., Comary-Schally A.M., Nagy A. et al. Hypothalamic hormones and cancer. *Front Neuroendocrinol* 2001;22(4):248–91. PMID:11587553. DOI: 10.1006/frne.2001.0217.
3. Weckbecker G., Lewis I., Albert R. et al. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2(12):999–1017. DOI: 10.1038/nrd1255.
4. Buscail L., Vernejoul F., Faure P. et al. Regulation of cell proliferation by somatostatin. *Ann Endocrinol* 2002;63:2S13–18. PMID: 12037498.
5. Guillermet-Guiber J., Lahion H., Cordelier P. et al. Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest* 2005;28(11):5–9. PMID: 16625838.
6. Susini C., Buscail L. Rationale for the use of somatostatin analogs as antitumor agents. *Ann Oncol* 2006;17(12):1733–42. PMID: 16801334. DOI: 10.1093/annonc/mdl105.
7. Райхлин Н.Т., Смирнова Е.А., Делекторская В.В. Рецепторы соматостатина и его аналоги в диагностике и лечении опухолей человека. *Вопросы онкологии* 2010;56(1):7–13.
8. Nagy A., Schally A.V. Targeting cytotoxic conjugates of somatostatin, luteinizing hormone-releasing hormone and bombesin to cancer expressing their receptors: a «smarter» chemotherapy. *Curr Pharm Des* 2005;11(9):1167–80. DOI: 10.2174/1381612053507594.
9. Горбунова В.А., Орел Н.Ф., Кузминов А.Е. Современные направления лечения нейроэндокринных опухолей. *Современная онкология* 2010;1:30–5.
10. Comaru-Schally A.M., Schally A.V. A clinical overview of carcinoid tumors: perspectives for improvement in treatment using peptide analogs (review). *Int J Oncol* 2005;26(2):301–9. PMID:15645113.
11. Schally A.V., Szepeshazi K., Nagy A. et al. New approaches to therapy of cancers of the stomach, colon and pancreas based on peptide analogs. *Cell Mol Life Sci* 2004;61(9):1042–68. PMID: 15112052. DOI: 10.1007/s00018-004-3434-3.

12. Lambert S.W., van der Lely A., de Herder W.W. et al. Octreotide. *N Engl J Med* 1996;334(4):246–54. PMID: 8532003. DOI: 10.1056/NEJM199601253340408.
13. Oberg K., Kvols L., Caplin M. et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol* 2004;15(6):966–73. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdh216>.
14. Егоров А.В., Кондрашин С.А., Фоминых Е.В. и др. Аналоги соматостатина в диагностике и лечении нейроэндокринных опухолей. *Анналы хирургической гепатологии* 2009;14(4):71.
15. Переводчикова Н.И., Горбунова В.А. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. 4-е изд., расшир. и доп. М.: Практическая медицина, 2015. 688 с.
16. Katz R., Hoffven K. The significance of somatostatin analogues in the antiproliferative treatment of carcinoma. *Recent Results Cancer Res* 2000;153:23–43. PMID:10626287.
17. Kvols L.K., Woltering E.A. Role somatostatin analogues in the clinical management of non-neuroendocrine solid tumors. *Anticancer Drugs* 2006;17(6):601–8. PMID:16917205 DOI:10.1097/01.cad.0000210335.95828.ed.
18. Балаев А.Н., Осипов В.Н., Федоров В.Е. и др. Синтез и изучение цитотоксической активности аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(4):47–53.
19. Кубасова И.Ю., Борисова Л.М., Киселева М.П. и др. Поиск потенциальных противоопухолевых соединений среди аналогов гипоталамического гормона соматостатина. *Российский биотерапевтический журнал* 2006;3(5):128–33.
20. Михаевич Е.И., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Исследование возможности создания лекарственной формы цифетрилина для перорального применения. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(1):3–6.
21. Михаевич Е.И., Яворская Н.П., Голубева И.С. и др. Исследование противоопухолевого действия аналога соматостатина – цифетрилина. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии* 2011;10:68–72.
22. Шпрах З.С., Ярцева И.В., Игнатъева Е.В. и др. Синтез и химико-фармацевтические характеристики аналога соматостатина, обладающего противоопухолевой активностью. *Химико-фармацевтический журнал* 2014;48(3):19–22.
23. Осипов В.Н., Сушинина Л.П., Устинкина С.В. и др. Цитотоксические аналоги цифетрилина (сообщение I). *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):85–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-85-88.
24. 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.
25. Руководство по проведению доклинических исследований. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. С. 640–654.
26. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ. 2000.
27. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. ЕЭС, Страсбург, 1985. *Ланималогия* 1993;1:29.
28. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. *Качественная клиническая практика* 2002;9:1–15.

ОЦЕНКА ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ВВЕДЕНИЯ ЦИСПЛАТИНА В ГИДРОГЕЛЬ С ПРОСПИДИНОМ ДЛЯ ВНУТРИБРЮШИННОЙ ТЕРАПИИ

М.Ю. Ревтович¹, Ю.П. Истомина¹, О.В. Красько², Е.М. Трещалина³, А.И. Шмак¹,
П.М. Бычковский⁴, Т.Л. Юркштович⁵, Н.В. Голуб⁵, С.О. Соломевич⁵, Ю.И. Рогов⁶

¹Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова;
Республика Беларусь, 223040 Минск, агрогородок Лесной;

²Объединенный институт проблем информатики НАН Беларуси; Республика Беларусь, 220012 Минск, ул. Сурганова, 6;

³ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие «Унитехпром БГУ»;
Республика Беларусь, 220108 Минск, ул. Курчатова, 1;

⁵Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета;
Республика Беларусь, 220030 Минск, ул. Ленинградская, 14;

⁶ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;
Республика Беларусь, 220013 Минск, ул. П. Бровки, 3, корп. 3

Контакты: Михаил Юрьевич Ревтович mihail_revtovich@yahoo.com

Введение. Ранее было показано, что гидрогель (ГГ) на основе фосфата декстрана повышает эффективность цисплатина (ЦП) и особенно проспидина (Пр), который при внутрибрюшинной (в/б) терапии асцитной гепатомы Зайделя (АГЗ) дает длительную полную ремиссию (ПР) асцита. Выдвинуто предположение, что двойная композиция (ГГ/Пр/ЦП) приведет к повышению эффективности в/б терапии опухоли, чувствительной к обоим цитостатикам.

Цель исследования — оценка возможности повышения эффективности в/б терапии АГЗ ГГ с Пр и ЦП.

Материалы и методы. Использовано 55 аутобредных белых крыс с АГЗ ($n = 7-10$), которым в/б однократно введен ГГ/Пр/ЦП с Пр в дозах 250 или 500 мг/кг и ЦП в дозах 3,0 или 5,5 мг/кг. Группы сравнения получали ГГ/Пр в адекватных дозах. Для оценки эффективности выбран наиболее значимый показатель — число ПР по накоплению асцита (контрольный срок — 42 дня) с оценкой снижения относительного риска (модель пропорциональных рисков Кокса) и кумулятивной выживаемости.

Результаты. Показано, что ГГ/Пр/ЦП и ГГ/Пр при максимальных дозах цитостатиков равноэффективны на этой модели, ПР = 100 %. Уменьшение дозировки Пр до 250 мг/кг сопровождалось снижением эффективности вплоть до ПР = 0, но добавление ЦП приводило к ПР = 43–70 % с дозозависимым увеличением кумулятивной выживаемости до $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$. Переносимость эффективного лечения была удовлетворительной.

Заключение. На крысах с АГЗ двойная композиция ГГ/Пр/ЦП с Пр в высокой терапевтической дозе 500 мг/кг равноэффективна ГГ/Пр 500 мг/кг, что не дает возможности оценить терапевтический выигрыш при добавлении ЦП. При субтерапевтической дозе Пр, составляющей 250 мг/кг, двойная композиция с ЦП обеспечивает развитие ПР у части крыс. Полученные данные подтверждают значение ГГ/Пр для в/б терапии опухолевых поражений брюшной полости человека, для которого ГГ/ЦП выступает в качестве адьюванта.

Ключевые слова: гидрогелевая форма, цисплатин, проспидин, противоопухолевая активность, асцитная гепатома

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-30-35

VALUE OF RATIONALITY CISPLATIN ADDITION INTO PROSPIDIN HYDROGEL FOR INTRAPERITONEAL CHEMOTHERAPY OF ZAJDEL HEPATOMA

M.Yu. Reutovich¹, Yu.P. Istomin¹, O.V. Krasko², H.M. Treshalina³, A.I. Shmak¹,
P.M. Bychkovsky⁴, T.L. Yurkshovich⁵, N.V. Golub⁵, S.O. Solomevich⁵, Y.I. Rogov⁶

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

²United Institute of Informatics Problems National Academy of Sciences of Belarus; 6 Sarganova Str., Minsk 220012, Belarus;

³N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center; 24 Kashyrskoe sh., Moscow 115478, Russia;

⁴Educational and Scientific Production Republican Unitary Enterprise «Unitechprom BSU»;
1 Kurchatova Str., Minsk 220108, Belarus;

⁵Research Institute for Physical Chemical Problem of the Belarusian State University;
14 Leningradskaya Str., Minsk 220030, Belarus;

⁶Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education; building 3, 3 P. Brovki Str., Minsk 220013, Belarus

Introduction. Earlier it has been shown that the hydrogel (HG) on the basis of the dextran phosphate (DP) increases effectivity of cisplatin (CDDP) and especially prospidin (Pr) which at intraperitoneal (i.p.) therapy of the rat Zajdel ascite hepatoma (ZAH) the long-lived the complete remission (CR) of an ascites. It was assumed that addition of the CDDP to HG/Pr with receiving double composition (HG/Pr/CDDP) can lead to increase its efficacy.

The purpose of research – the assessment of a possibility to increasing of efficacy i.p. therapy of an ZAH by the HG with Pr and CDDP.

Materials and methods. It was used 55 white outbreed rats with ZAH ($n = 7-10$) by which obtained i.p. single therapy with HG/Pr/CDDP in doses for Pr of 250 or 500 mg/kg and for CDDP of 3.0 of 5.5 mg/kg. Groups of comparison received HG/Pr in adequate doses. For assessment of effectivity the most significant index – number of the CR on accumulation of an ascites (control time – 42 days) with assessment of decrease in the relative risk (Cox model of proportional risks) and cumulative survival was chosen.

Results. It is shown that efficacy of HG/Pr/CDDP when Pr was used in maximal doses of 500 mg/kg was equal to HG/Pr, CR = 100 % against this model. When it was used Pr with subtherapeutic dose of 250 mg/kg CR = 0, but addition of the HG/CDDP led to CR = 50–70 % with depended on dose, and simultaneously with increase in cumulative survival up to $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$. The good tolerance of all therapeutic systems was evaluated.

Conclusion. In rats with ZAH, a double composition of HG/Pr/CDDP in a high therapeutic dose for Pr of 500 mg/kg is equally effective with HG/Pr in dose of 500 mg/kg, which makes it impossible to evaluate the therapeutic gain of adding CDDP. At a subtherapeutic dose for Pr of 250 mg/kg, a double composition with CDDP provides CR in a part of the rats. The obtained data confirm the importance of HG/Pr for intraperitoneal therapy of tumoral lesions of the human abdominal cavity, for which HG/CDDP acts as an adjuvant.

Key words: prolonged hydrogel form, prospidin, cisplatin, antitumor activity, ascites hepatoma

Введение

Одной из составляющих комплекса лечебных мероприятий при лечении и профилактике канцероматоза после радикального хирургического лечения является интраперитонеальная (внутрибрюшинная, в/б) химиотерапия, эффективность которой зависит от длительности экспозиции цитостатика в брюшной полости, что реализуется путем использования различных гидрогелей (ГГ) [1–5].

Среди полимеров медицинского назначения особое место занимают препятствующие агрегации опухолевых клеток малотоксичные природные биосовместимые полисахариды с приемлемой скоростью биодеградации. Прежде всего это эфиры декстрана и крахмала, рекомендованные для использования в качестве полимеров-носителей для иммобилизации и контролируемого выделения лекарственных веществ [6]. Декстран – водорастворимый полисахарид, содержащий остатки D-глюкозы преимущественно с α -1,6-D-гликозидной связью и меньше – с α -1,2- и α -1,3-гликозидными связями, что свойственно фосфату декстрана (ФД). Их использование позволяет создать соответствующую макромолекулярную терапевтическую систему, обеспечивающую пролонгированное высвобождение и длительное сохранение высоких концентраций лекарственного средства в брюшной полости.

Для получения пролонгированной формы нами апробирован ГГ с ФД, в котором путем этерификации часть гидроксильных групп полисахарида замещена фосфорнокислыми группами [2]. При в/б терапии асцитной гепатомы Зайделя (АГЗ) искомым эффектом показали ГГ на основе ФД с проспидином (ГГ/Пр) и цисплатином (ГГ/ЦП) [2, 3]. Более эффективным на этой модели был ГГ/Пр,

ингибирующий рост других асцитных опухолей [7]. Выдвинуто предположение, что двойная композиция (ГГ/Пр/ЦП) приведет к повышению эффективности в/б терапии опухоли, чувствительной к обоим цитостатикам.

Цель настоящего исследования – оценка возможности повышения эффективности в/б терапии АГЗ гидрогелевой композицией Пр с ЦП.

Материал и методы

Исследование специфической активности препаратов проведено на 55 белых аутбредных крысах с перевитой в/б АГЗ (культура получена из Института цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия). Животных содержали в виварии Республиканского научно-практического центра онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова на стандартной диете и обычном питьевом режиме. АГЗ трансплантировали в/б по 0,5 мл 5-дневного асцита. После трансплантации крыс делили на группы по 7–10 особей в каждой.

Через 24 ч после перевивки опухоли крысам вводили однократно в/б ГГ/Пр с Пр в дозах 250 или 500 мг/кг и двойную композицию ГГ/Пр/ЦП с Пр в дозах 250 или 500 мг/кг и ЦП в дозах 3,0 или 5,5 мг/кг.

Содержание ФД во всех образцах составляло 500 мг/кг. Для приготовления ГГ к навескам лиофильно высушенного порошка Пр и/или ЦП/ФД (получены из Научно-исследовательского института физико-химических проблем Белорусского государственного университета, г. Минск, Республика Беларусь) добавляли *ex tempore* стерильную дистиллированную воду. Исследуемые препараты вводили в объеме 1,25 мл на 100 г массы тела крысы (табл. 1).

Таблица 1. Схема эксперимента и дозы препаратов

№ группы	Группа	Доза препарата, мг/кг	
		ЦП	Пр
1	КРО	–	–
2	ГГ*/Пр	–	250
3	ГГ/Пр	–	500
4	ГГ/Пр/ЦП	3,0	500
5	ГГ/Пр/ЦП	5,5	500
6	ГГ/Пр/ЦП	3,0	250
7	ГГ/Пр/ЦП	5,5	250

Примечание. ГГ – гидрогель; Пр – проспидин; ЦП – цисплатин; КРО – контроль роста опухоли. *Доза фосфата декстрана = 500 мг/кг во всех прописях.

Ранее в эксперименте *in vitro* было продемонстрировано, что взаимодействие ФД с ЦП происходит в основном по механизму физической абсорбции, с Пр – по ионообменному и распределительному механизмам, а также по механизму физической абсорбции [8] (рис. 1).

На основании данных инфракрасной спектроскопии, неводного и потенциометрического титрований [4] сделан вывод о том, что при терапевтической дозе Пр в фазе катионита между ним и ФД реализуются различные типы взаимодействий (ионный обмен, молекулярное поглощение), при этом значительный

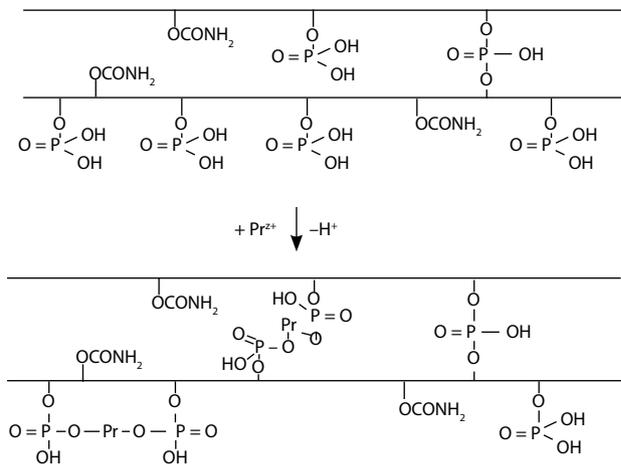


Рис. 1. Схема ионного обмена между проспидином и фосфатом декстрана

вклад (более 70 %) в суммарную сорбцию Пр ФД вносит молекулярное поглощение цитостатика.

Благодаря этому процесс высвобождения цитостатика из комплекса с ФД носит фазовый пролонгированный характер, что при проведении в/б химиотерапии может предоставить дополнительные преимущества в сравнении с водными растворами цитостатиков.

Для оценки противоопухолевого эффекта использован наиболее информативный критерий – полная ремиссия (ПР) [9], оцененная по числу крыс с асцитом через 42 дня после трансплантации

Таблица 2. Сравнительная эффективность двойной гидрогелевой композиции проспидина и цисплатина на модели асцитной гепатомы Зайделя

Группа, доза препарата (мг/кг)	Показатели эффективности			Критерии оценки статистической значимости различий (p)	
	Сроки гибели крыс, дни	ПР		Фишера	Логранговый с поправкой Бонферрони
		Число крыс	%*		
КРО	9, 9, 8, 8, 8, 15, 15, 16, 17, 19 (n = 10)	0/10	0	–	–
ГГ/Пр ₅₀₀	–	10/10	100	<0,001	<0,001
ГГ/Пр ₅₀₀ /ЦП _{3,0}	28, 32 (n = 2)	5/7	71	0,003	<0,001
ГГ/Пр ₅₀₀ /ЦП _{5,5}	–	7/7	100	0,001	<0,001
ГГ/Пр ₂₅₀	13, 13, 15, 17, 21, 23, 24 (n = 7)	0/7	0	–	0,087
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{3,0}	20, 21, 27, 42 (n = 4)	3/7	43	0,052	<0,001
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{5,5}	15, 17, 39 (n = 3)	4/7	57	0,015	0,005

Примечание. ГГ – гидрогель; Пр – проспидин; ЦП – цисплатин; КРО – контроль роста опухоли; ПР – полная ремиссия, крысы без асцита на 42-е сутки опыта. *В группах с n = 7 расчет процента условный для упрощения обсуждения.

опухоли под контролем аутопсии и патоморфологической картины брюшной полости.

Для оценки статистической значимости различий в значениях ПР между опытными группами и группой контроля использовали критерий Фишера. Для оценки выживаемости использовался метод Каплана–Мейера, значимость различий оценивали с помощью логрангового критерия (log-rank test) с поправкой Бонферрони на множественные сравнения [10, 11]. О степени снижения рисков судили с помощью модели пропорциональных рисков Кокса, о значимости влияния фактора риска (исследуемых препаратов) на выживаемость – по критерию Вальда [12]. На основе коэффициентов регрессии рассчитывали снижение относительного риска (ОР), для чего вычисляли обратные экспоненцированные значения коэффициентов регрессии и доверительные интервалы на основе соответствующих доверительных интервалов коэффициентов регрессии аналогичным образом. Анализ данных выполнен с использованием статистического пакета R версии 3.1.1 (лицензия GNU GPL) [13]. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Исследования проведены в соответствии с техническим кодексом «Надлежащая лабораторная практика» Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008 г. и международными этическими и научными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 2000 г.).

Результаты и обсуждение

Показано, что эффективность ГГ/Пр зависит от величины примененной дозы Пр: при дозе 500 мг/кг ПР = 100 % против ПР = 0 % при дозе 250 мг/кг (табл. 2).

Кумулятивная выживаемость крыс после применения ГГ/Пр в сравнении с группой контроля роста опухоли (КРО) также дозозависимо возрастала, $p_{\log\text{-rank}} = 0,00001$ (рис. 2)

Двойная композиция ГГ/Пр₅₀₀/ЦП_{5,5} не давала преимуществ перед ГГ/Пр₅₀₀, поскольку в обоих случаях ПР составила 100 %, а при ГГ/Пр₅₀₀/ЦП₃ эффект был даже ниже: ПР = 71 % (у 5 из 7 крыс). Однако в случае применения композиции ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0–5,5} с субтерапевтической дозой Пр эффект был достигнут, ПР составила 41–57 % (у 3–4 из 7 крыс) (табл. 2). Анализ кумулятивной выживаемости показал, что увеличение числа ремиссий под действием ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0–5,5} сопровождалось статистически значимым ее увеличением, $p_{\log\text{-rank}} = 0,00001$ (рис. 3), в том числе и в сравнении с исходным ГГ/Пр₂₅₀, $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$ (рис. 4).

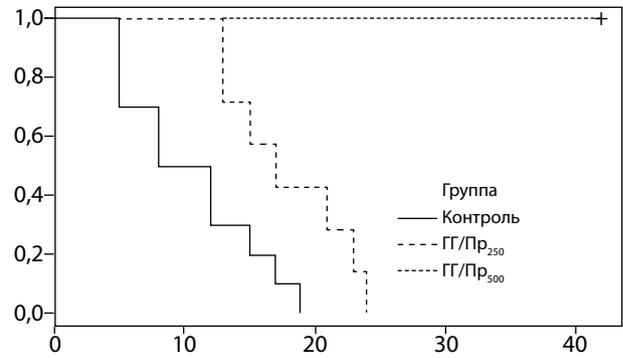


Рис. 2. Сравнительная выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогеля с проспидином в диапазоне доз: ГГ – гидрогель, Пр – проспидин в дозах 500 мг/кг и 250 мг/кг

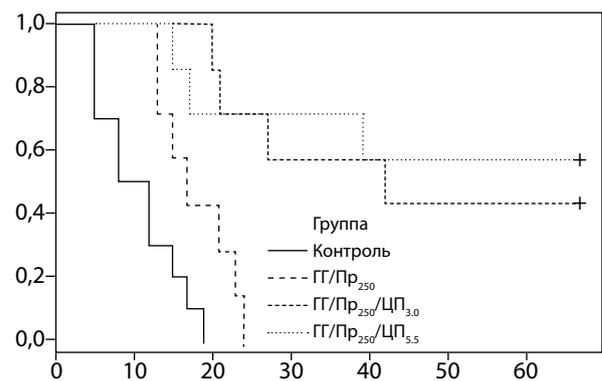


Рис. 3. Кумулятивная выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогелевой композиции проспидина и цисплатина в диапазоне доз: ГГ – гидрогель, Пр – проспидин в дозе 250 мг/кг, ЦП – цисплатин в дозах 3,0 и 5,5 мг/кг

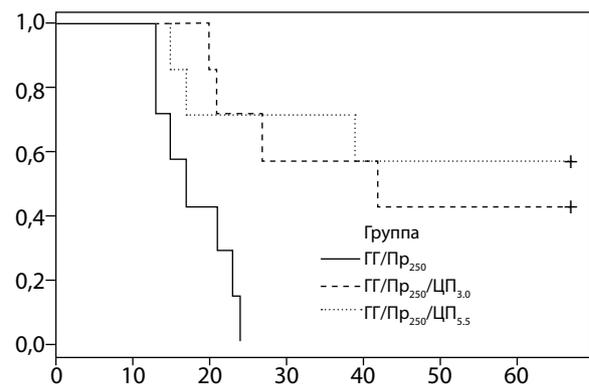


Рис. 4. Выживаемость крыс с асцитной гепатомой Зайделя под действием гидрогеля (ГГ) с проспидином (Пр) в дозе 250 мг/кг и гидрогелевой композиции проспидина в дозе 250 мг/кг с цисплатином в диапазоне доз 3,0–5,5 мг/кг

Регрессионный анализ на основе модели пропорциональных рисков Кокса подтвердил статистически значимое снижение риска летального исхода от прогрессирования опухолевого процесса при добавлении ЦП в двойную композицию ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0–5,5} (табл. 3).

Таблица 3. Относительный риск наступления летального исхода от прогрессирования асцитной гепатомы Зайделя при внутрибрюшинном применении гидрогелевой композиции проспидина в дозе 250 мг/кг с цисплатином в диапазоне доз 3,0–5,5 мг/кг

Препарат, доза (мг/кг)	Регрессионный анализ			Вероятность ошибки p
	Коэффициент регрессии β	Стандартная ошибка	Снижение ОР, (95 % ДИ)	
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{3,0}	-1,75	0,17	5,73 (1,42 ÷ 23,15)	0,014
ГГ/Пр ₂₅₀ /ЦП _{5,5}	-2,01	0,13	7,47 (1,61 ÷ 34,64)	0,010

Примечание. ГГ – гидрогель; Пр – проспидин; ЦП – цисплатин. ДИ – доверительный интервал; ОР – относительный риск.

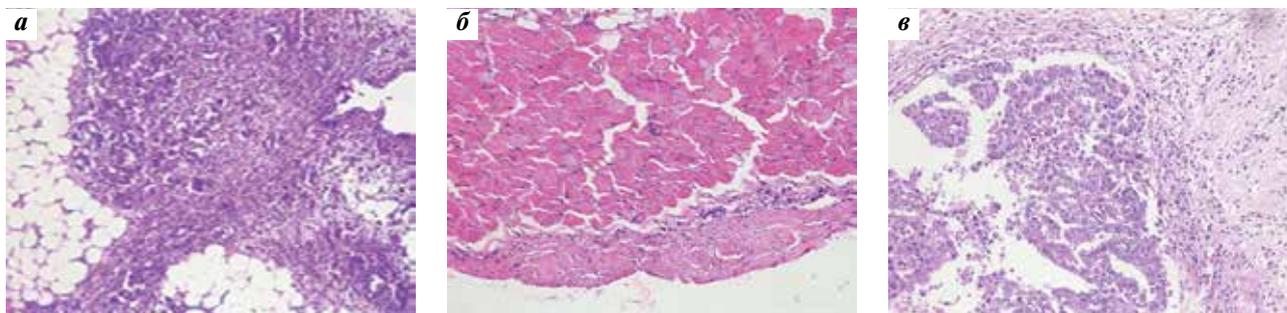


Рис. 5. Морфологические изменения в брюшной полости крыс с асцитной гепатомой Зайделя: большого сальника (группа контроля роста опухоли, без лечения) (а), брюшной стенки (гидрогелевая композиция проспидина в дозе 500 мг/кг с цисплатином в дозе 5,5 мг/кг, 42-е сутки) (б), брыжейки тонкой кишки (гидрогель с проспидином в дозе 250 мг/кг, 17-е сутки) (в). Окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$

В/б применение комбинации ГГ/Пр₅₀₀/ЦП не сопровождалось изменением ОР летального исхода от АГЗ из-за высокой эффективности исходного ГГ/Пр₅₀₀, который не давал гибели животных (см. табл. 2).

Сравнительный анализ данных аутопсии и патоморфологического исследования органов брюшной полости показал следующее. В группе КРО без лечения у крыс выявлено $67,0 \pm 12,6$ мл асцита на фоне макроскопических признаков массивного спаечного процесса, гистологически – разрастания злокачественной опухоли аденокарциноматозного строения (рис. 5а). В группах, получивших лечебные композиции, сопровождавшиеся ПР = 100 %, подтверждено подавление асцита с развитием мелкоочаговой лимфоидной инфильтрации в субмезотелиальной волокнистой соединительной ткани брюшины, без признаков злокачественного роста (рис. 5б). В группе с неэффективным ГГ/Пр₂₅₀ отмечали спаечный конгломерат с асцитом среднего объема $36,4 \pm 7,1$ мл ($p = 0,056$ в сравнении с КРО). Применение ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{3,0} и ГГ/Пр₂₅₀/ЦП_{5,5} приводило к статистически значимому сокращению объема асцита в сравнении с КРО до $17,1 \pm 5,7$ мл ($p = 0,004$) и $15,7 \pm 5,3$ мл ($p = 0,003$) соответственно,

с уменьшением спаечного процесса на фоне идентичных ГГ/Пр₂₅₀ аденокарциноматозных разрастаний в брюшной полости (рис. 5в).

Заключение

Исследование показало, что ГГ/Пр/ЦП и ГГ/Пр при максимальных дозах цитостатиков равноэффективны на использованной модели, ПР = 100 %. Уменьшение дозировки Пр до 250 мг/кг сопровождалось снижением эффективности вплоть до ПР = 0 %, но добавление ЦП приводило к ПР = 43–71 % с дозозависимым увеличением кумулятивной выживаемости до $p_{\log\text{-rank}} = 0,004$. Переносимость эффективного лечения была удовлетворительной. Таким образом, на крысах с АГЗ двойная композиция ГГ/Пр/ЦП с Пр в высокой терапевтической дозе равноэффективна ГГ/Пр, что не дает возможности оценить терапевтический выигрыш при добавлении ЦП. При субтерапевтической дозе Пр двойная композиция с ЦП обеспечивает развитие ПР у части крыс. Полученные данные подтверждают значение ГГ/Пр для в/б терапии опухолевых поражений брюшной полости человека, для которого ГГ/ЦП выступает в качестве адьюванта.

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

1. Wang Y., Gong Ch., Yang L. et al. 5-FU-hydrogel inhibits colorectal peritoneal carcinomatosis and tumor growth in mice. *BMC Cancer* 2010;10(8):402. DOI: 10.1186/1471-2407-10-402. PMID: 20678220.
2. Ревтович М.Ю., Истомин Ю.П., Красько О.В. и др. Противоопухолевая активность гидрогелевой формы цисплатина на асцитной гепатоме Зайделя. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):96–101. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-97-102.
3. Soma D., Kitayama J., Konno T. et al. Intraperitoneal administration of Paclitaxel solubilized with poly-2-methacryloxyethyl-phosphorylcholine-co-n-butylmethacrylate for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci* 2009;100(10):1979–85. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01265.x. PMID: 19604244.
4. Konishi M., Tabata Y., Kariya M. et al. In vivo anti-tumor effect through the controlled release of cisplatin from biodegradable gelatin hydrogel. *J Control Release* 2003;92(3):301–13. PMID: 14568411.
5. Huoudou K., Nishikawa M., Ikemura M. et al. Cationized catalase-loaded hydrogel for growth inhibition of peritoneally disseminated tumor cells. *J Control Release* 2007;122(2):151–8. PMID: 17651858.
6. Van Tomme S.R., Hennink W.E. Biodegradable dextran hydrogels for protein delivery applications. *Expert Rev Med Devices* 2007;4(2):147–64. DOI: 10.1586/17434440.4.2.147. PMID: 17359222.
7. Ревтович М.Ю., Бычковский П.М., Красько О.В. и др. Интраперитонеальная химиотерапия полимер-иммобилизованной формой проспирина асцитной гепатомы Зайделя. *Вестник БГУ (серия 2)* 2015;2:29–37.
8. Бычковский П.М., Юркович Т.Л., Голуб Н.В. и др. Получение и противоопухолевая активность гелеобразующего препарата проспирина. *Химико-фармацевтический журнал* 2013;47(4):107–12.
9. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
10. Bate S.T., Clark R.A. *The design and statistical analysis of animal experiments*. Cambridge: University Press, 2014. Pp. 234–237.
11. Festing M.F.W., Altman D.G. *Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals*. *ILAR J* 2002;43(4):244–58. DOI: 10.1093/ilar.43.4.244. PMID: 12391400.
12. Therneau T., Grambsch P. *Modeling survival data: extending the Cox model*. New York: Springer-Verlag, 2000. 350 p.
13. R Core Team (2014). *R: a language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <http://www.R-project.org/> (last access date 01.11.2014).

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ДОЗОВЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХИМЕРНОГО ПЕПТИДА MM-D37K ПРИ ПАРЕНТЕРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ BALB/C NUDE С КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ ЧЕЛОВЕКА HCT-116

Е.М. Уханова¹, Т.М. Кулинич², Е.А. Кудинова², В.К. Боженко²,
С.М. Ситдикова¹, М.С. Калишьян¹, Е.М. Трещалина¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБУ «Российский научный центр рентгенодиагностики» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Профсоюзная, 86

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. В рамках конструирования молекул с патогенетической направленностью к опухолевой клетке создан ряд химерных пептидов, включающих функциональный фрагмент с аминокислотной последовательностью из группы SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 17 и транспортную последовательность. Эти пептиды при целевой доставке в клетку способны обнаруживать короткие функциональные домены в белках-регуляторах различных функций. Среди них MM-D37K, блокирующий фазу G1 и индуцирующий апоптоз в клетках опухолей человека, в том числе колоректального рака HCT-116. Этот пептид рассматривается как потенциальный противоопухолевый агент с соответствующими этапами изучения.

Цель исследования – изучение дозовых характеристик MM-D37K при парентеральном введении на подкожных (п/к) ксенографтах колоректального рака человека *in vivo*.

Задачи. 1. Изучение эффективности MM-D37K в диапазоне доз при многократном п/к или внутривенном (в/в) введении мышам Balb/c nude с п/к ксенографтами колоректального рака человека HCT-116. 2. Оценка переносимости MM-D37K при многократном парентеральном введении мышам с HCT-116.

Материалы и методы. Исследования химерного пептида MM-D37K (ингибитор циклинзависимых киназ 4/6) проведены на п/к ксенографтах колоректального рака человека HCT-116 у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при использовании стандартных критериев оценки эффективности и переносимости и адекватной статистической обработке результатов с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни.

Результаты. Показано, что MM-D37K в разовых дозах 5 или 10 мг/кг при п/к или в/в 5-кратном введении через 48 ч (суммарные дозы 25 или 50 мг/кг соответственно) значимо и достоверно ингибирует рост опухоли в течение 9 дней после окончания лечения на уровне T/C = 27–43 % ($p < 0,05$) (стандартный критерий T/C ≤ 42 %) при удовлетворительной переносимости. При обоих путях введения выявлена слабая дозовая зависимость как по T/C, так и по сроку достижения максимального эффекта при индивидуальной чувствительности к пептиду (вариабельность размеров опухолевых узлов при в/в введении большей дозы).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о достаточной широте терапевтического действия химерного пептида MM-D37K на модели колоректального рака человека HCT-116, позволяющей получить значимый достоверный противоопухолевый эффект при парентеральном многократном применении в 2-кратном диапазоне действующих доз.

Ключевые слова: химерный пептид MM-D37K, колоректальный рак человека, мыши Balb/c nude, эффективность, переносимость

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-36-41

THERAPEUTIC DOSE CHARACTERISTICS OF THE CHIMERIC PEPTIDE OF MM-D37K AT PARENTERAL INTRODUCTION TO THE BALB/C NUDE MICE WITH HUMAN COLORECTAL CARCINOMA HCT-116

E.M. Uchanova¹, T.M. Kulich², E.A. Kudinova², V.K. Bozenko², S.M. Sitdikova¹, M.S. Kalishjan¹, H.M. Treshalina¹

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

²Russian Scientific Center of Roengenology and Radiology; 86 Profsoyuznaya Str., Moscow 117997, Russia

Introduction. Within constructed of molecules with a pathogenetic orientation to a tumor cell a row the chimeric of the peptides including the functional fragment with the amino-acid sequence from the SEQ ID NO group is created: 1 – SEQ ID NO: 17 and transport sequence. These peptides are capable at target delivery in the cells to find short functional domains in proteins regulators of various functions. Among them there is MM-D37K blocking G1 phase and inducing an apoptosis in the human tumor cells, including a colorectal cancer HCT-116. It is considered as the potential antineoplastic agent with the corresponding stages of studying.

Aim. The aim of the study was an investigation of the MM-D37K dose characteristics at the parenteral administration on the human subcutaneous (s. c.) colorectal cancer xenografts HCT-116.

Research problems. 1. Studying of the efficacy of MM-D37K in the dose range at multiple parenteral administration to the Balb/c nude mice with HCT-116. 2. Tolerance control of MM-D37K at multiple parenteral administration to the Balb/c nude mice with HCT-116.

Materials and methods. Researches of a chimeric peptide MM-D37K (an inhibitor the cyclin-dependent protein kinases 4/6) are conducted on hypodermic s. c. colorectal cancer xenografts HCT-116 at immunodeficient Balb/c nude mice when using reference criteria assessment of efficacy and tolerance under adequate statistical processing of the results with use of nonparametric Mann–Whitney U-test.

Results. It is shown that MM-D37K in single doses of 5 or 10 mg/kg at s. c. or intravenous (i. v.) 5-fold administration in 48 h (total doses 25 or 50 mg/kg) significantly and authentically inhibits the tumor growth within 9 days after the treatment on the level of T/C = 27–43 % ($p < 0.05$) (reference criterion of T/C ≤ 42 %) at a well tolerance. At both routes of administration was observed the dose dependence for efficacy as on T/C and on the maximal effect achievement. There was revealed big deviation of the tumor after the individual sensitivity to a peptide (variability of the tumor size at a larger dose by the i. v. administration).

Conclusion. The obtained data confirm the sufficient therapeutic range of a MM-D37K chimeric peptide in vivo on the model of a human colorectal cancer HCT-116 allowing to obtain significant reliable anticancer effect at parenteral multiple administrations in the double range of therapeutically doses.

Key words: chimeric peptide MM-D37K, human colorectal cancer, mice Balb/c nude, efficacy, tolerance

Введение

В конце XX – начале XXI вв. появились первые экспериментальные исследования ингибиторов циклинзависимых киназ (cyclin-dependent protein kinases – CDK), среди которых наибольший интерес в качестве перспективной мишени для онкологии вызвали специфичные ингибиторы CDK4/6, приводящие к восстановлению контроля клеточного цикла и блокаде пролиферации опухолевых клеток. Утрата контроля клеточного цикла, характерная для злокачественных новообразований, сопряжена с гиперактивацией CDK4/6, что влечет за собой потерю контроля над пролиферацией с инициацией клеточной прогрессии от фазы роста (G1) до фаз, связанных с репликацией ДНК (S) [1–4]. Практическая значимость этих исследований связана с большой частотой (40–60 %) мутаций или гиперметилирования промоторов генов-ингибиторов CDK при злокачественном росте. Дополнительным основанием для поиска технологий применения естественных белковых ингибиторов пролиферации стало открытие коротких последовательностей аминокислот ($n = 15–30$), способных выполнять векторные (транспортные) функции в отношении пептидных последовательностей и соединений другой химической природы (РНК, ДНК). Одним из путей создания ингибиторов CDK стало использование функциональных последовательностей из соответствующих внутриклеточных ингибиторов. Появилась технология пептидных векторов, обладающих способностью проникать в клетки, не повреждая плазматическую мембрану, весьма перспективная ввиду слабой иммуногенности и возможности переноса достаточно крупных молекул. Таким образом, соединение возможности целевой доставки пептидов в клетку и обнаружение коротких функциональных

доменов в белках-регуляторах различных клеточных функций создали предпосылки для конструирования молекул, имеющих патогенетическую направленность. Так были созданы химерные пептиды, включающие функциональный фрагмент с аминокислотной последовательностью из группы SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 17 и транспортную последовательность [5–10].

Первый препарат палбоциклиб (Ибранса), созданный на основе CDK4/6-специфического ингибитора, показал заметный противоопухолевый эффект в опытах на культурах клеток и исследованиях на животных, особенно по отношению к карциномам люминального типа (ER⁺/HER2⁻). В настоящее время на разных стадиях разработки и клинических испытаний находятся несколько экспериментальных ингибиторов CDK, например, абемациклиб и рибоциклиб. Поскольку спектр их потенциального применения широк, CDK представляются перспективной мишенью для онкологии [11].

В русле этого направления были созданы технологически адекватный оригинальный химерный пептид D37K со свойствами ингибиторов CDK4/6 и его модифицированный аналог MM-D37K, с 2014 г. проходящий клинические испытания у онкологических пациентов в РФ [12]. По данным *in vitro*, благодаря блокированию клеточного цикла в фазе G1 MM-D37K индуцирует апоптоз в клетках различных опухолей человека, в том числе колоректального рака HCT-116. Также показано, что химерные пептиды с аминокислотными последовательностями SEQ ID NO: 1 – SEQ ID NO: 17 усиливают цитотоксичность цитостатиков, в том числе паклитаксела (Таксола) [13–15].

Эти сведения послужили основанием для углубленного доклинического изучения MM-D37K *in vivo* на модели колоректального рака человека

НТС-116 с оценкой *in vitro* синергизма в комбинации с паклитакселом (Таксолом). Соответственно **цель** настоящего **исследования** состояла в изучении дозовых характеристик ММ-D37К при парентеральном введении на подкожных (п/к) ксенографтах колоректального рака человека *in vivo*.

Задачи: изучить эффективность ММ-D37К в диапазоне доз при многократном п/к или внутривенном (в/в) введении мышам Balb/c nude с п/к ксенографтами колоректального рака человека НТС-116, оценить переносимость ММ-D37К.

Материалы и методы

Животные

Исследование проводилось на 41 мыши Balb/c nude (самки в возрасте 8 нед с массой тела 20–22 г разведения ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России). Мышей содержали в специализированном однокоридорном кондиционированном отсеке на брикетированном стерильном корме (ООО «МЭСТ», Москва), стерильной воде и стерильной бумажной подстилке (марка Е2) при нормированном температурно-влажностном режиме с соблюдением требований, предъявляемых к конвенциональным животным [16].

Опухолевый материал

Штамм колоректального рака человека НТС-116 получен из коллекции опухолевых штаммов человека ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [17]. Для получения стандартного прививочного материала штамм пассирован п/к 2 раза по 50 мг опухолевой взвеси в 0,5 мл питательной среды № 199. Для проведения эксперимента взят 3-й пассаж, который использован в качестве опухолевого материала для билатеральной трансплантации.

Агент

Субстанция химерного пептида ММ-D37К – белый кристаллический порошок во флаконе [14, 15].

Для введения мышам субстанцию растворяли в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида до нужных концентраций и использовали *ex tempore*.

Условия проведения экспериментов

В опыте 5 групп мышей: 1 группа использована для контроля роста опухоли (КРО) без лечения ($n = 5$, опухолей 10), 4 группы ($n = 9$, опухолей 18) получали лечение ММ-D37К. Агент вводили п/к или в/в в разовых дозах 5 или 10 мг/кг (суммарные дозы 25 или 50 мг/кг соответственно) 5-кратным курсом на 2, 4, 6, 8 и 10-е сутки после трансплантации опухоли.

Оценка противоопухолевого эффекта

Использовали стандартный показатель торможения роста опухоли – Т/С, % (treatment/control), критерий Т/С ≤ 42 %. Для расчета показателя 2 раза измеряли 3 взаимно перпендикулярных диаметра каждого опухолевого узла для расчета индивидуальных и средних объемов (V_{cp}) в течение 9 дней после окончания лечения [18].

Статистическая обработка данных

Для измерений использовали штангенциркуль (Mitutoyo, Япония), соединенный при помощи USB-порта со статистической программой Microsoft Office Excel (Windows 7) для расчета непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. В иллюстрациях приведены критические значения для уровня значимости, равного 0,05.

Оценка переносимости

О переносимости ММ-D37К судили по качеству жизни мышей с опухолью. В период наблюдения оценивали состояние и поведение мышей, следили за возможной гибелью от токсичности, павших и умерщвленных мышей подвергали аутопсии с оценкой наличия патологических изменений внутренних органов.

Завершение эксперимента

На 24-е сутки после перевивки опухоли и выполнения 6 измерений опухолей мыши были умерщвлены.

Таблица 1. Динамика роста подкожных ксенографтов колоректального рака человека НТС-116 под действием ММ-D37К

Группа	Путь введения	Число опухолей, n^*	Доза, мг/кг		Средний объем опухоли (мм ³) на сутки после трансплантации		
			разовая	суммарная**	11	15	19
Контроль роста опухоли*	внутривенно	10	–		142 ± 100	398 ± 222	810 ± 735
ММ-D37К	подкожно	18	5	25	71 ± 63	190 ± 176	303 ± 254
			10	50	77***	133 ± 80	248 ± 229
	внутривенно	18	5	25	74 ± 71	173 ± 171	595***
			10	50	67***	130 ± 113	222***

Примечание. *Билатеральная трансплантация; **введение на 2–10-е сутки после перевивки; ***разброс больше средней.

Таблица 2. Ингибирование роста подкожных ксенографтов колоректального рака человека HCT-116 под действием MM-D37K

Препарат	Путь введения	Доза, мг/кг		Т/С, % на сутки после окончания лечения		
		разовая	суммарная	1	5	9
MM-D37K	подкожно	5	25	50	48	32*
		10	50	52	34*	31*
	внутривенно	5	25	52	44	41
		10	50	47	33	27

Примечание. * $p < 0,05$.

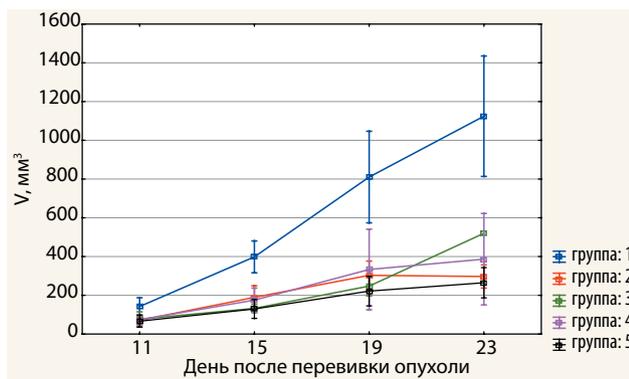


Рис. 1. Динамика среднего объема подкожных узлов колоректального рака человека HCT-116 после 5-кратного курса введения MM-D37K: группа 1 — группа контроля роста опухоли; группа 2 — MM-D37K 25 мг/кг подкожно; группа 3 — MM-D37K 50 мг/кг подкожно; группа 4 — MM-D37K 25 мг/кг внутривенно; группа 5 — MM-D37K 50 мг/кг внутривенно

ны с применением гуманных методов, разрешенных в РФ [19, 20].

Результаты исследования

Показано, что колоректальный рак человека HCT-116 без лечения (группа КРО) отличается умеренной скоростью роста. В период с 11-го по 23-й день роста опухолевые узлы увеличились в 6,7 раза

от $V_{cp} = 142 \pm 100 \text{ мм}^3$ до $V_{cp} = 890 \pm 860 \text{ мм}^3$. Терапия MM-D37K в суммарной дозе 50 мг/кг показала относительно лучший противоопухолевый эффект, $T/C_{min} = 27-31 \%$, наступавший при в/в введении на 4 дня раньше (5 суток против 9 суток). Большой разброс размеров опухоли при большой дозировке, особенно при в/в введении, может быть следствием индивидуальной чувствительности к пептиду (табл. 1, 2; рис. 1).

Независимо от этого статистическая обработка полученных данных показала значимую достоверность выявленных отличий от группы КРО (табл. 3, 4).

Анализ переносимости многократной парентеральной терапии MM-D37K показал отсутствие каких-либо изменений в состоянии и поведении подопытных мышей в процессе и после введения MM-D37K, а также патологических изменений при аутопсии умерщвленных животных независимо от пути введения и величины примененной дозы в изученном диапазоне.

Заключение

Проведенные исследования показали, что химерный пептид MM-D37K, ингибитор CDK4/6, в разовых дозах 5 или 10 мг/кг при п/к или в/в 5-кратном через 48 ч введении (суммарные дозы

Таблица 3. Сравнение независимых переменных показателей динамики роста подкожных ксенографтов колоректального рака человека HCT-116 под действием MM-D37K

А. Критерий Уилкоксона (обработка 2_17_11_10.sta)					Б. Критерий знаков (обработка 2_17_11_10.sta)				
Сравниваемые группы мышей	Число опухолей, n	T	Z	p^*	Сравниваемые группы мышей	Число опухолей, n	Процент	Z	p^*
Группа 1 и группа 2	17	4,0	3,309361	0,000935	Группа 1 и группа 2	16	12,5	2,75	0,00596
Группа 1 и группа 3	13	7,0	2,510287	0,012064	Группа 1 и группа 3	12	8,33333	2,598076	0,009375
Группа 1 и группа 4	17	5,0	3,257652	0,001123	Группа 1 и группа 4	16	6,25	3,25	0,001154
Группа 1 и группа 5	16	8,0	2,953402	0,003143	Группа 1 и группа 5	15	20,0	2,065591	0,038867

Примечание. *Выделенные критерии значимы на уровне $p < 0,05$.

Таблица 4. Сравнение морфометрических показателей эффективности в группах ММ–D37К и контроля роста опухоли с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни

ММ-D37К 25 мг/кг подкожно							ММ-D37К 50 мг/кг подкожно, 19-й день роста опухоли								
Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n	Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n		
Группа 1	22,0	6,0	0,00	2,12132	0,033896	4	3	Группа 1	26,0	10,0	0,00	2,309401	0,020922	4	4
ММ-D37К 25 мг/кг внутривенно							ММ-D37К 50 мг/кг внутривенно								
Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n	Группа	Суммарный ранг		U	Z	p =*	n		
Группа 1	28,0	17,0	2,0	1,959592	0,050044	4	5	Группа 1	26,0	10,0	0,00	2,309401	0,020922	4	4

Примечание. *Выделенные критерии значимы на уровне $p < 0,05$.

25 или 50 мг/кг соответственно) значимо и достоверно ингибирует рост п/к ксенографтов колоректального рака человека НСТ-116 при удовлетворительной переносимости.

Ингибирующее действие регистрируется на уровне Т/С = 27–41 % ($p < 0,05$) (стандартный критерий Т/С ≤ 42 %). Выявлена слабая дозовая зависимость как по Т/С, так и по срокам достижения максимального эффекта после окончания курса (от 5 до 9 сут),

особенно при в/в введении при индивидуальной чувствительности к пептиду (вариабельность размеров опухолевых узлов в отдаленные сроки).

Полученные данные *in vivo* свидетельствуют о достаточной широте терапевтического действия химерного пептида ММ-D37К на модели колоректального рака человека НСТ-116, позволяющей получить значимый достоверный противоопухолевый эффект при 2-кратном диапазоне действующих доз.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Hirama T., Koeffler H.P. Role of the cyclin-dependent kinase inhibitors in the development of cancer. *Blood* 1995;86(3):841–54. PMID: 7620180.
- Aleem E., Kiyokawa H., Kaldis P. CDC2-cyclin E complexes regulate the G1/S phase transition. *Nat Cell Biol* 2005;7(8):831–36. PMID: 16007079. DOI: 10.1038/ncb1284.
- Shapiro G.I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol* 2006;24(11):1770–83. PMID: 16603719. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.7689.
- Самусенко А.В. Нарушения клеточного цикла и старение клеток в ответ на повреждение ДНК. *Вопросы онкологии* 2009;55(5):521–7. PMID: 20020645.
- Derossi D., Joliot A., Chassaing G., Prochiantz A. The 3rd helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 1994;269(14):10444–50. PMID: 8144628.
- Morris M.C., Depollier J., Mery J. et al. A peptides carrier for the delivery of biologically active proteins in mammalian cells. *Nat Biotechnology* 2001;19(12):1173–6. PMID: 11731788. DOI: 10.1038/nbt1201-1173.
- Харченко В.П., Кулинич Т.М., Лунин В.Г. и др. Цитотоксические свойства химерных пептидов, содержащих активные центры ингибиторов циклиновых киназ. *Вопросы онкологии* 2007;53(4):448–52. PMID: 17969409.
- Finn R.S., Dering J., Conklin D. et al. PD 0332991, a selective cyclin-D-kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast Cancer Res* 2009;11(5):R77. DOI: 10.1186/bcr2419.
- de Araujo C.B., Russo L.C., Castro L.M. et al. A novel intracellular peptide derived from G1/S cyclin D2 induces cell death. *J Biol Chem* 2014;289(24):16711–26. PMID 24764300.
- Bhattacharya S., Ray R.M., Johnson L.R. Cyclin-dependent kinases regulate apoptosis of intestinal epithelial cells. *Apoptosis* 2014;19(3):451–66. DOI: 10.1007/s10049-013-0942-3.
- Aleem E., Arceci R.J. Targeting cell cycle regulators in hematologic malignancies. *Front Cell Dev Biol* 2015;3:16. PMID: 25914884. DOI: 10.3389/fcell.2015.00016.
- Имянитов Е.Н. Эволюция системного лечения гормонозависимого рака молочной железы: от чередования препаратов к комбинированной терапии. *Опухоли женской репродуктивной системы* 2016;12(2):46–51.
- Bozhenko V.K., Kulnich T.M., Kudinova E.A. et al. New targeted anti CDK4/6 peptide ММ-D37К. *J Clin Oncol* 2013;31:e13545.
- Патент РФ № 2435783. 2011 г. Боженко В.К. Химерный пептид и фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний.
- Патент РСТ/RU2014/000199 WO2014163535 A1. 2014 г. Боженко В.К. Химерный пептид и фармацевтическая композиция для лечения онкологических заболеваний.
- Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможно-

- сти использования. М.: Издательская группа РОНЦ, 2010. С. 16.
17. Трещалина Е.М. Коллекция штаммов опухолей человека. Под ред. М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009. С. 88–90.
18. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–657.
19. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей. ЕЭС, Страсбург, 1985. Ланималогия 1993;1:29.
20. Большаков О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. Качественная клиническая практика 2002;9:1–15. PMID: 27296126.

ВЛИЯНИЕ БИНАРНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ «ТЕРАФТАЛ + АСКОРБИНОВАЯ КИСЛОТА» НА ЦЕНТРАЛЬНУЮ НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

Н.П. Ермакова¹, С.С. Трофимов², Н.Ю. Кульбачевская¹, О.И. Коняева¹, В.М. Бухман¹, Л.М. Михайлова¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Московский городской психолого-педагогический университет»;

Россия, 127051 Москва, ул. Сретенка, 29

Контакты: Надежда Павловна Ермакова ne518@yandex.ru

Введение. Нейротоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии. Выявление в эксперименте на животных осложнений психотропного или нейротропного действия нового препарата является одной из наиболее сложных проблем предклинической токсикологии. Проведено доклиническое токсикологическое изучение влияния бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» на центральную нервную систему (ЦНС).

Цель исследования – прогноз токсических эффектов бинарной каталитической системы при ее клиническом применении.

Материалы и методы. Работа проведена на 300 мышах-самцах гибридах (СВА × С57 В1/6J) F1. Терафтал – российский препарат. Бинарную каталитическую систему вводили внутривенно однократно в близкой к максимально переносимой дозе: терафтал 50 мг/кг + аскорбиновая кислота 100 мг/кг и в терапевтической дозе: терафтал 20 мг/кг + аскорбиновая кислота 44 мг/кг. Полученные данные сравнивали с данными контрольных животных, получавших 0,9 % раствор хлорида натрия, и с данными животных, получавших один терафтал и одну аскорбиновую кислоту в эквивалентных дозах. Для оценки нейротоксичности использовались тесты стандартного нейрофармакологического скрининга. Проводили оценку эмоционального статуса, мышечного тонуса. Поведение оценивали в тестах «открытое поле» и «агрессивность». Оценивали реакцию на болевое раздражение, изменение ректальной температуры тела. Высшие интегративные функции мозга исследовались на модели условного рефлекса пассивного избегания. Оценивали влияние на судорожную готовность ЦНС.

Результаты. Каталитическая система изменяла общее состояние животных. Это проявлялось, с одной стороны, в подавлении их общей активности (вялости, гиподинамии вплоть до адинамии, миорелаксации, заваливании на бок, урежении дыхания), с другой – в повышении их возбудимости (при нахождении в группе некоторые животные принимали характерные агрессивные стойки, в ряде случаев наблюдались судороги). У этих животных наблюдались экзофтальм, появление позы «лягушки», позы «молящейся мыши», стремления спрятаться. Угнетающее действие каталитической системы было дозозависимо. Наблюдали угнетение различных форм поведения, эмоционального статуса, снижение температуры тела и болевой чувствительности, в тесте на агрессивность – уменьшение количество схваток, в тесте «открытое поле» – подавление двигательной активности. Спонтанные судороги при провокации коразолом бинарная каталитическая система не усиливала.

Заключение. Полученные данные позволяют прогнозировать токсические эффекты со стороны ЦНС при клиническом применении бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота»: общую заторможенность, вялость, гиподинамию, снижение температуры тела, повышение тревожности и агрессивности и, в очень редких случаях, возникновение судорог.

Ключевые слова: новое противоопухолевое средство, бинарная каталитическая система «терафтал + аскорбиновая кислота», центральная нервная система, нейротоксичность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-42-49

THE IMPACT OF A BINARY CATALYST SYSTEM «TEREFTAL + ASCORBIC ACID» ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

N.P. Ermakova¹, S.S. Trofimov², N.Y. Kulbachevskaya¹, O.I. Konyaeva¹, V.M. Bukhman¹, L.M. Michailova¹

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

²Moscow State University of Psychology and Education; 29 Sretenka Str., Moscow 127051, Russia

Introduction. Neurotoxicity is one of the specific systemic complications of anticancer chemotherapy. Detection in experimental animals complications of psychotropic or neurotropic action of the new drug is one of the most difficult challenges of preclinical toxicology. Pre-clinical toxicological study of the effect of a binary catalyst system «tereftal + ascorbic acid» on the central nervous system (CNS).

Objective. The prediction of toxic effects of binary catalytic system in clinical application in patients.

Materials and methods. The study was conducted on 300 male mice hybrids (CBA × C57 B1/6J) F1. Have tereftal – russian drug. A binary catalyst system was injected intravenously once at close to the maximum tolerated dose – 50 mg/kg tereftal + 110 mg/kg

ascorbic acid and in therapeutic dose – 20 mg/kg tereftal + 44 mg/kg ascorbic acid. The obtained data were compared with a control animal treated with saline solution and with the data of animals treated with one tereftal and one ascorbic acid in equivalent doses. To assess neurotoxicity tests used standard neuropharmacological screening. An assessment of emotional status, muscle tone were undertaken. Behavior was evaluated in the tests «open field» and «aggression». We evaluated the response to pain stimulation, the change in rectal body temperature. Higher integrative brain functions were investigated on the model of the conditioned reflex of passive avoidance. Estimated effect on convulsive readiness of the CNS.

Results. The catalytic system changed the general condition of the animals. This was manifested, on the one hand, in the suppression of their overall activity (sluggishness, inactivity until weakness, muscle relaxation, the lowering side, the slowing of breathing), the other – to increase their excitability (when in group, some animals adopted a characteristic aggressive stands, in some cases seizures). These animals were observed exophthalmos, the appearance of the position «frog», posture «praying mouse», the desire to hide. The inhibitory effect of the catalytic system was dose-dependent. Observed inhibition of various forms of behavior, emotional status, decrease in body temperature and pain sensitivity, in the test for aggression – reducing the number of fights, in open field test – locomotor activity suppression. Spontaneous seizures in the provocation corazol binary catalytic system was not strengthened.

Conclusion. The obtained data allow to predict toxic effects from the CNS during clinical use of binary catalytic system «tereftal + ascorbic acid»: total confusion, lethargy, physical inactivity, decrease in body temperature, increased anxiety and aggression and, in very rare cases, the occurrence of seizures.

Key words: anticancer drug, a binary catalyst system «tereftal + asorbic acid», the central nervous system, neurotoxicity

Введение

Нейротоксичность является одним из специфических системных осложнений противоопухолевой химиотерапии. Выявление в эксперименте на животных осложнений психотропного или нейротропного действия нового препарата является одной из наиболее сложных проблем предклинической токсикологии. Особенно трудно оценить отсроченное нейротоксическое действие препаратов. Сегодня влияние противоопухолевых препаратов на центральную нервную систему (ЦНС) определяется нередко лишь при их клиническом применении. Проявления нейротоксичности противоопухолевых препаратов (тошнота, рвота, диспепсия, дисфория, головокружение, адинамия, головная боль, нарушение слуха, зрения, сна, чувствительности, неврологическая боль, судороги и другие неврологические расстройства) не только снижают субъективное качество жизни онкологических больных, но иногда являются основной причиной отмены препарата. Для некоторых противоопухолевых препаратов нейротоксичность является лимитирующей. К таким препаратам относятся винкаалкалоиды, подофиллотоксины, препараты комплексных соединений платины, таксаны, метотрексат при интратекальном и интравентрикулярном введениях, БиКНУ при интракаротидном введении и другие препараты [1–3]. Предклиническая оценка характера нейротропного действия противоопухолевых препаратов, прогнозирование их нейротоксичности при применении в клинике решают конкретные вопросы безопасности применения таких лекарств, а также позволяют избежать неопределенностей в диагностике изменений со стороны ЦНС, возникших при фармако-терапии.

В последние годы в химиотерапии злокачественных новообразований интенсивно развивается новое перспективное направление, получившее название бинарной терапии опухолей [4–7], механизм действия которой связан с образованием свободнорадикальных частиц при взаимодействии 2 компонентов. Новая стратегия бинарной каталитической терапии была предложена академиком М.Е. Вольпиным (Институт элементоорганических соединений имени А.Н. Несмеянова РАН (ИНЭОС РАН)), в соответствии с этой стратегией для генерации активных форм кислорода (АФК) использовались биогенные восстановители (аскорбиновая кислота, тиолы и др.) [5, 8–10]. Была сформулирована идея о возможности подавления роста злокачественных опухолей каталитической системой, состоящей из металлокомплекса кобальта и биогенного восстановителя – аскорбиновой кислоты (АК) [4, 11]. Исследования в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России цитотоксических свойств металлокомплексов кобальта и их сочетания с АК *in vitro* и *in vivo* позволили отобрать фталоцианиновый комплекс кобальта $\text{CoPc}(\text{COONa})_8$ как вещество, обладающее в сочетании с АК наиболее сильным цитотоксическим эффектом [12–14]. Отобранный комплекс фталоцианина получил название «терафтал» (ТФ) и был рекомендован в качестве эффективного источника АФК – кислородосодержащих радикалов (O_2^- , OH^- , H_2O_2) для разработки на его основе лекарственного средства – бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» (БКС (ТФ + АК)) для терапии опухолей.

В данной работе представлено экспериментальное изучение влияния ТФ и БКС (ТФ + АК) на ЦНС

для оценки их нейротоксического действия и прогнозирования токсических эффектов при применении в клинике. Для этого оценивался характер поведенческих реакций мышей после применения вышеуказанных лекарственных средств.

Исследование проводили на стандартных сертифицированных животных в соответствии с российскими и международными требованиями по использованию животных моделей [15–18].

Материалы и методы

Эксперименты выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по изучению влияния противоопухолевых препаратов на функциональное состояние ЦНС [19, 20] на 300 мышах-самцах гибридах (СВА × С57 В1/6J) F1 с массой тела 20–25 г, полученных из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России (филиал «Столбовая»). Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

ТФ – российский препарат, создан в ФГУП ГНЦ «Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей» и ИНЭОС РАН совместно с ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России и предложен в сочетании с АК как эффективное средство для бинарной каталитической терапии опухолей.

ТФ растворяли *ex tempore* в 0,9 % растворе хлорида натрия до 1 % концентрации ТФ. АК применяли в виде официального 5 % раствора для инъекций. При введении БКС (ТФ + АК) АК применяли с интервалом 1 ч после введения ТФ в фиксированном весовом соотношении 1 : 2,2. БКС (ТФ + АК) вводили внутривенно однократно в близкой к максимально переносимой дозе – 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК и в терапевтической дозе – 20 мг/кг ТФ + 44 мг/кг АК. Полученные данные сравнивали с данными контрольных животных, получавших 0,9 % раствор хлорида натрия, и с данными животных, получавших один ТФ и одну АК в эквивалентных дозах. Для оценки изменений характера поведенческих реакций при заведомо известном токсическом действии ТФ [21] препарат вводили в дозе, близкой к полудетальной, – 100 мг/кг. Опытные группы состояли из 15 мышей, контрольные группы – из 20 мышей. Поведенческие реакции животных оценивали через 1 и 24 ч после введения препаратов.

Для оценки нейротоксичности изучаемых препаратов использовались тесты стандартного нейрофармакологического скрининга. Оценка эмоционального статуса [22] проводилась в баллах по следующей шкале: 0 – отсутствие реакции, 3 – максимальная реакция. Мышечный тонус оценивали в тестах координации на горизонтальной проволоке [23]

и удерживания на перевернутой сетке [24]. Поведение мышей оценивали в тестах: «открытое поле» (фиксируют количество посещений отверстий в полу в течение 2 мин) [25] и «агрессивность» (фиксируют число схваток при слабом электроболевым раздражении через пол) [26]. Оценивали реакцию мышей на болевое раздражение в виде зажима основания хвоста по модифицированной методике [27] (оценка проводилась по следующей шкале: 0 – отсутствие реакции, 4 – максимальная реакция с вокализацией). Оценивали изменение ректальной температуры тела мышей. Высшие интегративные функции мозга исследовались на модели условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [28], где мышь избегает перехода в ранее предпочитаемое затемненное отделение экспериментальной камеры, в котором она при обучении получила болевое раздражение. Для оценки влияния на судорожную готовность ЦНС мышам подкожно вводили коразол в дозе 50 мг/кг. Учитывали количество животных (в %) с клоническими судорогами, тоническими судорогами, количество погибших животных и латентный период появления первых судорог после введения коразола.

Статистическую значимость различий оценивали с помощью дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса [29]. Если различия были достоверны ($p < 0,05$), проводилось попарное сравнение по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни [30]. Различия числа животных оценивали по критерию χ^2 [29].

Результаты и их обсуждение

БКС (ТФ + АК) в исследованных дозах: 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК и 20 мг/кг ТФ + 44 мг/кг АК – изменяла общее состояние животных. Это проявлялось, с одной стороны, в подавлении их общей активности (вялости, гиподинамии вплоть до адинамии, миорелаксации, заваливания на бок, урежении дыхания), с другой – в повышении их возбудимости (при нахождении в группе некоторые животные принимали характерные агрессивные стойки, в ряде случаев наблюдались судороги). Кроме того, у этих животных наблюдались экзофтальм, появление позы «лягушки», позы «молящейся мыши», стремления спрятаться. Угнетающее действие БКС (ТФ + АК) было дозозависимо. Это же наблюдалось при воздействии одного ТФ в дозе 50 мг/кг и в меньшей степени в дозе 20 мг/кг. АК оказывала активирующее действие в дозах 110 и 44 мг/кг без общего подавляющего эффекта.

БКС (ТФ + АК) не изменяла эмоционального статуса животных, за исключением вокализаций при применении в дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК. ТФ в дозах 50 и 20 мг/кг не влиял на эмоциональность животных, а АК в дозе 44 мг/кг усиливала ее

Таблица 1. Влияние терафталла, аскорбиновой кислоты и бинарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на эмоциональное состояние подопытных мышей

Показатель	0,9 % раствор хлорида натрия	Терафталл, мг/кг			Аскорбиновая кислота, мг/кг		Терафталл + аскорбиновая кислота, мг/кг	
		20	50	100	44	110	20 + 44	50 + 110
Реакция на захват рукой (в баллах)	2,6 ± 0,2	2,6 ± 1,0	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,4	2,75 ± 0,1	2,7 ± 0,2	2,6 ± 0,3	1,7 ± 0,5
Реакция на приближение пинцета к носу (в баллах)	1,5 ± 0,5	1,7 ± 0,5	1,9 ± 0,1	1,7 ± 0,2	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,3	1,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1
Реакция на подталкивание сзади (в баллах)	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,4 ± 0,2	2,3 ± 0,2*	1,3 ± 0,1	1,3 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Вокализация (число звуков)	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,8 ± 0,8	0,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2	0
Дефекация (число болюсов кала)	0	0	0,2 ± 0,2	0	0	0	0,7 ± 0,4	0
Уринация (число капель мочи)	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем (с мышами, получившими 0,9 % раствор хлорида натрия).

Таблица 2. Влияние терафталла, аскорбиновой кислоты и бинарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на мышечный тонус подопытных мышей, оцененный по удерживанию на перевернутой сетке

Показатель	0,9 % раствор хлорида натрия	Терафталл, мг/кг			Аскорбиновая кислота, мг/кг		Терафталл + аскорбиновая кислота, мг/кг	
		20	50	100	44	110	20 + 44	50 + 110
Число мышей (%), удержавшихся на сетке	83,3	83,3	66,7	50	83,3	66,7	100	50,0
Время удерживания на сетке (с)	55,8 ± 4,2	60,0 ± 2,1	47,5 ± 8,1	43,8 ± 0,3	52,0 ± 8,0	50,3 ± 6,1	60,0 ± 0	45,5 ± 6,9

Примечание. * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем (с мышами, получившими 0,9 % раствор хлорида натрия).

по показателю реакции на подталкивание сзади (табл. 1). БКС (ТФ + АК), один ТФ и одна АК в изученных дозах не влияли на координацию движения на горизонтальной проволоке.

БКС (ТФ + АК) в дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК и один ТФ в дозе 100 мг/кг проявляли лишь тенденцию к снижению мышечного тонуса по показателям числа мышей, удержавшихся в течение 1 мин на перевернутой сетке, и по сокращению среднего времени этого удерживания (табл. 2).

Подавляющее действие БКС (ТФ + АК) проявлялось и в ее гипотермическом действии (рис. 1): в дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК БКС (ТФ + АК) снижала температуру тела животных почти на 4 °С, а в дозе 20 мг/кг ТФ + 44 мг/кг АК – проявляла тенденцию к снижению показателя на 1 °С. Один ТФ также дозозависимо снижал температуру тела мышей на 1,5–3,0 °С. Одна АК не оказывала влияния на температуру тела животных по сравнению с температурой тела контрольных мышей.

В тесте на агрессивность БКС (ТФ + АК) не только не увеличивала агрессивность, а статистически значимо уменьшала количество схваток в обеих исследованных дозах (рис. 2). При применении одного ТФ явного увеличения агрессивности выявлено не было. АК активировала животных по этому показателю: по сравнению с контрольными животными число схваток было увеличено при применении препарата в обеих исследованных дозах (44 мг/кг и 110 мг/кг) (рис. 2).

В тесте на болевую чувствительность подавляющее действие БКС (ТФ + АК) проявлялось только при применении БКС в дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК. Применение животным одного ТФ, как и одной АК, в этом тесте не оказывало влияния на болевую чувствительность (рис. 3).

В тесте «открытое поле» БКС (ТФ + АК) показала дозозависимый эффект подавления двигательной активности. При воздействии БКС (ТФ + АК) в дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК снижались все 3 показателя: горизонтальная (рис. 4), вертикальная (рис. 5)

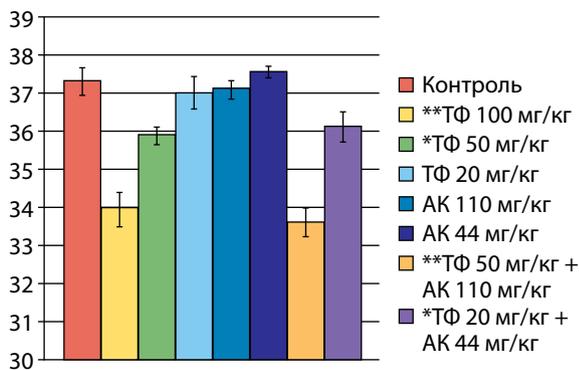


Рис. 1. Влияние терафталла (ТФ), аскорбиновой кислоты (АК) и би-нарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на температуру тела подопытных мышей: по вертикали – температура тела в градусах по Цельсию; контроль – интактные мыши; ТФ – мыши, получавшие только ТФ; АК – мыши, получавшие только АК; ТФ + АК – мыши, получавшие ТФ + АК; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ статистически достоверно по сравнению с контролем

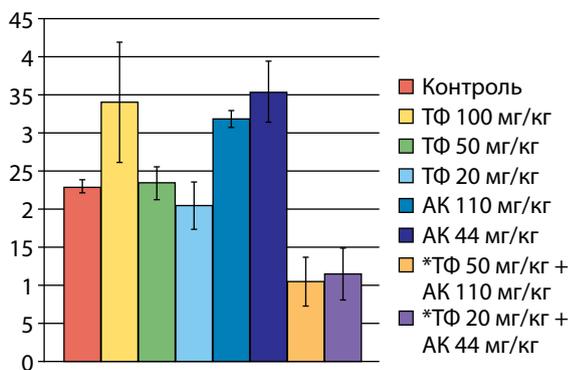


Рис. 2. Влияние терафталла (ТФ), аскорбиновой кислоты (АК) и би-нарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на агрессивность подопытных мышей при слабом электроболевым раздражении через пол: по вертикали – число схваток; контроль – интактные мыши; ТФ – мыши, получавшие только ТФ; АК – мыши, получавшие только АК; ТФ + АК – мыши, получавшие ТФ + АК; * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем

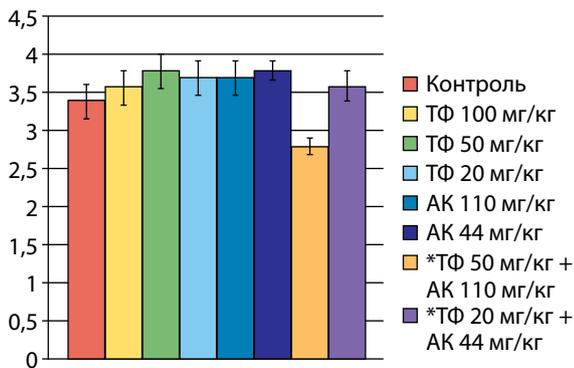


Рис. 3. Влияние терафталла (ТФ), аскорбиновой кислоты (АК) и би-нарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на реакцию подопытных мышей на болевое раздражение в виде защемления корня хвоста: по вертикали – выраженность реакции в баллах; контроль – интактные мыши; ТФ – мыши, получавшие только ТФ; АК – мыши, получавшие только АК; ТФ + АК – мыши, получавшие ТФ + АК; * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем

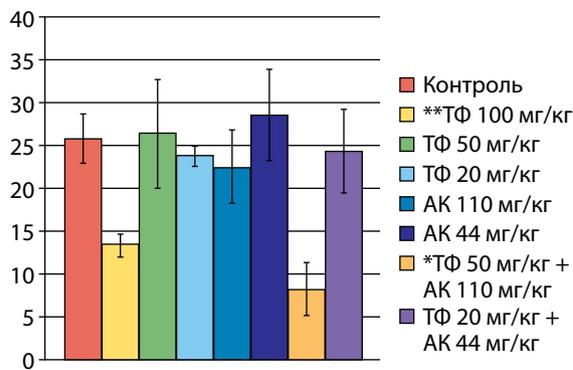


Рис. 4. Влияние терафталла (ТФ), аскорбиновой кислоты (АК) и би-нарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на горизонтальную активность подопытных мышей: по вертикали – число пересеченных квадратов пола; контроль – интактные мыши; ТФ – мыши, получавшие только ТФ; АК – мыши, получавшие только АК; ТФ + АК – мыши, получавшие ТФ + АК; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ статистически достоверно по сравнению с контролем

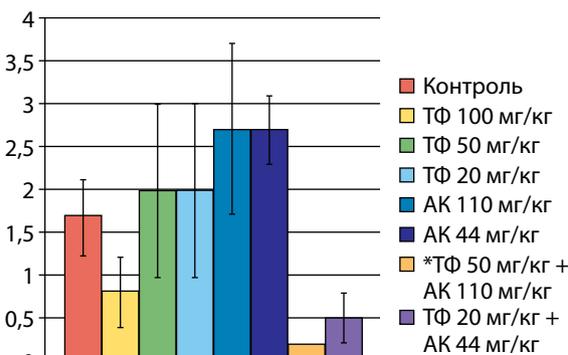


Рис. 5. Влияние терафталла (ТФ), аскорбиновой кислоты (АК) и би-нарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на вертикальную активность подопытных мышей: по вертикали – число вертикальных стоек; контроль – интактные мыши; ТФ – мыши, получавшие только ТФ; АК – мыши, получавшие только АК; ТФ + АК – мыши, получавшие ТФ + АК; * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем

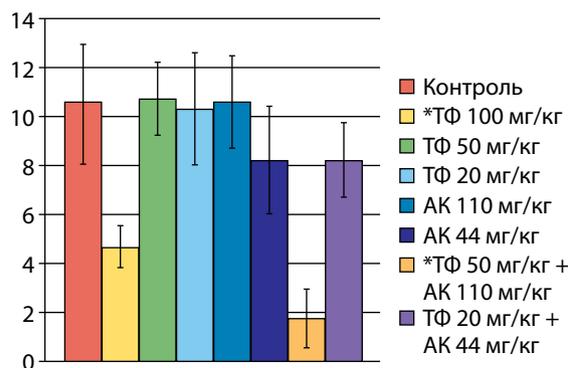


Рис. 6. Влияние терафталла (ТФ), аскорбиновой кислоты (АК) и би-нарной каталитической системы «терафталл + аскорбиновая кислота» на исследовательскую активность подопытных мышей: по вертикали – число заглядываний в отверстия в полу; контроль – интактные мыши; ТФ – мыши, получавшие только ТФ; АК – мыши, получавшие только АК; ТФ + АК – мыши, получавшие ТФ + АК; * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем

Таблица 3. Влияние терафтал, аскорбиновой кислоты и бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» на судороги подопытных мышей, вызванные коразолом

Показатель	0,9 % раствор хлорида натрия	Терафтал, мг/кг			Аскорбиновая кислота, мг/кг		Терафтал + аскорбиновая кислота, мг/кг	
		20	50	100	44	110	20 + 44	50 + 110
Число животных (%) с судорогами	50,0	16,7	33,3	33,3	50,0	16,7	16,7	33,3
Латентное время (с) первых судорог	18,0 ± 2,1	15,0 ± 0	9,0 ± 2,0	12,5 ± 3,5	11,7 ± 1,9	15,0 ± 0	14,0 ± 0	12,0 ± 0

Примечание. * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем (с мышами, получившими 0,9 % раствор хлорида натрия).

Таблица 4. Влияние терафтал, аскорбиновой кислоты и бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» на поведение подопытных мышей в тесте условного рефлекса пассивного избегания

Показатель	0,9 % раствор хлорида натрия	Терафтал, мг/кг			Аскорбиновая кислота, мг/кг		Терафтал + аскорбиновая кислота, мг/кг	
		20	50	100	44	110	20 + 44	50 + 110
Число животных (%), зашедших в затемненное отделение:								
До обучения	100	0*	33,3	66,7	100	83,3	0*	33,3
После обучения	33,3	—	50,0	0	16,7	20,0	—	50,0
Латентный период (с) 1-го захода в затемненное отделение:								
До обучения	117,0 ± 22,4	180	93,5 ± 5,5	108,0 ± 27,4	75,2 ± 23,5	85,2 ± 14,4	180,0 ± 0	92,0 ± 3,0
После обучения	166,2 ± 8,8	—	100,5 ± 79,5	180,0 ± 0	179,3 ± 0,7	164,6 ± 15,4	—	143,5 ± 36,5
Время пребывания (с) в затемненном отделении:								
До обучения	17,5 ± 3,5	0	75,5 ± 3,5	68,5 ± 24,9	53,7 ± 14,1	70,8 ± 21,2	0	84,0 ± 7,0
После обучения	4,5 ± 4,1	—	58,0 ± 19,3	0	0,7 ± 0,2	15,40 ± 5,13	—	36,5 ± 12,2

Примечание. * $p < 0,05$ статистически достоверно по сравнению с контролем (с мышами, получившими 0,9 % раствор хлорида натрия).

и исследовательская активность (рис. 6). При воздействии БКС (ТФ + АК) в дозе 20 мг/кг ТФ + 44 мг/кг АК наблюдалась лишь тенденция к уменьшению вертикальной активности (рис. 5). Один ТФ при применении в дозе 100 мг/кг уменьшал горизонтальную активность (рис. 4) и число заглядываний в отверстия пола (рис. 6), а также проявлял тенденцию к уменьшению вертикальной активности (рис. 5).

Несмотря на то, что БКС (ТФ + АК), как и один ТФ, в исследованных дозах вызывала у некоторых мышей спонтанные судороги, при провокации коразолом они не усиливались. АК также не усиливала судорожного действия коразола (табл. 3).

При изучении поведения мышей в камере Буреша для выработки УРПИ нейротоксические свойства БКС (ТФ + АК) проявлялись особенно ярко. На фоне действия БКС (ТФ + АК) животные, при их помещении в большее освещенное отделение камеры,

во многих случаях оставались неподвижными, не проявляя признаков активности, в том числе не пытались перейти в меньшее затемненное отделение (нарушение «норкового рефлекса»). При применении БКС (ТФ + АК) в дозе 20 мг/кг ТФ + 44 мг/кг АК ни одна из подопытных мышей не зашла в обычно предпочитаемое меньшее затемненное отделение. При применении БКС (ТФ + АК) в дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК только 1/3 животных заходила в затемненное отделение. Те же нарушения были отмечены и при применении одного ТФ. При таком нарушении исходного поведения процесс выработки навыка был невозможен и оценить влияние каталитической системы на мнестические функции невозможно. АК не влияла на число мышей, зашедших в затемненное отделение камеры, проявляя тенденцию к сокращению латентного периода 1-го захода в это отделение и к увеличению времени пребывания

в нем, что, вероятно, связано с активирующим действием препарата. При воспроизведении УРПИ через 24 ч после обучения отличий от контрольных животных в действии АК не выявлено (табл. 4).

Как следует из приведенных данных, нейротоксический эффект ТФ проявляется в угнетении различных форм поведения, в снижении температуры и болевой чувствительности. БКС (ТФ + АК) в нетоксической дозе 50 мг/кг ТФ + 110 мг/кг АК во многих тестах оказывает такое же нейротоксическое действие, как и ТФ в токсической дозе 100 мг/кг. Такие результаты позволяют предположить, что АК, проявляющая противоположный активирующий эффект при изолированном применении, оказывает потенцирующее действие на ТФ.

Так как ТФ не проникает через гематоэнцефалический барьер [31], можно предположить, что подавляющий эффект БКС (ТФ + АК) и одного ТФ связан с угнетением симпатической активности периферической нервной системы и действием метаболитов ТФ. В пользу угнетения симпатической активности периферической нервной системы свидетельствует развитие у животных отдельных вегетативных изменений, наблюдавшихся нами ранее при оценке общетоксического действия: резкое падение артериального давления, урежение сердечных сокращений и дыхания, экзофтальм [32]. В пользу центрального действия метаболитов ТФ свидетельствуют наблюдавшиеся отдельные спонтанные клонико-тонические судороги, которые могут возникать вследствие действия низкомолекулярных соедине-

ний кобальта, образование которых возможно при биотрансформации ТФ [33, 34]. Однако эпилептогенный эффект БКС (ТФ + АК) и ТФ невелик, поскольку она не приводила к усилению коразоловых судорог.

Агрессивность и судорожная активность часто коррелируют с повышенной тревожностью [35]. Снижение активности в открытом поле и замирание в освещенном отделении камеры для выработки УРПИ можно было бы рассматривать как поведенческое проявление страха. В пользу этого свидетельствуют проявления спонтанной агрессивности, которая может наблюдаться в ситуации, вызывающей страх. Отсутствие уменьшения проявлений тревожности в виде вокализации на фоне применения БКС (ТФ + АК) противоречит поведенческим проявлениям тревожности. Тем не менее, это не исключает общего снижения активности, вызванного БКС (ТФ + АК) и одним ТФ, в различных тестах за счет угнетения симпатической активности в экстремальной ситуации и проявления преимущественно парасимпатического эффекта.

Заключение

Полученные данные по нейротоксическому действию БКС (ТФ + АК) позволяют прогнозировать ее дозозависимые токсические эффекты со стороны ЦНС при клиническом применении: общую заторможенность, вялость, гиподинамию, снижение температуры тела, повышение тревожности и агрессивности и, в очень редких случаях, возникновение судорог.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Гершанович Л.Л. В кн.: Осложнения при химио- и гормонотерапии злокачественных опухолей. М.: Медицина, 1982. С. 69–73.
2. Михайлова Л.М., Трофимов С.С. Сравнительное изучение влияния циклоплатина и платидиама на центральную нервную систему. В сб.: Терапия, диагностика опухолей в эксперименте. М., 1990. С. 42–45.
3. Шакирова И.Н. Нейротоксичность современных противоопухолевых цитостатиков. В кн.: Энциклопедия клинической онкологии. Руководство для практикующих врачей. Под общ. ред. М.И. Давыдова, Г.Л. Вышковского. М.: РЛС, 2004. С. 914–923.
4. Вольпин М.Е., Кнорре Д.Г., Новодорова Г.Н. и др. Хелатные комплексы кобальта как катализаторы расщепления цепей ДНК. Докл. АН СССР 1989;298(2):363–6.
5. Вольпин М.Е., Крайнов Н.Ю., Москалев И.В. и др. Комплексы переходных металлов как катализаторы образования активных форм кислорода в реакциях автоокисления. Сообщение 1. Фталоцианиновые комплексы кобальта и железа. Известия РАН, серия химическая 1996;(8):2105–10.
6. Сыркин А.Б. О возможной роли свободных радикалов в канцерогенезе. Успехи современной биологии 1960;49(3):473–88.
7. Чиссов В.И., Соколов В.В., Филоненко Е.В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей. Краткий очерк развития и клинического применения в России. Российский химический журнал 1998;42(5):5–9.
8. Владимиров Ю.А., Азизова О.А., Деев А.И. и др. Свободные радикалы в живых системах. Итоги науки и техники, серия Биофизика 1991;29:1–5.
9. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активированные кислородные метаболиты в биологических системах. Успехи современной биологии 1993;113(3):286–93.
10. Кузнецова Н.А., Каляя О.Л. Фотокаталитическая генерация активных форм кислорода в биологических средах в методе фотодинамической терапии. Российский химический журнал 1998;42(5):36–41.
11. Борисенкова С.А., Гиренко Е.К., Каляя О.Л. Механизмы окисления аскорбиновой кислоты и проблемы каталитической терапии рака. Российский химический журнал 1998;42(5):111–6.
12. Сыркин А.Б., Жукова О.С., Кикоть Б.С. и др. Терафтал – новый препарат для бинарной каталитической терапии

- злокачественных опухолей. Российский химический журнал 1998;42(5):1406.
13. Якубовская Р.И., Казачкина Н.И., Кармакова Т.А. Скрининг и медико-биологическое изучение отечественных фотосенсибилизаторов. Российский химический журнал 1998;42(5):17–23.
14. Volpin M.E., Vorozhtsov G.N., Gerasimova G.K. et al. Patent «Agent for suppressing tumor growth». PCI Int. Appl. WO 97 03, 666 (Cl. A61K31/40), 6 Feb. 1997, RU. Appl. 95, 112, 240, 17 Jul. 1995, P. 16 (Russ).
15. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных, изложенные в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей», ЕЭС, Страсбург, 1985. Ламинология 1993;1:29.
16. Приказ Минздравсоцразвития России № 708н от 23.08.2010 «Об утверждении правил лабораторной практики».
17. Рекомендации, содержащиеся в Директивах Европейского сообщества (86/609 ЕС), Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР № 755 от 12.08.1977 и приказу Минсельхоза РФ № 490 от 05.11.2008 «Об утверждении правил проведения лабораторных исследований в области ветеринарии».
18. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабахаян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. Качественная клиническая практика 2002;1:58–61.
19. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон П.Д. В кн.: Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Пер. с англ. М.: Высшая школа, 1991. С. 399–412.
20. Михайлова Л.М., Сыркин А.Б., Гарин А.М., Барышников А.Ю. Методические указания по изучению общетоксического действия противоопухолевых фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд. перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. С. 13–23, 170–204.
21. Михайлова Л.М., Коняева О.И., Членова Е.Л. и др. Доклиническая токсикология терафтал-лио и бинарной каталитической системы «терафтал-лио + аскорбиновая кислота». Вопросы онкологии 2001;46(6):695–700.
22. Brady J.V., Nauta W.J. Subcortical mechanism in emotional behavioral: affective changes following septal forebrain lesions in the albino rat. J Comp Physiol Psychol 1953;46(3):339–41. PMID: 13109048.
23. Boissier J.R., Simon P. L'utilisation du test de la traction test de Julon—Courvoisier pour l'étude de psycoséptiques. Therapie 1960;15(6):1170–4.
24. Воронина Т.А., Вихляев Ю.И., Неробкова Л.Н. и др. Характеристики фармакологических свойств феназепама. В кн.: Феназепам. Киев: Наукова Думка, 1982. С. 87–151.
25. Walsh R.N., Cummins R.A. The open-field test: a critical review. Psychol Bull 1976;83(3):482–504. PMID: 17582919.
26. Tedeschi R., Tedeschi D., Mucha A. et al. Effects of various centrally acting drugs on fighting behavior of mice. J Pharmacol Exp Ther 1959;125(1):28–34.
27. Haffner F. Experimentelle prufung schmerzstillender mittel. Dtsch Med Wschr 1929;55:731–3.
28. Bures J., Buresova O. Cortical spreading depression as a memory disturbing factor. J Comp Physiol Psychol 1963;56(2):268–72. PMID: 14016941.
29. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999. С. 141–147, 346–348.
30. Mann H.B., Whitney D.R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. Ann Math Stat 1947;18:50–60.
31. Зимакова Н.И. Фармакокинетические исследования нового препарата Терафтал для бинарной каталитической терапии злокачественных опухолей. Российский биотерапевтический журнал 2002;1(2):46–8.
32. Ермакова Н.П., Михайлова Л.М., Трифонов А.И. и др. Влияние терафтал-лио и бинарной каталитической системы «терафтал + аскорбиновая кислота» на артериальное давление. Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». Российский биотерапевтический журнал 2006;5(1):14.
33. Лазарев Н.В. Вредные вещества в промышленности. Том 2. М.: Госхимиздат, 1954. С. 460–462.
34. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. М.: Медицина, 1982. С. 150–157.
35. Калув А.В. Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных). Киев: CSF, 1998. С. 98–102.

ИЗУЧЕНИЕ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОЙ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ БОРХЛОРИНА

О.И. Коняева¹, Н.Ю. Кульбачевская¹, В.А. Чалей¹, Н.П. Ермакова¹,
А.А. Николина¹, Т.И. Малова², В.М. Бухман¹

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ООО «ВЕТА-ГРАНД»; Россия, 123056 Москва, ул. Красина, 27, стр. 2

Контакты: Ольга Ивановна Коняева patkulba@mail.ru

Цель исследования – изучение эмбриотоксичности, тератогенности и репродуктивной токсичности лиофилизированной лекарственной формы борхлорина на крысах.

Материалы и методы. Исследования проводились на 210 неинбредных крысах-самках и 105 неинбредных крысах-самцах с массой тела 250–300 г. В работе использована лиофилизированная лекарственная форма борированного хлорина e_6 под названием «Борхлорин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 2,5 мг». Препарат вводили ежедневно внутривенно в течение 48 дней (самцам) и в течение 15 дней (самкам) в 2 суммарных дозах, соответствующих терапевтической дозе (ТД) для мышей при пересчете на крыс и 10 ТД. В качестве контроля были использованы интактные крысы, а также крысы-самцы и самки, получавшие внутривенно 0,9 % раствор натрия хлорида в режимах, соответствующих режиму введения препарата, и в объемах, соответствующих максимальному объему вводимого раствора.

Результаты исследования. Изучено повреждающее действие лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина на генеративную функцию крыс – выявление возможного отрицательного действия препарата на стадии прогенеза (формирование мужских и женских гамет). Установлено, что лиофилизированная липосомальная лекарственная форма борхлорина обладает повреждающим действием на репродуктивную функцию самцов и самок и внутриутробное развитие плодов (эмбриотоксичность) крыс по индексу способности к оплодотворению и зачатию и по индексу постимплантационной гибели плодов. Постимплантационная гибель плодов в наибольшей степени выражена у самок, получавших препарат в суммарной дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами. Леофилизированная липосомальная лекарственная форма борхлорина не вызывает предимплантационную гибель плодов, не оказывает тератогенного действия.

Заключение. Леофилизированная лекарственная форма борхлорина обладает повреждающим действием на репродуктивную функцию самцов и самок и внутриутробное развитие плодов (эмбриотоксичность) неинбредных крыс по индексу способности к оплодотворению и зачатию и по индексу постимплантационной гибели плодов. Леофилизированная лекарственная форма борхлорина не вызывает предимплантационную гибель плодов, не оказывает тератогенного действия, влияния на физическое развитие потомства и скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания потомства.

Ключевые слова: борхлорин, эмбриотоксичность, тератогенность, репродуктивная токсичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-50-59

REPRODUCTIVE TOXICITY OF THE LYOPHILIZED LIPOSOMAL DOSAGE FORM OF THE BORCHLORIN

O.I. Konyayeva¹, N.Yu. Kulbachevskaya¹, V.A. Chaley¹, N.P. Ermakova¹, A.A. Nikolina¹, T.I. Malova², V.M. Bukhman¹

¹N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia;
²LLC «VETA-GRAND»; housing 2, 27 Krasin Str., Moscow 123056, Russia

Introduction. The study investigates the embryotoxicity, teratogenicity and reproductive toxicity of lyophilized dosage form borchlorin on rats.

Materials and methods. The research was conducted on 210 outbred female rats and 105 outbred male rats weighing 250–300 g. We used a lyophilized dosage form borated chlorin e_6 called «Borchlorin liposomal, lyophilisates for dispersion for injection 2.5 mg». The drug was administered intravenously daily for 48 days (males) and 15 days (females) in 2 corresponding total doses for therapeutic dose in mice and rats based on the 10-therapeutic doses. As a control, intact rats were used, as well as rats – males and females who received intravenous 0.9 % sodium chloride solution into the mode corresponding to the mode of administration, and in the amounts corresponding to the maximum volume of the injected solution.

Results of the study. To study the damaging effect of lyophilized liposomal formulation borchlorin on the generative function in rats – the identification of the possible negative effect of the drug on the progenesis stage (formation of male and female gametes). It was found that lyophilized liposomal formulation borchlorin has a damaging effect on the reproductive function of male and female and fetal deve-

lopment (embryotoxicity) rats on the index's ability to fertilization and conception and the index of postimplantation fetal loss. Postimplant death of the fetuses in most pronounced in females treated with a total dose of the drug, therapeutic doses corresponding to 10, coupled with intact males. The lyophilized liposomal formulation borchlorin pre-implantation does not cause the death of the fetus, has no teratogenic effects.

Conclusion. The lyophilized dosage form borchlorin has a damaging effect on the reproductive function of male and female and fetal development (embryotoxicity) neinbrednyh rats on the index's ability to fertilization and conception and the index of postimplantation fetal loss. The lyophilized dosage form borchlorin pre-implantation does not cause the death of the fetus, has no teratogenic effects, effects on the physical development of the offspring, and the rate of maturation of the sensory-motor reflexes during the feeding of offspring.

Key words: borchlorin, embryotoxicity, teratogenicity, reproductive toxicity, rats

Введение

Борированный хлорин e_6 разработан и синтезирован в институте элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (патент № 2406726 от 20 декабря 2010 г.). В фотосенсибилизатор (хлорин e_6) был введен бор, обладающий нейтронозахватными свойствами. Борхлорин позволяет проводить фотодинамическую терапию и, при необходимости, дополнить ее бор-нейтрон-захватной терапией. Разработанный препарат является оригинальным и обладает уникальными свойствами. В ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России разработана лиофилизированная липосомальная лекарственная форма (ЛЛЛФ) – препарат Борхлорин. В лаборатории фармакологии и токсикологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России проведено доклиническое токсикологическое изучение ЛЛЛФ борхлорина с целью оценки ее безопасности и прогноза побочных и токсических эффектов при клиническом применении больным.

Цель исследования – изучение эмбриотоксичности, тератогенности и репродуктивной токсичности ЛЛЛФ борхлорина на лабораторных животных (крысы).

Задачи исследования:

- изучение повреждающего действия ЛЛЛФ борхлорина на генеративную функцию крыс – выявление возможного отрицательного действия препарата на стадии прогенеза (формирование мужских и женских гамет);
- исследование потомства в конце антенатального периода развития;
- исследование потомства в постнатальный период развития;
- оценка эмбриотропного действия ЛЛЛФ борхлорина, регистрируемого в постнатальном периоде развития.

Материалы и методы

Исследования проводили в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому

изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств, руководством по доклиническому изучению новых фармакологических веществ и руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [1–3].

Характеристика тест-системы

Исследования проводились на 210 неинбредных крысах-самках и 105 неинбредных крысах-самцах с массой тела 250–300 г, полученных из аккредитованного питомника лабораторных животных ООО «Кролинфо». Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Для кормления животных использовали стандартный промышленный сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Кормление проводили в одно и то же время.

Исследуемый препарат

В исследованиях использована созданная в лаборатории разработки лекарственных форм ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России ЛЛЛФ борированного хлорина e_6 под названием «Борхлорин липосомальный, лиофилизат для приготовления дисперсии для инъекций 2,5 мг». В качестве растворителя служила вода для инъекций. Для клинического использования ЛЛЛФ борхлорина рекомендована при однократном внутривенном (в/в) применении.

Процедура введения

Для изучения репродуктивной активности крыс-самцов ЛЛЛФ борхлорина вводили ежедневно в/в в течение 48 дней в фиксированной концентрации 0,25 мг/мл (2,5 мг во флаконе растворяли в 9,2 мл воды для инъекций) в 2 дозах: суммарная доза 2,5 мг/кг (разовая доза 0,05 мг/кг) доза, соответствующая терапевтической дозе (ТД) для мышей при пересчете на крыс (ТД для мышей – 5 мг/кг), и суммарная доза 25 мг/кг (разовая доза 0,5 мг/кг), соответствующая 10 ТД.

Для изучения репродуктивной активности ЛЛЛФ борхлорина на крысах-самках препарат вводили ежедневно в/в 15-кратно в фиксированной концентрации 0,25 мг/мл в тех же суммарных дозах

(соответствующих ТД и 10 ТД для мышей), что и самцам (разовые дозы 0,17 и 1,7 мг/кг соответственно). В качестве контроля были использованы интактные крысы, а также крысы-самцы и самки, получавшие в/в 0,9 % раствор натрия хлорида в режимах, соответствующих режиму введения ЛЛЛФ борхлорина, и в объемах, соответствующих максимальному объему вводимого препарата.

Время проведения экспериментов

Эксперимент проводился в период май – сентябрь 2016 г.

Критерии оценки репродуктивной токсичности

В каждой группе использовали 30 крыс-самок и 15 крыс-самцов. По окончании введения препарата крыс-самок подсаживали к самцам в соотношении 2 : 1 сроком на 2 эстральных цикла (10 дней). Оплодотворение регистрировали с помощью вагинальных мазков. Во время эксперимента наблюдали за состоянием и поведением беременных самок.

Беременных самок контрольных и опытных групп (по 20 крыс из каждой группы) выводили из эксперимента методом дислокации шейных позвонков на 20–21-й день беременности (оставшихся беременных самок – по 10 крыс из каждой группы – оставляли до родов). После вскрытия брюшной полости удаляли матку и переносили ее в чашку Петри. После вскрытия матки подсчитывали количество живых, мертвых, резорбцированных плодов и количество мест имплантации. Под бинокляром проводили наружный осмотр плодов с целью выявления внешних аномалий. Плоды взвешивали и определяли краниокаудальный размер (мм). В яичниках подсчитывали количество желтых тел. На основании этих данных определяли уровень пред- и постимплантационной смертности зародышей.

Предимплантационную смертность (%) определяли по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантаций в матке; постимплантационную смертность (%) – по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. Для оценки способности к оплодотворению и зачатию вычисляли индекс, характеризующий отношение числа беременных животных к числу ссаженных, выраженный в % (индекс плодовитости).

$$\text{Предимплантационная смертность, \%} = \frac{\text{Количество желтых тел} - \text{количество мест имплантации}}{\text{Количество желтых тел}} \times 100 \%$$

$$\text{Постимплантационная смертность \%} = \frac{\text{Количество мест имплантации} - \text{количество живых плодов}}{\text{Количество мест имплантации}} \times 100 \%$$

$$\text{Индекс плодовитости} = \frac{\text{Число оплодотворенных самок}}{\text{Число ссаженных самок}} \times 100 \%$$

Для исследования внутренних органов и костной системы с целью выявления аномалий развития плоды делили на 2 части. Одну часть фиксировали в жидкости Боуэна и после фиксации подвергали внешнему осмотру и исследованию внутренних органов (в том числе головного мозга) по методике Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИ экспериментальной медицины РАМН с использованием толстых бритвенных срезов на разных уровнях головы и туловища плода. Другую часть плодов фиксировали в 96 % этиловом спирте и после 10-дневной фиксации исследовали состояние внутренних органов по методу Стейплса, которые в дальнейшем удаляли из тел зародышей. Затем плоды для выявления аномалий развития скелета подвергали обработке по методу Доусона, модифицированному отделом эмбриологии НИИ экспериментальной медицины РАМН, с окраской ализарином красным [1–3].

Плоды, внутренние органы и скелет исследовали с помощью бинокулярного микроскопа МБС-9.

Оставшихся беременных самок (по 10 крыс из каждой группы) оставляли до родов и наблюдали за физическим развитием потомства до окончания вскармливания (35 дней).

Проводили ежедневное наблюдение за развитием потомства, регистрировали общее физическое состояние и поведение, динамику массы тела и гибель крысят. Оценка включала следующие регистрируемые показатели развития потомства: размер помета, число живых и мертвых новорожденных, гибель новорожденных, масса тела (7, 14, 21, 30-й день), отлипание ушной раковины (со 2-го дня), появление первичного волосяного покрова (с 4-го дня), прорезывание резцов (с 6-го дня), открытие глаз (с 12-го дня), опускание семенников (с 23-го дня), открытие влагалища (с 28-го дня), переворачивание на плоскости (со 2-го дня), отрицательный геотаксис (с 5-го дня), избегание обрыва (с 9-го дня), переворачивание в свободном падении (с 20-го дня), тест «открытое поле» (35-й день).

Методы статистической обработки данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Office Excel. Рассчитывали параметры, обычно используемые в токсикологии. За достоверные принимали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты

В результате проведенных исследований по репродуктивной активности крыс-самцов, получавших ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, в течение 48 дней введения препарата не выявлено каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений в поведенческих реакциях. При спаривании с интактными крысами-самками изменений сексуального поведения у крыс-самцов, получавших ЛЛЛФ борхлорина, не наблюдалось по сравнению с контрольными животными; эмоциональное состояние и поведенческие реакции крыс-самцов не отличались от поведения контрольных животных.

При изучении репродуктивной активности крыс-самцов после применения ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, при спаривании с интактными самками выявлено отрицательное действие на генеративную функцию самцов. Индекс способности к оплодотворению и зачатию отличался от значений контрольных групп на $\approx 25\%$ (крысы-самцы, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в ТД) и на $\approx 35\%$ (крысы-самцы, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в 10 ТД). Установлено отсутствие предимплантационной гибели зародышей. Процент предимплантационной гибели зародышей у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в обеих изученных дозах, составлял 0% и не отличался от значений контрольных

животных. В то же время установлена постимплантационная гибель плодов у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина. Процент постимплантационной гибели плодов у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, был практически одинаковым и составлял 11,2 и 8,0 % соответственно, что более чем в 2–2,5 раза превышало процент постимплантационной гибели плодов контрольных животных. При наружном осмотре живых плодов внешних видимых аномалий развития плодов отмечено не было. Масса тела плодов и краниокаудальный размер не отличались от значений контрольных групп (табл. 1).

При изучении репродуктивной активности крыс-самок во время и после введения ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, не выявлено каких-либо клинических проявлений токсичности и изменений в поведенческих реакциях. Сексуальное поведение крыс-самок после применения ЛЛЛФ борхлорина не отличалось от поведения контрольных животных.

При изучении репродуктивной активности крыс-самок после применения ЛЛЛФ борхлорина в 2 изученных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, при спаривании с интактными самцами выявлено отрицательное не зависящее от дозы действие на генеративную функцию самок. Индекс способности к оплодотворению и зачатию отличался от значений

Таблица 1. Результаты изучения репродуктивной токсичности неинбредных крыс-самцов, после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина спаренных с интактными самками

Показатель	Самцы			
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	Интактный контроль
Общее количество вскрытых самок	20	20	20	20
Количество беременных самок	15	13	20	19
Индекс способности к оплодотворению и зачатию (%)	75	65	100	95
Количество живых плодов*	7,9	9,2	10,7	11,9
Количество резорбций	5	1	0	1
Количество желтых тел в яичниках*	7,9	7,2	8,6	12,3
Количество мест имплантации*	8,9	10,0	11,0	12,5
Количество мертвых плодов	15	1	0	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	11,2	8,0	2,7	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	6,1 ± 1,9	6,5 ± 1,9	6,8 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)	37,0 ± 8,9	39,0 ± 7,1	39,0 ± 6,9	40,0 ± 5,9

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. *Среднее количество на 1 беременную самку.

Таблица 2. Результаты изучения репродуктивной токсичности неинбредных крыс-самок, после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина спаренных с интактными самцами

Показатель	Самки			
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	Интактный контроль
Общее количество вскрытых самок	20	20	20	20
Количество беременных самок	15	17	20	19
Индекс способности к оплодотворению и зачатию (%)	75	85	100	95
Количество живых плодов*	11,0	7,2	10,6	11,9
Количество резорбций	4	2	1	1
Количество желтых тел в яичниках*	10,8	12,1	10,3	12,3
Количество мест имплантации*	11,5	12,1	11,1	12,5
Количество мертвых плодов*	2,0	3,8	3,0	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	0	40,0	4,5	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	5,3 ± 1,7	5,6 ± 1,8	6,6 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)	38,0 ± 8,9	39,0 ± 10,0	40,0 ± 9,7	40,0 ± 5,9

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. *Среднее количество на 1 беременную самку.

контрольных групп на ≈ 25 % (крысы-самки, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в ТД) и на ≈ 15 % (крысы-самки, получавшие ЛЛЛФ борхлорина в 10 ТД). Установлено отсутствие предимплантационной гибели зародышей. Процент предимплантационной гибели зародышей у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в обеих дозах и спаренных с интактными самцами, составлял 0 % и не отличался от контрольных животных. Установлена высокая постимплантационная гибель плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в 10 ТД и спаренных с интактными самцами. Процент постимплантационной гибели плодов у животных в этой группе составлял 40 %. Постимплантационная гибель плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в ТД, отсутствовала. Процент постимплантационной гибели плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в ТД, не отличался от контрольных значений. При наружном осмотре живых плодов внешних видимых аномалий развития плодов отмечено не было. Масса тела плодов и краниокаудальный размер не отличались от значений контрольных групп (табл. 2).

При исследовании физического развития потомства, рожденного от крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и спаренных с интактными самцами, и от интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в тех же дозах,

обнаружено статистически недостоверное отставание в физиологическом приросте массы тела потомства по сравнению с контрольными животными (табл. 3). В период вскармливания этого потомства сенсорно-двигательные рефлексы были без особенностей и не отличались от рефлексов потомства контрольных животных (табл. 4, 5).

При патологоанатомическом исследовании не родившихся плодов в конце антенатального периода развития установлено отсутствие плодов с аномалиями внешнего развития, аномалиями развития костной системы, головного мозга и внутренних органов (табл. 6, 7).

При изучении эмбриотоксического и тератогенного действия ЛЛЛФ борхлорина у крыс-самок, получавших препарат в ТД и 10 ТД и спаренных с интактными самцами, и у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД и 10 ТД, уменьшения количества живых плодов не обнаружено. Количество живых плодов при изученных дозах не отличалось от показателей контрольных животных. Отмечено увеличение количества резорбций плодов в 4–5 раз у крыс-самок, получавших препарат в ТД и спаренных с интактными самцами, и у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД, по сравнению с интактными животными. При применении ЛЛЛФ борхлорина у крыс-самок, получавших препарат в ТД и 10 ТД и спаренных с интактными

Таблица 3. Изменение массы тела потомства, рожденного от неинбредных крыс после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Пол	Σ доза	Сутки опыта				
		7	14	21	28	35
Самки	ТД	13,5 ± 1,5	23,5 ± 2,3	36,3 ± 3,8	61,4 ± 5,3	108,7 ± 7,4
	10 ТД	11,2 ± 2,0	20,9 ± 3,4	31,5 ± 4,2	64,0 ± 6,0	116,5 ± 8,7
	NaCl	16,0 ± 3,2	31,1 ± 3,1	42,7 ± 3,5	72,1 ± 5,8	129,5 ± 8,2
Самцы	ТД	12,5 ± 2,5	23,3 ± 2,9	31,0 ± 5,0	52,9 ± 4,7	103,2 ± 18,9
	10 ТД	14,0 ± 1,9	24,1 ± 4,2	40,6 ± 4,7	61,2 ± 5,1	102,7 ± 12,3
	NaCl	15,3 ± 2,1	27,3 ± 3,5	39,9 ± 3,9	65,9 ± 4,8	118,2 ± 9,1
Интактный контроль		15,8 ± 3,1	26,8 ± 4,0	35,7 ± 4,2	67,3 ± 5,2	124,8 ± 8,9

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

Таблица 4. Результаты наблюдения за физическим развитием потомства, рожденного от неинбредных крыс-самок после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель	Самки			Интактный контроль	
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl		
Общее число новорожденных	100	115	100	114	
Число мертвых плодов	0	55	30	0	
Индекс гибели (%)	0	48	30	0	
Число погибших новорожденных	0	10	25	26	
Дни гибели новорожденных (сут)	–	1–2	1–2	2–3	
Число особей разного пола	самцы	50	30	20	42
	самки	50	20	25	46
Отлипание ушной раковины (сут)	2–4	2–4	2–4	2–4	
Появление первичного волосяного покрова (сут)	4–5	4–5	4–5	4–5	
Прорезывание резцов (сут)	6–8	6–9	6–8	6–9	
Открытие глаз (сут)	13–14	13–14	13–14	13–14	
Опускание семенников (сут)	23–25	24–25	24–25	23–25	
Открытие влагалища (сут)	27–29	28–30	27–29	28–30	
Средняя масса тела крысят на 35-е сутки (г)	108,7 ± 7,4	116,5 ± 8,7	129,5 ± 8,2	124,8 ± 8,9	

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

самцами, зарегистрировано 30 и 27 мертвых плодов соответственно, в отличие от контрольных животных. У интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД, зарегистрировано 15 мертвых плодов в отличие от контрольных животных. У интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в 10 ТД, мертвых плодов не зарегистрировано, что не отличалось от показателей контрольных животных (табл. 8, 9).

Отмечено увеличение количества резорбций плодов в 5 раз у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в ТД, по сравнению с контрольными животными. У интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими препарат в 10 ТД, количество резорбций плодов не отличалось от значений контрольных животных. Отмечено не зависящее от дозы увеличение количества резорбций плодов у крыс-самок, получавших

Таблица 5. Результаты наблюдения за физическим развитием потомства, рожденного от неинбредных крыс-самцов после применения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель	Самцы			Интактный контроль
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Общее число новорожденных	115	95	110	114
Число мертвых плодов	0	0	18	0
Индекс гибели (%)	0	0	16	0
Число погибших новорожденных	5	20	10	26
Дни гибели новорожденных (сут)	1–2	1–2	2–3	2–3
Число особей разного пола	самцы	35	45	42
	самки	50	40	46
Отлипание ушной раковины (сут)	2–4	2–4	2–4	2–4
Появление первичного волосяного покрова (сут)	4–5	4–5	4–5	4–5
Прорезывание резцов (сут)	6–9	6–8	6–9	6–9
Открытие глаз (сут)	13–14	13–14	13–14	13–14
Опускание семенников (сут)	23–25	23–25	24–25	23–25
Открытие влагалища (сут)	28–30	27–29	28–30	28–30
Средняя масса тела крысят на 35-е сутки (г)	103,2 ± 18,9	102,7 ± 12,3	118,2 ± 9,1	124,8 ± 8,9

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

Таблица 6. Результаты патологоанатомического исследования плодов на тератогенное действие, полученных от неинбредных крыс-самцов после введения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель	Самцы			Интактный контроль
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
<i>Внешний осмотр плодов</i>				
Число обследованных плодов	119	120	214	238
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0
	%	0	0	0
<i>Состояние костной системы</i>				
Число обследованных плодов	59	60	107	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0
	%	0	0	0
<i>Состояние внутренних органов</i>				
Число обследованных плодов	60	60	107	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0
	%	0	0	0

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

ЛЛЛФ борхлорина: в 4 раза у крыс-самок, получавших препарат в ТД и спаренных с интактными

самцами, по сравнению с контрольными животными; у крыс-самок, получавших препарат в 10 ТД

Таблица 7. Результаты патологоанатомического исследования плодов на тератогенное действие, полученных от неинбредных крыс-самок после введения лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина

Показатель		Самки			Интактный контроль
		Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
<i>Внешний осмотр плодов</i>					
Число обследованных плодов		165	122	212	238
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0
<i>Состояние костной системы</i>					
Число обследованных плодов		82	61	106	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0
<i>Состояние внутренних органов</i>					
Число обследованных плодов		83	61	106	119
Число плодов с аномалиями развития	абс.	0	0	0	0
	%	0	0	0	0

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза.

Таблица 8. Результаты изучения эмбриотоксического действия лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина на неинбредных крысах-самках

Показатель	Самки			Интактный контроль
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Количество беременных самок	15	17	20	19
Количество желтых тел*	10,8	12,1	10,3	12,3
Количество мест имплантации*	11,5	12,1	11,1	12,5
Количество живых плодов*	11,0	7,2	10,6	11,9
Количество резорбций	4	2	1	1
Количество мертвых плодов	30	27	3	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	0	40,0	4,5	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	5,3 ± 1,7	5,6 ± 1,8	6,6 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)	38,0 ± 8,9	39,0 ± 10,0	40,0 ± 9,7	40,0 ± 5,9

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. *Среднее количество на 1 беременную самку.

и спаренных с интактными самцами, количество резорбций плодов практически не отличалось от значений контрольных животных (табл. 8, 9).

Процент постимплантационной гибели плодов у интактных крыс-самок, спаренных с самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, был практически одинаков и составлял 11,2 и 8 % соответственно, что более

чем в 2–2,5 раза превышало процент постимплантационной гибели плодов контрольных животных. Установлена высокая постимплантационная гибель плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами. Процент постимплантационной гибели плодов у животных в этой группе составлял 40 %. Постимплантационная гибель плодов

Таблица 9. Результаты изучения эмбриотоксического действия лиофилизированной липосомальной лекарственной формы борхлорина на небредных крысах-самцах

Показатель	Самцы			Интактный контроль
	Σ доза ТД	Σ доза 10 ТД	NaCl	
Количество беременных самок	15	13	20	19
Количество желтых тел*	7,9	7,2	8,6	12,3
Количество мест имплантации*	8,9	10,0	11,0	12,5
Количество живых плодов*	7,9	9,2	10,7	11,9
Количество резорбций	5	1	0	1
Количество мертвых плодов	15	1	0	0
Предимплантационная гибель (%)	0	0	0	0
Постимплантационная гибель (%)	11,2	8,0	2,7	4,8
Средняя масса тела плодов при вскрытии (г)	6,1 ± 1,9	6,5 ± 1,9	6,8 ± 1,3	7,1 ± 1,2
Краниокаудальный размер (мм)	37,0 ± 8,9	39,0 ± 7,1	39,0 ± 6,9	40,0 ± 5,9

Примечание. NaCl – 0,9 % раствор хлорида натрия; ТД – терапевтическая доза. *Среднее количество на 1 беременную самку.

у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в дозе, соответствующей ТД, отсутствовала. Процент постимплантационной гибели плодов у крыс-самок, получавших ЛЛЛФ борхлорина в дозе, соответствующей ТД, не отличался от контрольных значений (табл. 8, 9).

Установлено отсутствие предимплантационной гибели плодов у животных во всех изученных группах (см. табл. 8, 9).

Заключение

ЛЛЛФ борхлорина при ежедневном в/в введении крысам-самцам в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, влияет на репродуктивную функцию самцов по критериям оценки мужской фертильности, вызывая снижение способности к оплодотворению и зачатию и постимплантационную гибель плодов (индексы способности к оплодотворению и зачатию 75 и 65 %, постимплантационная гибель плодов 11,2 и 8 % соответственно).

ЛЛЛФ борхлорина при ежедневном в/в введении крысам-самкам в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, влияет на репродуктивную функцию самок по критериям оценки женской фертильности, вызывая снижение способности к оплодотворению и зачатию и дозозависимую постимплантационную гибель плодов (индексы способности к оплодотворению и зачатию 75 и 85 % соответственно). Препарат вызывает постимплантационную гибель плодов только у крыс-самок, получавших препарат в суммарной дозе 10 ТД (40 %).

ЛЛЛФ борхлорина при ежедневном в/в введении крысам-самцам и крысам-самкам в суммарных

дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, не вызывает предимплантационную гибель плодов.

Физическое развитие потомства, родившегося от интактных самок, оплодотворенных крысами-самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и от интактных самцов, спаренных с крысами-самками, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, практически не отличалось от физического развития потомства контрольных животных.

Скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания у потомства, родившегося от интактных самок, оплодотворенных крысами-самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и от интактных самцов, спаренных с крысами-самками, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, не отличалась от скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов потомства контрольных животных.

Наружный осмотр плодов, исследование головного мозга, скелета и внутренних органов плодов не выявил тератогенного действия ЛЛЛФ борхлорина во всех изученных дозах.

ЛЛЛФ борхлорина обладает эмбриотоксическим действием, вызывая постимплантационную гибель плодов у интактных самок, оплодотворенных крысами-самцами, получавшими ЛЛЛФ борхлорина в суммарных дозах, соответствующих ТД и 10 ТД, и у крыс-самок, получавших препарат только в суммарной дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами.

Таким образом, по результатам проведенных исследований установлено, что ЛЛЛФ борхлорина обладает повреждающим действием на репродуктивную функцию самцов и самок и внутриутробное развитие плодов (эмбриотоксичность) неинбредных крыс по индексу способности к оплодотворению и зачатию и по индексу постимплантационной гибели плодов. Постимплантационная гибель плодов

в наибольшей степени (40 %) выражена у самок, получавших препарат в суммарной дозе, соответствующей 10 ТД, и спаренных с интактными самцами. ЛЛЛФ борхлорина не вызывает предимплантационную гибель плодов, не оказывает тератогенного действия, влияния на физическое развитие потомства и скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания потомства.

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

1. Методические рекомендации по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств. Вестник Фармакологического Комитета 1998;1:13–20.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 87–100.
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. С. 80–93.

СПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК БЕСПИГМЕНТНОЙ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ MEL Ibr/BRAF⁺ И ЕЕ СУБКЛОНА К РОСТУ У ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ BALB/C NUDE ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ

Н.В. Андропова, Л.Ф. Морозова, Н.М. Сураева, А.А. Лушникова, Д.В. Филоненко,
С.М. Ситдикова, И.Н. Михайлова, Е.М. Трещалина

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

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Введение. Лекарственная чувствительность метастатической меланомы кожи (МК) относительно невысока и связана, в том числе, с различной способностью к меланогенезу. Чаще всего (70 % случаев) зависимые от RAF/MEK/ERK сигнального пути терапевтически значимые мутации BRAF обнаруживаются именно в беспигментной МК. В коллекции линий клеток меланомы человека ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России имеется культура беспигментной МК линии mel Ibr/BRAF⁺ и ее различные субклоны, в том числе mel Ibr EE/BRAF⁺, пригодные для создания моделей *in vivo*, необходимых для завершающего этапа доклинического изучения перспективных антимеланомных средств. Адаптация исходной линии и ее субклона направлена на получение такой модели.

Цель исследования — адаптация клеток беспигментной МК человека линии mel Ibr/BRAF⁺ и ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺ к росту у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при подкожной (п/к) имплантации.

Задачи. Верификация мутации BRAF-V600E в клетках изученных МК; определение числа удвоений клеток для расчета прививочной дозы *in vivo*; оценка прививаемости клеток мышам Balb/c nude при п/к имплантации; изучение динамики роста измеряемых п/к опухолевых узлов у мышей Balb/c nude.

Материалы и методы. Для адаптации использованы стабильно перевиваемая клеточная линия беспигментной МК человека mel Ibr/BRAF⁺ и клетки субклона mel Ibr EE/BRAF⁺, прошедшие более 30 пассажей в той же среде со сниженным до 5 % содержанием телячьей эмбриональной сыворотки. Мутацию V600E в экзоне 15 гена BRAF определяли, выделяя геномную ДНК из 3-суточной клеточной культуры с помощью набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» по инструкции производителя (ООО «НекстБио», Россия). Для поиска соматических мутаций в экзоне 15 гена BRAF использовали полимеразную цепную реакцию с соответствующими праймерами. Прививочная доза каждого инокулята была выбрана с учетом числа удвоений клеток, которое определяли по отношению количества выросших клеток к количеству рассеянных клеток 1 пассажа. Прививаемость клеток оценивали пальпаторно под визуальным контролем, а динамику роста измеряемых п/к опухолевых узлов — с помощью морфометрии.

Результаты. Показано, что скорость пролиферации клеток исходной линии беспигментной МК человека mel Ibr/BRAF⁺ в 2 раза меньше, чем у ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺: за 72 ч число удвоений составляет 3 против 6. При имплантации линии mel Ibr/BRAF⁺ в максимальной для *in vivo* прививочной дозе 1×10^7 клеток на мышь полная прививаемость не достигнута: опухоль появилась у 1 из 2 мышей. При имплантации субклона mel Ibr EE/BRAF⁺ в прививочной дозе 3×10^6 клеток на мышь прививка состоялась у всех 3 мышей, прививаемость составила 100 %. Измеряемые п/к опухолевые узлы изученных МК увеличивались с различной динамикой: в случае mel Ibr/BRAF⁺ без прогрессивного роста, размер солидного узла составил 120 мм³, а в случае mel Ibr EE/BRAF⁺ 1-й пассаж при коротком латентном периоде (5 дней) дал прогрессивно увеличивающиеся до более чем 20-кратного размера опухолевые узлы с устойчивым экспоненциальным ростом.

Заключение. Адаптационные характеристики к росту *in vivo* отсутствуют у МК линии mel Ibr/BRAF⁺ и ярко выражены у клеток ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺, что свидетельствует о его пригодности для получения солидной опухоли у мышей Balb/c nude без предварительного пассирования на мышах. Полученную модель можно рекомендовать для оценки эффективности многократной цитостатической терапии, направленной в том числе и на мутацию BRAF-V600E и стволовые опухолевые клетки.

Ключевые слова: беспигментная меланома человека, линия клеток mel Ibr/BRAF⁺, субклон mel Ibr EE/BRAF⁺, прививаемость, динамика роста опухоли

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-60-65

ABILITY TO THE GROWTH INTO IMMUNODEFICIENT BALB/C NUDE MICE
AFTER SUBCUTANEOUS IMPLANTATION OF HUMAN AMELANOTIC MELANOMA SKIN CELL LINE MEL
IBR/BRAF⁺ AND ITS SUBCLONE

*N.V. Andronova, L.F. Morozova, N.M. Suraeva, A.A. Lushnikova, D.V. Filonenko, S.M. Sittikova, I.N. Mihailova, H.M. Treshalina
N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow 115478, Russia*

Introduction. Drug sensitivity of metastatic skin melanoma (SM) is rather low and bound, including, with various ability to a melanogenesis. Most often (70 %) dependent on RAF/MEK/ERK of an signal pathway therapeutic significant BRAF of a mutation are found in the amelanotic SM. In the N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia collection of human melanoma cell lines is a culture of amelanotic SM mel Ibr/BRAF⁺ and its various subclones, including, subclone mel Ibr EE/BRAF⁺ suitable for creation of the models in vivo that are necessary for the final stage of preclinical studying perspective antimelanoma agents. Adaptation to the in vivo growth of these cell cultures is directed to receiving such model.

Objective. Adaptation of the cell cultures of these SM to the growth at immunodeficient Balb/c nude mice by the subcutaneous implantation. There were a few positions: BRAF-V600E mutation verification in the cells; definition of number of cell doublings for calculation of an implanted dose for in vivo; implantation ability of SM cells into the Balb/c nude mice by s. c. inoculation; investigation of growth dynamics of measured s. c. tumor nodules in Balb/c nude mice.

Materials and methods. For adaptation are used stable transplanted human SM cell of mel Ibr/BRAF⁺ and the its subclone of mel Ibr EE/BRAF⁺ which passed more than 30 passages in the same environment with the reduced content up to 5 % of fetal serum veal. V600E mutation in an exon of the 15 gene of BRAF was defined in SM cells, emitting genomic DNA from 3-day cell culture by means of the «AmplifyPrime® DNA-sorb-V» set according to the instruction of the producer (NexBio Ltd., Russia). For searching of somatic mutations in an exon of the 15 gene of BRAF used polymerase chain reaction with the corresponding primers. Calculation of a implanted cell dose of each of SM cells is defined according to number of doubling cells, determined at cultivation by the relation of number of the dispelled cells which grew to quantity at a passage. The transplantable ability of the cells was controlled by hands and vision observation, the characteristics of the growth of subcutaneous tumor nodules with calculating of its dynamics was controlled by a morphometry.

Results. It was shown, that proliferation level of mel Ibr/BRAF⁺ was a twice less than at its subclone mel Ibr EE/BRAF⁺: in 72 h the number of doubling makes 3 against 6. At implantation of the mel Ibr/BRAF⁺ in the maximal for in vivo inoculated dose of 1×10^7 cells on mouse the complete transplantable ability was not reached, the tumor left at 1 of 2 mice. At implantation of a subclone of mel Ibr EE/BRAF⁺ in a vaccinating dose 3×10^6 cells on a mouse the inoculation took place at all 3 mice, 100 % transplantable ability was achieved. Measured s. c. tumor nodules of the studied melanomas grew with various dynamics, in case of mel Ibr/BRAF⁺ without malignant progressive, during of 3 weeks after tumor inoculation a volume of solid tumor nodule was only 120 mm³. In case of subclone mel Ibr EE/BRAF⁺ of 1st passage at the short latent period (5 days) gave the tumor nodules which are progressively increasing to more 20-fold size with steady exponential study.

Conclusion. Adaptation characteristics to the in vivo growth are absent at the mel Ibr/BRAF⁺ line and are brightly expressed for cells of a subclone of mel Ibr EE/BRAF⁺ that testifies to its suitability for receiving a solid tumor at Balb/c nude mice without preliminary browning on mice. The received model can be recommended for assessment of effectiveness of multiple cytostatic therapy, including for BRAF-V600E mutation.

Keywords: human amelanotic melanoma of skin, cell cultures, mel Ibr/BRAF⁺, subclone mel Ibr EE/BRAF⁺, transplanted ability, tumor growth dynamics

Введение

В России меланома кожи (МК) относительно мало распространена, однако за 2007–2012 гг. абсолютное число заболевших увеличилось на 23 % среди мужчин и на 16 % среди женщин, причем 25 % впервые диагностированных опухолей уже имели метастазы [1]. Анализ базы данных Национального института рака США (Surveillance, Epidemiology and End Results program, 2006–2010) показывает, что средний возраст пациентов на момент постановки диагноза составляет 61 год [2].

Лекарственная чувствительность метастатической МК относительно невысока и связана с поликлональным характером и прогрессивным ростом клеточной популяции, полиорганым метастазированием и раз-

личной способностью к меланогенезу [3]. Открытые в последние годы молекулярные мишени для таргетной терапии МК (BRAF, NRAS, C-KIT, CTLA4 и др.) улучшили терапевтическую ситуацию, однако в меньшей степени для беспигментной (амеланотической) МК [4, 5]. В МК многочисленные механизмы накопленных мутаций сопряжены с активацией синтеза молекул адгезии (E- и N-кадгерина, α - и β -интегрин, β -катенина, мутации гена рецептора к меланокортину-1 MC1R), поддерживающих процесс канцерогенеза [6].

Тем не менее известно, что терапевтически значимые мутации BRAF, зависимые от сигнального пути RAF/MEK/ERK, обнаруживаются в 70 % случаев именно в беспигментной МК, причем в 89 %

из них опухоль имеет толщину менее 1 мм [7]. Уровень смертности составляет почти 80 %, что обусловлено высоким метастатическим потенциалом опухоли и низким уровнем диагностики именно беспи́гментных форм заболевания. В случае наиболее инкурабельной узловой МК это иллюстрируют данные гистологии на фоне малоинформативной цитологии. Показано, что только гистологическое исследование способно выявить умеренно полиморфные опухолевые меланоциты с ядрами и узким ободком розовой цитоплазмы, а также субэпидермальный (инфильтративный) рост атипичных меланоцитов в виде крупноальвеолярных скоплений в беспи́гментной МК [8]. В результате наших предварительных исследований сделано предположение о наличии признаков стволовых клеток у полученного субклона.

Перечисленные факторы позволяют считать перспективной разработку новых антимеланомных лекарственных средств, направленных на лечение беспи́гментной МК с мутацией BRAF. Последнее невозможно без создания адекватных моделей этой опухоли *in vitro/in vivo*. В недавно созданной коллекции линий клеток меланомы человека, полученных и охарактеризованных в ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н. Н. Блохина) Минздрава России, представлены разнообразные культуры МК, пригодные для исследований *in vitro* [9].

Адаптация линий беспи́гментной МК с терапевтически значимой мутацией BRAF-V600E к росту у иммунодефицитных мышей направлена на создание моделей *in vivo*, необходимых для завершающего этапа доклинического изучения перспективных антимеланомных средств [10, 11].

Целью исследования была адаптация клеток беспи́гментной BRAF-положительной МК человека линии mel Ibr/BRAF⁺ (исходная линия) [12–14] и ее субклона mel Ibr EE/BRAF⁺ [15], клетки которого обладали еще и признаками стволовых опухолевых клеток, к росту у иммунодефицитных мышей Balb/c nude при подкожной (п/к) имплантации.

Задачи: верификация мутации BRAF-V600E в клетках изученных МК; определение числа удвоенных клеток для расчета прививочной дозы *in vivo*; оценка прививаемости клеток МК мышам Balb/c nude при п/к имплантации; изучение динамики роста измеряемых п/к опухолевых узлов у мышей Balb/c nude.

Материалы и методы

В работе использована стабильно перевиваемая клеточная линия МК человека mel Ibr/BRAF⁺, полученная из опухолевого образца метастатического узла пациентки с диссеминированной МК.

Клетки из посевного банка после 30-го пассажа культивировали в среде RPMI-1640 с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой (ТЭС), 2 ммоль L-глутамин, гентамицин, пирувата натрия, комплекса аминокислот и витаминов в разведении 1:1000 стандартных концентраций этих препаратов, выпускаемых фирмой «ПанЭко» (Россия). Клетки наращивали в инкубаторе при +37 °С в атмосфере 5 % CO₂ [12].

Субклон mel Ibr EE/BRAF⁺ получен указанным ранее методом [15]. Клетки субклона mel Ibr EE/BRAF⁺, прошедшие более 30 пассажей в той же среде со сниженным до 5 % содержанием ТЭС, использованы в качестве имплантата.

Динамику роста *in vitro* отслеживали по скорости удвоения клеток каждой культуры за фиксированный период времени. Клетки с одинаковой плотностью рассеивали по 1×10^4 и одновременно культивировали в лунках. Через 72 ч подсчитывали прирост клеток. Монослой клеток в лунках обрабатывали раствором Версена, ресуспендировали в 100 мкл ростовой среды и добавляли 100 мкл 0,2 % раствора трипанового синего. В полученном объеме подсчитывали абсолютное количество клеток в лунках по стандартному методу, используя камеру Горяева под световым микроскопом. Число удвоений ($2n$) определяли по отношению количества выросших клеток (ВК) к количеству клеток, рассеянных (ПК) при пассаже: $2n = \text{ВК}/\text{ПК}$.

Мутацию V600E в экзоне 15 гена *BRAF* в клетках определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на матрице геномной ДНК, выделенной из 3-суточной клеточной культуры с помощью набора «АмплиПрайм® ДНК-сорб-В» по инструкции производителя (ООО «НекстБио», Россия). Для поиска соматических мутаций в экзоне 15 гена *BRAF* использовали следующие праймеры:

BRAF_Ex15BR_For 5'-СТАСТГТТТТСТТТАСТТАСАС-3'
BRAF_Ex15BR_Rev 5'-АТССАГАСААСТГТТCAAАСТГАТГ-3'.

Реакцию амплификации проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 20 нг ДНК, 2,5 Ед Taq-полимеразы, буфер для ПЦР, 3 ммоль хлорида магния, по 200 мкмоль каждого из 4 нуклеотидтрифосфатов, по 0,3 пмоль прямого и обратного праймеров и стерильную деионизированную воду до 25 мкл. Использовали следующий режим ПЦР: 5 мин при +94 °С, затем 35 циклов амплификации (денатурация – 30 с при +94 °С, отжиг праймеров – 30 с при +60 °С, элонгация – 30 с при +72 °С) и финальная элонгация 5 мин при +72 °С.

После разделения в 2 % агарозном геле полоску, соответствующую последовательности экзона 15 гена *BRAF* длиной 173 пары нуклеотидов (рис. 1), вырезали из геля и выделяли из нее ДНК с помощью набора Wizard®PCR Preps DNA Purification System,

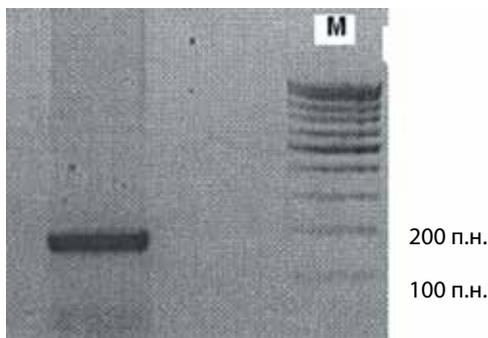


Рис. 1. Анализ продукта полимеразной цепной реакции, соответствующего последовательности экзона 15 гена *BRAF*, в агарозном геле. *M* – маркер молекулярного веса

(Promega, США). Затем ПЦР-продукт секвенировали на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США) по протоколам фирмы-производителя. Для анализа результатов ПЦР использовали компьютерные программы Chromas или GeneMapper. Ранее о наличии мутации *BRAF*-V600E в клетках МК *mel Ibr* и ее субклона *mel Ibr EE* не сообщалось.

Для исследований *in vivo* использовали половозрелых иммунодефицитных мышей *Balb/c nude* в возрасте 6–8 нед, обоего пола, конвенционального содержания [16].

Расчет прививочной дозы каждого инокулята определен в соответствии с числом удвоений, которое определяли эмпирически в соответствии с соотношением количества выросших к количеству рассеянных клеток 1 пассажа ($2n = BK/PK$) [17]

Имплантат в виде отмытых от культуральной среды 0,9 % раствором натрия хлорида клеток (пассаж 0), которые помещали в питательную среду № 199, вводили п/к мышам ($n = 2-3$) по стандартной методике в расчетных прививочных дозах в 0,2 мл питательной среды № 199 [18].

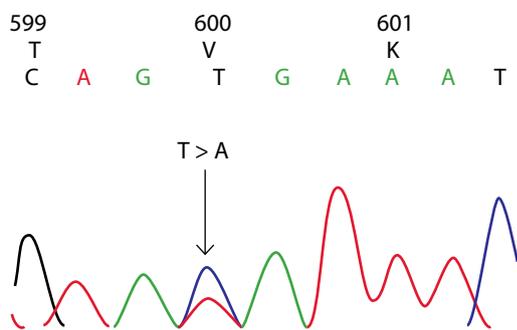


Рис. 2. Анализ мутации *BRAF*-V600E в клетках беспигментной меланомы кожи человека линии *mel Ibr* и ее субклона *mel Ibr EE/BRAF*⁺: мутация 1799T > A, приводящая к замене валина (V) на глутаминовую кислоту (E) в кодоне 600 (V600E, триплет GTG → GAG), показана стрелкой

Прививаемость клеток оценивали пальпаторно под визуальным контролем, динамику роста опухолевых узлов под кожей у мышей – с помощью морфометрии. Измеряли индивидуальный (V_0 , V_t) и вычисляли средний объем (V_{cp}) опухоли, а также скорость роста, которую определяли по соотношению средних величин V_t/V_0 в малочисленных группах; об экспоненциальной фазе роста судили по $V_t/V_0 \geq 3,0$.

Все манипуляции с имплантацией клеток МК человека выполняли под ламинаром (Lamsystems LS 240.120.00, Россия) с соблюдением асептики и антисептики. Манипуляции с лабораторными животными выполняли с соблюдением требований гуманного обращения, принятых в России [19, 20].

Результаты

В результате ПЦР на матрице геномной ДНК, выделенной из клеток беспигментной МК человека линии *mel Ibr* и ее субклона *mel Ibr EE/BRAF*⁺, была выявлена мутация 1799T > A, приводящая к замене валина на глутаминовую кислоту в кодоне 600 (V600E) (рис. 1, 2).

Определение числа удвоений показало, что за 72 ч клетки линии *mel Ibr/BRAF*⁺ прошли 3 удвоения, а клетки субклона *mel Ibr EE/BRAF*⁺ – 6 удвоений. Соответственно для имплантации мышам клеток *mel Ibr/BRAF*⁺ была рекомендована максимальная *in vivo* прививочная доза 1×10^7 клеток на мышь, а для имплантации клеток субклона *mel Ibr EE/BRAF*⁺ – достаточно небольшая прививочная доза 3×10^6 клеток на мышь.

Прививаемость клеток линии *mel Ibr/BRAF*⁺

После имплантации 1×10^7 клеток (пассаж 0) у 1 из 2 мышей на 12-е сутки (латентная фаза) появилась пальпируемая опухоль, которая к 20-м суткам роста достигла объема (V) 120 мм³ (стабильная фаза). Повторная трансплантация была невозможна из-за недостатка опухолевого материала. Таким образом, неполная прививаемость этой линии клеток с длительным развитием относительно небольшого п/к узла свидетельствует об отсутствии адаптации к росту *in vivo* при использованной прививочной дозе.

Прививаемость клеток субклона *mel Ibr EE/BRAF*⁺

После имплантации 3×10^6 клеток (пассаж 0) мышам ($n = 3$) на 5-е сутки (латентная фаза) у всех мышей появились опухолевые узлы диаметром 2–3 мм (пассаж 1). На 8-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_0) 16, 25 и 70 мм³ ($V_{cp} = 37$ мм³). На 12-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_t) 60, 144 и 324 мм³ ($V_{cp} = 176$ мм³), скорость роста (V_t/V_0) составила 4,8, что свидетельствует о начале экспоненциальной фазы с прогрессивным увеличением объема более

Таблица 1. Прививаемость клеток беспигментной меланомы кожи человека субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* при подкожной имплантации мышам *Balb/c nude*

Показатели роста*	Объем опухолевого узла (мм ³) на сутки после имплантации (пассаж 1)			
	8	12	17	21
V_{cp}	37	176	654	1085
V_t/V_0	1,0	4,8	17,7	29,3

Примечание. *В малочисленных группах разброс не определяли.

Таблица 2. Динамика роста опухолевых узлов субклона меланомы человека *mel Ibr EE/BRAF⁺* при подкожной имплантации мышам *Balb/c nude*

Линия меланомы	Число клеток на мышь	Число мышей	Число мышей с опухолями на 12-й день	Латентный период (дни)
<i>mel Ibr/BRAF⁺</i>	1×10^7	2	1	11
<i>mel Ibr EE/BRAF⁺</i>	3×10^6	3	3	5

чем в 3 раза за 4 дня. На 17-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_t) 270, 672 и 1020 мм³ ($V_{cp} = 654$ мм³), скорость роста (V_t/V_0) составила 17,7; на 21-е сутки роста опухолевые узлы мышей достигли объемов (V_t) 540, 1120 и 1596 мм³ ($V_{cp} = 1085$ мм³), скорость роста (V_t/V_0) составила 29,3. Увеличение объема более чем в 10 раз в течение 5 дней свидетельствует о пике экспоненциальной фазы роста (табл. 1, 2).

Заключение

Известно, что лекарственная чувствительность метастатической МК относительно невысока и связана, в том числе, с различной способностью к меланогенезу. Чаще всего (70 % случаев) зависимые от RAF/MEK/ERK сигнального пути терапевтически значимые мутации BRAF обнаруживаются именно в беспигментной МК. В коллекции линий клеток меланомы человека ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохи-

на» Минздрава России имеется культура беспигментной *mel Ibr/BRAF⁺* и ее различные субклоны, в том числе *mel Ibr EE/BRAF⁺*, обладающие свойствами стволовых опухолевых клеток и пригодные для создания моделей *in vivo*, необходимых для завершающего этапа доклинического изучения перспективных антимеланомных средств. Адаптация исходной линии и ее субклона направлена на получение такой модели. Целью исследования была адаптация клеток беспигментной *mel Ibr/BRAF⁺* и ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* к росту у иммунодефицитных мышей *Balb/c nude* при п/к имплантации.

Результаты исследования показали, что скорость пролиферации клеток исходной линии беспигментной МК человека *mel Ibr/BRAF⁺* в 2 раза меньше, чем у ее субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*: за 72 ч число удвоений составляет 3 против 6. При имплантации линии *mel Ibr/BRAF⁺* в максимальной для *in vivo* прививочной дозе 1×10^7 клеток на мышь полная прививаемость не достигнута. При имплантации субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* в прививочной дозе 3×10^6 клеток на мышь прививка состоялась у всех 3 мышей, прививаемость составила 100 %. Измеряемые п/к опухолевые узлы *mel Ibr/BRAF⁺* не достигли прогрессивного роста, а 1-й пассаж субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* дал высокую прогрессию с устойчивым экспоненциальным ростом и короткой латентной фазой.

Таким образом, адаптационные характеристики к росту *in vivo* отсутствуют у линии *mel Ibr/BRAF⁺* и ярко выражены у клеток субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺*, что свидетельствует о его пригодности для получения солидной опухоли у мышей *Balb/c nude* без предварительного пассирования на мышах. По нашему мнению, намного больший объем и более высокая скорость роста узлов, при меньшей в 3 раза дозе имплантированных клеток субклона *mel Ibr EE/BRAF⁺* по сравнению с исходной линией, связаны с наличием в данном субклоне большего числа клоногенных клеток, что еще раз подтверждает их причастность к стволовым опухолевым клеткам. Полученную модель можно рекомендовать для оценки эффективности многократной цитостатической терапии, направленной в том числе и на мутацию BRAF-V600E.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Давыдов М.И., Аксель Е.М. Статистика злокачественных новообразований в России и странах СНГ в 2012 году. М.: Издательская группа РОНЦ, 2014. 226 с.
2. Howlader N., Noone A.M., Krapcho M. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2010. Bethesda: National Cancer Institute, 2012. DOI: 10.3322/саас.21262.
3. Демидов Л.В., Утяшев И.А., Харкевич Г.Ю. Подходы к диагностике и терапии меланомы кожи: эра персонализированной медицины. Consilium medicum (приложение) 2013;2–3:42–7.
4. Chakraborty R., Wieland C.N., Comfere N.I. Molecular targeted therapies in metastatic melanoma. Pharmgenomics

- Pers Med 2013;6:49–56.
DOI: 10.2147/PGPM.S44800.
PMID:23843700.
5. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Лушников А.А. и др. Спектр мутаций онкогенов различается в субтипах меланомы кожи. Молекулярная биология 2015;49(6):1022–9.
 6. Фицпатрик Т., Джонсон Р., Вульф К. и др. Дерматология. Атлас-справочник. Пер. с англ. М.: Практика, 1999. С. 385–391.
 7. Мазуренко Н.Н. Генетические особенности и маркеры меланомы кожи. Успехи молекулярной биологии 2014;2:26–35.
 8. Снарская Е.С., Аветисян К.М., Андрюхина В.В. Беспигментная узловатая меланома кожи голени. Российский журнал кожных и венерических болезней. Дерматоонкология 2014;2:4–7.
 9. Коллекция клеточных линий меланомы человека. Под ред. И.Н. Михайловой, А.Ю. Барышников. М.: Издательская группа РОНЦ, 2016. 109 с.
 10. Walker G.J., Soyer H.P., Terzian T., Voh N.F. Modelling melanoma in mice. Pigment Cell Melanoma Res 2011;24(6):1158–76.
DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00923.x.
PMID: 21985222.
 11. Андрюхина Н.В., Морозова Л.Ф., Михайлова И.Н. и др. Моделирование подкожного ксенографта меланомы кожи человека mel Cher с мутацией V600E BRAF на иммунодефицитных мышцах для доклинического изучения таргетных противоопухолевых средств. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(4):58–64.
 12. Михайлова И.Н., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф. и др. Клеточная линия меланомы человека mel Ibr, используемая для получения противоопухолевых вакцин. Патент РФ № 2287576, 2006.
 13. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бутова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. Сибирский онкологический журнал. Лабораторные и экспериментальные исследования 2010;1(37):29–39.
 14. Голубцова Н.В., Степанова Е.В., Бармашов А.Е. и др. Определение специфических противоопухолевых антигенов у больных диссеминированной меланомой в процессе вакцинотерапии. Российский биотерапевтический журнал 2012;3(11):25–7.
 15. Сураева Н.М., Морозова Л.Ф., Самоилов А.В. и др. Изменение морфологических и иммунологических характеристик клеток меланомной линии (mel Ibr) в результате воздействия куринового эмбрионального экстракта. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2015;159(4):521–4.
 16. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Возможности использования. М.: Издательская группа РОНЦ, 2010. 16 с.
 17. Гаврилов Л.А., Гаврилова Н.С. Поиск механизмов, определяющих продолжительность жизни. Предел клеточных делений – ключ к механизму детерминации продолжительности жизни? В кн.: Биология продолжительности жизни. М.: Наука, 1991. С. 183–194.
 18. Трещалина Е.М., Андрюхина Н.В., Гарин А.М. Доклиническое изучение противоопухолевых препаратов. В кн.: Рациональная фармакотерапия. М.: Литтерра, 2015. С. 75–82.
 19. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург, 1985. Ланималогия 1993;1:29.
 20. Большаков О.П. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. ВОЗ, 2000. Рекомендации комитетам по этике, проводящим экспертизу биомедицинских исследований. Качественная клиническая практика 2002;9:1–15.
PMID: 27296126.

ВОВЛЕЧЕНИЕ АУТОФАГИИ В ВАСКУЛОГЕННУЮ МИМИКРИЮ ПРИ МЕЛАНОМЕ

А.А. Варганян, О.С. Булова, И.В. Уласов, М.А. Барышникова

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

Контакты: Амалия Арташевна Варганян zhivotov57@mail.ru

Введение. Аутофагия — катаболический процесс удаления отработанных органелл, долгоживущих белков, патогенов и продуктов распада с помощью двумембранных фагосом — сопровождает жизнедеятельность нормальной клетки на протяжении всего времени ее существования. Аутофагия обеспечивает выживание клетки в условиях стресса, играет существенную роль в защите от инфекций, в развитии аутоиммунных процессов. В последние годы получены доказательства существования альтернативной системы кровоснабжения опухоли — васкулогенной мимикрии (ВМ), которая может частично компенсировать недостаток питания и кислорода в условиях гипоксии.

Цель исследования — выявление взаимосвязи между аутофагией и ВМ.

Материалы и методы. В работе были использованы 2D- и 3D-культивирование клеток меланомы, выведенных в клеточную линию из операционного материала больных диссеминированной меланомой, электрофорез и вестерн-блот, нокдаун генов с помощью малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siRNA), проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

Результаты. О базовом уровне аутофагии в клетках меланомы судили по экспрессии LC-3B и флуоресценции монодансилкадаверина. Оба теста являются маркерами поздней стадии аутофагии. Нами показано, что в клетках меланомы, формирующих сосудистоподобные структуры (СПС) на матригеле, базовый уровень аутофагии был значительно выше, чем в клетках меланомы, не способных участвовать в ВМ. Блокирование аутофагии 3-метиладенином (3-methyladenine, 3-МА) или хлорокином — ингибиторами инициации и терминальной фазы аутофагии — приводило к заметному снижению способности клеток меланомы участвовать в ВМ. Полученные результаты были подтверждены siRNA-опосредованным подавлением экспрессии гена *VECN1*, участвующего в инициации аутофагии, и гена *ATG5*, который считается маркером поздней необратимой стадии аутофагии. Нокдаун генов *VECN1* или *ATG5* в клетках меланомы *mel P* снижал уровень белка *Beclin-1* и *Atg5* на 70–75 % и блокировал формирование СПС на матригеле. Клетки меланомы с нокдауном гена *ATG5* меняли форму с веретеноподобной на шаровидную, но сохраняли способность мигрировать и узнавать друг друга, формирование СПС не наблюдалось. Низкомолекулярный ингибитор ВМ, ЛХС-1269, заметно снижал базовый уровень аутофагии.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация аутофагии является необходимым условием формирования СПС. Мы предполагаем, что аутофагия обеспечивает прогрессию опухоли 2 путями: способствуя выживанию опухолевых клеток при химио- и радиотерапии и стимулируя процесс формирования васкулярных каналов, доставляющих питание и кислород в области опухоли с гипоксией.

Ключевые слова: меланома, аутофагия, васкулогенная мимикрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-66-73

THE INVOLVEMENT OF AUTOPHAGY IN MELANOMA VASCULOGENIC MIMICRY

A.A. Vartanian, O.S. Burova, I.V. Ulasov, M.A. Baryshnikova

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

Introduction. Autophagy, a catabolic process of protein and organelle recycling by transferring defective cytoplasm and organelles into double-membraned vesicles to degrade and regenerate materials, plays a critical role in maintaining energy homeostasis. Autophagy also protects against stress and infection, participates at the development of autoimmune disease. In recent years, the existence of alternative blood circulation system in tumors, vasculogenic mimicry (VM), which can partially compensate the lack of nutrients and oxygen under the hypoxic conditions, has been described.

Objective. To elucidate the relationship between autophagy and VM.

Materials and methods. In this study we used 2D- and 3D-culturing of melanoma cells derived from surgical species of patients with disseminated melanoma, electrophoresis and western blot, knockdown of the genes by using small interfering RNA (siRNA), flow cytometry, fluorescence microscopy.

Results. We detected the basal level autophagy by examining the expression of autophagy-specific protein (LC-3B) by flow cytometry and cellular immunofluorescence staining by monodancylcadaverine. Both assays are the markers of autophagy late stage. Here we

show that the level of autophagy in melanoma cells *mel P*, participated in capillary-like structures (CLS) formation in matrigel, was considerably higher than in *mel Me* cells which do not involve in VM. To explore the function of autophagy in the ability of melanoma cells to form CLS 3-methyladenine (3-MA) or chloroquine – inhibitors of initiation and terminal stage of autophagy – were used. Both inhibitors reduced the ability of melanoma cells to engage in VM. The data obtained were confirmed by siRNA-mediated gene silencing of *BECN1* involved in the initiation of autophagy and *ATG5* gene which is considered to be a marker of late stage of autophagy. Knock-down of *BECN1* or *ATG5* in *mel P* melanoma cells reduced the level of protein Beclin-1 and Atg5 about 70–75 %, and suppressed CLS formation in matrigel. Melanoma cells with the *ATG5* gene knockdown changed the shape but maintained the ability to migrate and recognize each other, the formation of CLS was not observed. Low molecular weight VM inhibitor LCS-1269, significantly reduced the basic level of autophagy.

Conclusion. Our data indicate that autophagy participates in CLS formation, and inhibition of autophagy suppresses CLS formation. We suggest that autophagy plays a dual role in the survival and development of tumors: autophagy helps cancer cells against environment stress and provides a temporary survival pathway by promoting energy regeneration, autophagy also promotes VM formation which supplies nutrients and oxygen to less vascularized area of tumor.

Key words: autophagy, melanoma, vasculogenic mimicry

Введение

Аутофагия – процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь ее лизосом и подвергаются в них деградации, – находится в центре научных интересов более 20 лет. Сформировавшись в ходе эволюции как реакция на дефицит питательных веществ, система аутофагии сегодня рассматривается как способ поддержания гомеостаза клетки [1, 2]. Аутофагия играет существенную роль в выживании клетки в условиях стресса, развитии аутоиммунных и воспалительных процессов. С другой стороны, аутофагия может быть древнейшей системой защиты клеток от вторжения извне, так как вместе с частью цитоплазмы могут захватываться вирусы или другие внутриклеточные паразиты.

При аутофагии *de novo* формируются специализированные структуры – фагофоры – двумембранные липидные образования, которые изолируют подлежащий уничтожению материал и расщепляют его в аутофагосоме. Аутофагосома образуется слиянием фагофор с лизосомами [3]. Благодаря аутофагии становится возможным расщепление собственных макромолекул и повторное их использование для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки. Непрерывно работающая система аутофагии поддерживает также концентрацию токсичных метаболитов клетки на безопасном уровне [4]. В опухолевых клетках аутофагия имеет патологически повышенную активность, и неэффективность химио- и радиотерапии во многом связывают с аутофагией [5, 6]. Опухолевые клетки используют аутофагию также для того, чтобы выжить в условиях гипоксии [7]. Подобные условия могут возникнуть, например, при недостаточном кровоснабжении опухоли.

По данным ряда клинических испытаний, антиангиогенные препараты достоверно увеличивают общую выживаемость онкологических больных [8].

В то же время аккумулируются данные, свидетельствующие о том, что большинство опухолей практически не отвечают на анти-VEGF терапию (anti-vascular endothelial growth factor therapy, anti-VEGF therapy – терапия, направленная на блокировку фактора роста эндотелия сосудов) [9]. Одной из причин выживаемости опухолевых клеток в условиях блокирования ангиогенеза может быть гетерогенность кровеносных сосудов. Формирование сосудов в опухоли происходит на фоне неконтролируемой митогенной стимуляции и измененного внеклеточного матрикса. Это приводит к замещению эндотелия в сосудах опухолевыми клетками, иногда эндотелиальные клетки могут и вовсе отсутствовать. Образование опухолевыми клетками васкулярных каналов, ограниченных базальной мембраной, в отсутствие эндотелиальных клеток и фибробластов получило название «васкулогенная мимикрия» (VM) [10]. Формируют васкулярные каналы опухолевые клетки с высокозлокачественным фенотипом, слабоагрессивные опухолевые клетки таких структур не формируют.

Целью настоящего исследования было получение экспериментального подтверждения существования взаимосвязи между аутофагией и VM. Мы предполагаем, что аутофагия выполняет двойную функцию в опухоли: способствует выживанию опухолевых клеток при химио- и радиотерапии, а также стимулирует процесс формирования васкулярных каналов, что может частично компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной микроциркуляторной сети.

Материалы и методы

Материалы

BECN1 siRNA (small interfering RNA – малая интерферирующая РНК) (sc-29797), *ATG5* siRNA (sc-41446), контрольная siRNA (sc-37007), siRNA Dilu-

tion Buffer (sc-29527) и антитела к Beclin-1 (sc-48341) и Atg5 (sc-133158) были получены от Santa Cruz Biotechnology (США). Липофектамин-2000 (#11668027) был приобретен у Thermo Fisher Scientific (США). Хлорокин (С6628), 3-метиладенин (3-methyladenine, 3-МА) (M9281) и монодансилкадаверин (monodansylcadaverine, MDC) (#D4008) были приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к LC-3В были получены от Abcam (ab51520) (Великобритания). Вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцеина изотиоцианатом (goat anti-rabbit IgG – козы антикроличьи иммуноглобулины класса G), были получены от AbD Serotec (Великобритания) (№ STAT121F). В работе также был использован ингибитор ВМ – ЛХС-1269 (ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России).

Культура клеток

В работе использованы клеточные линии меланомы mel P, mel II и mel Me [11]. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина. В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

3D -культура

100 мкл матригеля (8,7 мг/мл) быстро наносили на дно 24-луночного планшета на льду, планшет оставляли при комнатной температуре в течение 1 ч и затем помещали в CO₂-инкубатор на 30 мин. Клетки добавляли в количестве 2×10^5 в полной среде RPMI-1640 на гелевую матрицу и продолжали инкубировать при +37 °С в CO₂-инкубаторе. Формирование сосудистоподобной структуры (СПС), которое является *in vitro* тестом ВМ [12, 13], наблюдалось через 14–16 ч роста клеток на матригеле.

Электрофоретическое разделение белков

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле по методу Laemmli в денатурирующих условиях. Клетки после трансфекции *BECN1* siRNA или *ATG5* siRNA снимали с культуральных флаконов раствором Версена, промывали натрий-фосфатным буфером и гомогенизировали в буфере А (200 ммоль/мл маннитола, 70 ммоль/мл сахарозы, 5 ммоль/мл пиперазин-N-N»-бис-2-этансульфонової кислоты (PIPES) с рН 7,5, 1 ммоль/мл этилен-бис-оксиэтиленнитрилтетрауксусной кислоты (EGTA) и коктейль ингибиторов протеаз). Экстракт белков центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин для удаления ядер. Супернатант (цитоплазматическая фракция) иммунопреципитировали с использованием протеин А-сефарозы, конъюгированной с антителами к Beclin-1 и ATG5, в течение 2 ч при +4 °С. Далее центрифугировали при 2500 об/мин в течение 5 мин для выделения

иммунокомплекса, сорбированного на бусах протеин А-сефарозы, промывали 5 раз буфером Б, содержащим трис-буфер солевой, 20 мкмоль/мл ортованадата и коктейль ингибиторов протеаз. Образцы лизировали в буфере Laemmli кипячением в течение 4 мин на водяной бане. Белки разделяли электрофоретически при 120 В на полиакриламидном геле с 10 % додецилсульфатом натрия. Состав использованных буферных растворов: концентрирующий буфер – 0,5 моль Трис-НСl рН 6,8, 0,4 % додецилсульфата натрия; разделяющий буфер – 120 ммоль Трис, 1,25 моль глицина и 0,5 % додецилсульфата натрия; электродный (трис-глициновый) буфер – 120 ммоль Трис, 1,25 моль глицина и 0,5 % додецилсульфата натрия; буфер для нанесения образцов – 0,01 % бромфеноловый синий, 200 ммоль Трис-НСl рН 6,8, 4 % додецилсульфата натрия, 40 % глицерина, 400 ммоль β-меркаптоэтанола.

Вестерн-блот

После окончания электрофореза гель, не окрашивая, переносили электрофоретически в течение 1 ч при 80 В на мембрану (EMD Millipore, США). По окончании переноса мембрану промывали в трис-буфере солевом с 5 % альбумина сывороточного бычьего для блокирования неспецифического связывания белков. Гибридизацию проводили с первичными антителами к Beclin-1 или Atg5 в течение 2 ч при комнатной температуре при качании на шейкере. Затем промывали 3 раза по 15 мин в трис-солевом буфере с Твин-20, далее инкубировали 2 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой, и проявляли 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом/нитросиним тетразолием. Состав использованных буферных растворов: трис-солевой буфер – 390 ммоль глицина, 480 ммоль Трис-НСl рН 7,5, 1 % додецилсульфата натрия, 20 % метанола; трис-солевой буфер с Твин-20–0,1 моль Трис-НСl рН 7,5, 0,2 моль хлорида натрия, 0,1 % Твин-20; альбумин сывороточный бычий – 5 % альбумина сывороточного бычьего в трис-солевом буфере. Для количественного анализа вестерн-блота была использована программа Gel Analysis Software (Syngene, Великобритания).

Трансфекция клеток меланомы siRNA in vitro

В 24-луночный планшет засевали 50 тыс. клеток меланомы в полной среде RPMI-1640 без антибиотика. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при +37 °С в течение 18–24 ч. Предварительно готовили смесь (на каждую лунку), состоящую из 80 пмоль siRNA (1 мкг) и 1 мкл липофектамина-2000 в RPMI-1640 без антибиотика и сыворотки, и инкубировали при комнатной температуре 20 мин. Клетки меланомы 60–70 % конфлюентности промывали средой без сыворотки и антибиотика и инкубировали

ли с siRNA и липофектамино-2000 в полной среде RPMI-1640 без антибиотика в CO₂-инкубаторе при +37 °C в течение 6–8 ч. Далее среду для трансфекции заменяли свежей полной средой RPMI-1640 и клетки меланомы инкубировали еще 24–36 ч. Трансфицированные клетки использовали для исследования их способности формировать СПС.

Определение экспрессии LC-3В

Клетки меланомы (1 × 10⁶ клеток) ресуспендировали в 3 мл охлажденного 70 % спирта и хранили при +4 °C. Перед реакцией окрашивания клетки осаждали центрифугированием (7 мин, 500 об/мин). Осевшие клетки осторожно пипетировали в 1 мл натрий-фосфатного буфера, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50 мкл натрий-фосфатного буфера, содержащего поликлональные антитела к LC-3В, и инкубировали 30 мин при +4 °C в темноте. Клетки отмывали 1 мл натрий-фосфатного буфера от не связавшихся антител, ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере, содержащем вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцеина изотиоцианатом. Экспрессию LC-3В оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий.

Окрашивание клеток MDC

Клетки меланомы в течение ночи инкубировали с ингибитором аутофагии – хлорокином или ингибитором ВМ – ЛХС-1269. Утром среду замещали на свежую и добавляли 0,05 ммоль MDC в RPMI-1640 без сыворотки, инкубировали 20–30 мин при +37 °C в CO₂-инкубаторе. Далее клетки 3 раза промывали ледяным натрий-фосфатным буфером и немедленно определяли флуоресценцию на флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

Результаты и обсуждение

Опухоль для выживания и прогрессии может индуцировать частичную трансдифференцировку опухолевых клеток в эндотелийподобный фенотип, позволяющий формировать васкулярные каналы, необходимые для доставки питания и, возможно, метастазирования [10]. Исследования последних лет указывают на то, что кратковременное блокирование аутофагии существенно снижает продолжительность жизни опухолевых клеток [14]. Недавно группой китайских ученых было показано, что уровень экспрессии Beclin-1 в клетках карциномы желудка SGC7901, растущих в 3D-культуре, на матрикеле, значительно выше, чем в тех же клетках, растущих в 2D-культуре, на пластике [15]. Этими же авторами впервые высказано предположение об участии аутофагии в ВМ при раке клеток эпителиальной ткани желудка. Целью нашей работы было выявление

взаимосвязи между аутофагией и ВМ при меланоме. В работе были использованы клеточные линии метастатической меланомы кожи, выведенные из опухолевого материала пациентов, находившихся на лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, – mel P и mel II, формирующие СПС на матрикеле, и mel Me, не способная участвовать в ВМ. Об уровне аутофагии в клетках меланомы судили по изменениям, происходящих в поздней стадии аутофагии, – экспрессии LC-3В [16]. Известно, что в поздней стадии аутофагии – слиянии фагофор с лизосомами – важную роль играют белки семейства Atg [17]. Активация аутофагии сопровождается протеолитическим расщеплением белка LC-3 (Atg8) в изоформу LC-3А. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC-3В формы, которая и встраивается в мембрану аутофагосомы. В процессе формирования аутофагосомы участвует только LC-3В изоформа белка. Недавно был предложен новый метод для мониторинга аутофагии – окрашивание аутофагосом флуоресцентным красителем MDC [18]. Избирательное аккумуляирование MDC в аутофагосомах посредством специфического взаимодействия с липидами мембран аутофагосом свидетельствует о переходе аутофагии в позднюю, необратимую фазу.

На рис. 1 представлены результаты определения базового уровня аутофагии в клетках меланомы mel P и mel Me. Видно, что в клетках mel P, формирующих СПС, базовый уровень аутофагии, определенный как экспрессией LC-3В (рис. 1а, б), так и флуоресценцией MDC (рис. 1в, г), значительно выше, чем в клетках mel Me.

Более детальное исследование участия аутофагии в формировании СПС показало, что селективный ингибитор инициации аутофагии – 3-МА или ингибитор поздней стадии аутофагии – хлорокин блокируют формирование СПС клетками меланомы mel P. В предварительных исследованиях были определены концентрации обоих ингибиторов, в присутствии которых более 95 % клеток меланомы оставались живыми. Это условие является необходимым для формирования СПС на матрикеле: клетки должны быть живыми, чтобы мигрировать, узнавать друг друга, вытягиваться и формировать СПС. Клетки mel P в присутствии ингибиторов аутофагии не теряли способность мигрировать, но рисунок структур, сформированных на матрикеле, заметно отличался от геометрии классических СПС (рис. 2а–в). Представленные результаты были воспроизведены на другой клеточной линии меланомы, участвующей в ВМ, – mel II (данные не приводятся) и подтвердили выявленную закономерность: ингибиторы аутофагии блокируют формирование СПС. Для верификации этого феномена нами был осуществлен нокаун ге-

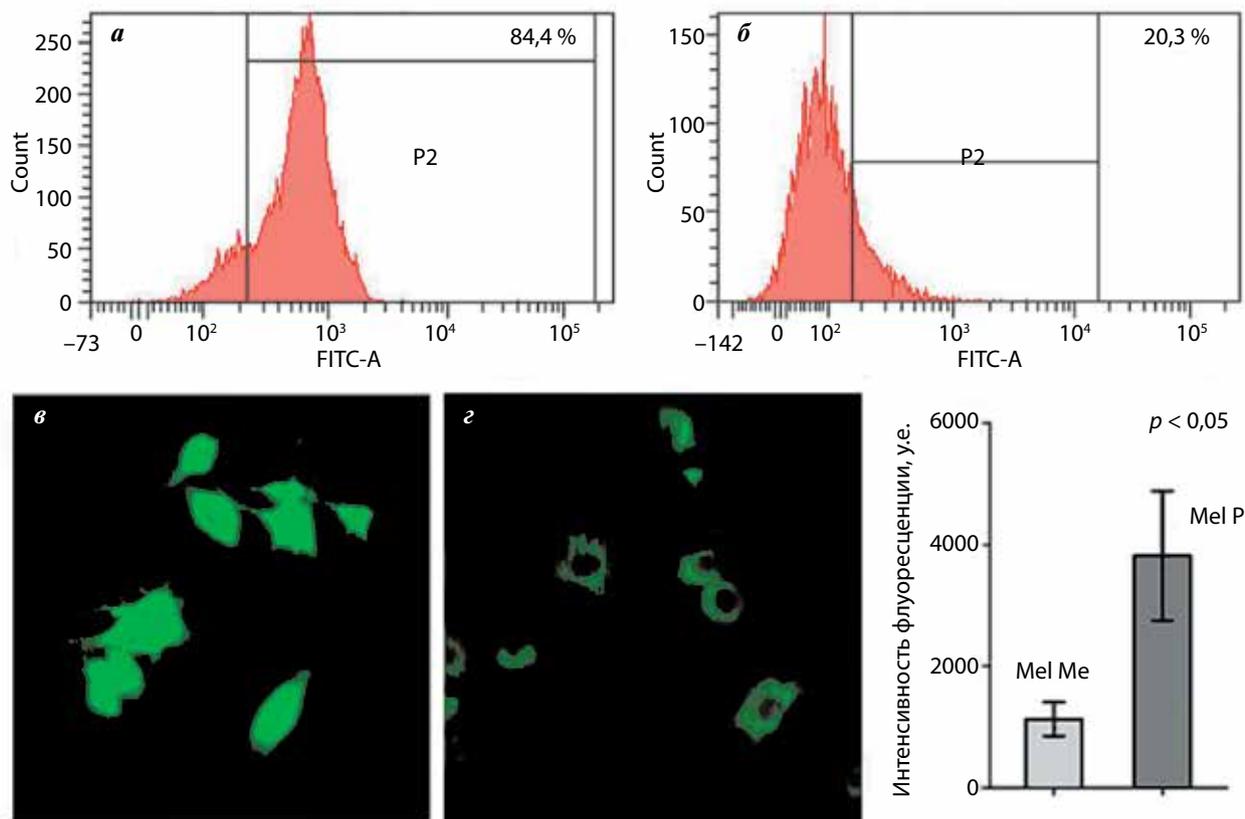


Рис. 1. Базовый уровень аутофагии в клетках меланомы *mel P* и *mel Me*. Уровень экспрессии LC-3В определяли проточной цитофлуориметрией с использованием антител к LC-3В (а, б), уровень аутофагии определяли окрашиванием клеток меланомы флуоресцентным красителем MDC (в, г)

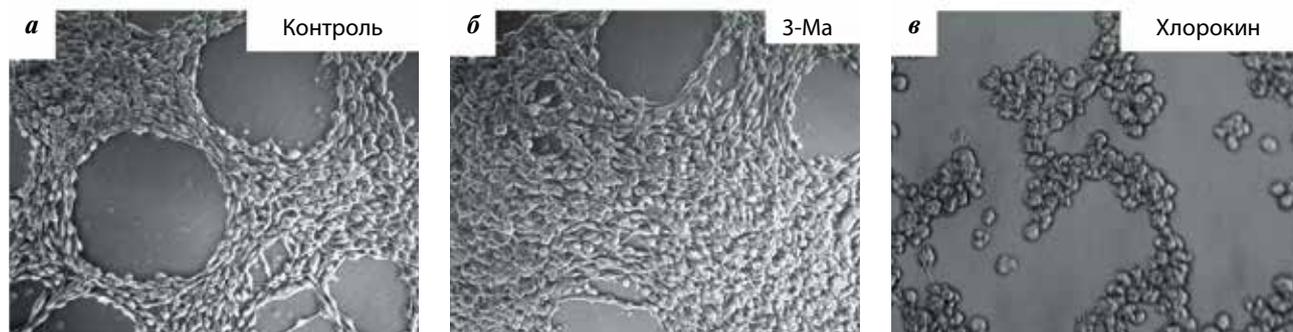


Рис. 2. Влияние ингибиторов аутофагии на формирование сосудистоподобных структур на матригеле клетками меланомы *mel P*: а – контроль; б – ингибитор инициации аутофагии 3-МА, 1 ммоль; в – ингибитор поздней стадии аутофагии хлорокин, 20 мкмоль, блокирует формирование сосудистоподобных структур. $\times 20$

нов, участвующих в инициации (*BECN1*) или терминальной стадии аутофагии (*ATG5*), с помощью siRNA. Белок Atg5 является ключевым компонентом аутофагосом [17]. Известно, что комплекс Atg5 + Atg12, присоединяя Atg16, приобретает свойство лигазы, которая пришивает Atg8 (LC-3В) к фосфатидилэтаноламину мембраны аутофагосом. Клетки меланомы *mel P* трансфецировали *BECN1* siRNA с липофектамино-2000. Клетки меланомы, трансфецированные контрольной siRNA (sc-37 007) (рис. 3а), на матриге-

ле практически не отличались от контрольных клеток *mel P* (рис. 3в). SiRNA-опосредованное подавление экспрессии *BECN1* (в наших экспериментах – на $72 \pm 3 \%$) практически не отражалось на способности клеток *mel P* участвовать в ВМ (рис. 3б, в), наблюдалось лишь вытягивание единичных клеток, которое не приводило к формированию СПС. SiRNA-опосредованное подавление экспрессии гена *ATG5* приводило к снижению уровня Atg5 на $70 \pm 3 \%$ и полностью нивелировало способность клеток меланомы

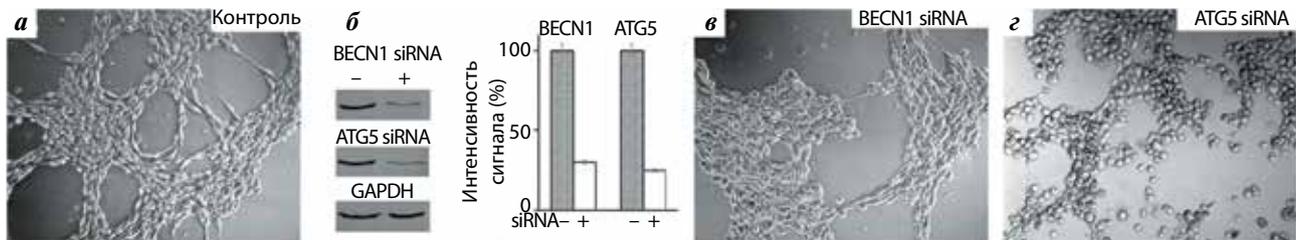


Рис. 3. Эффект нокадауна гена *BECN1* и гена *ATG5* на формирование сосудистоподобных структур клетками меланомы *mel P*: а – клетки были трансфицированы контрольной малой интерферирующей РНК (siRNA); б – вестерн-блот демонстрирует снижение уровня *Becn1-1* и *ATG5* после трансфекции *BECN1* siRNA или *ATG5* siRNA. Количественные характеристики представлены графически справа: нокадаун гена *BECN1* (в) или нокадаун *ATG5* (г) блокирует формирование сосудистоподобных структур. $\times 20$

формировать СПС (рис. 3б, г). Клетки меланомы, трансфицированные *ATG5* siRNA, на матриксе принимали шаровидную форму, но сохраняли способность мигрировать и узнавать друг друга, формирование СПС не наблюдалось. Изменение формы клетки из веретеноподобной в шаровидную в ответ как на фармакологический ингибитор поздней стадии аутофагии – хлорокин, так и на нокадаун гена *ATG5*, указывает на существование связи (возможно, опосредованной) между слиянием фагосомы с лизосомой и реорганизацией актина клетки.

Чрезвычайно интересным нам представлялось проследить изменения уровня аутофагии в условиях блокирования ВМ. Ранее нами был идентифицирован высокоэффективный ингибитор ВМ ЛХС-1269 [19]. Клетки *mel P* росли на пластике в течение 16–18 ч в присутствии 10^{-7} моль ЛХС-1269 или 20 мкмоль хлорокина (не цитотоксические концентрации). Об уровне аутофагии судили по экспрессии LC-3В (рис. 4а–в). Можно видеть, что экспрессия LC-3В в клетках меланомы, которые росли в присутствии

ингибитора ВМ ЛХС-1269, снижена по сравнению с контролем (на 44 ± 2 %). Аналогичная корреляция наблюдалась, когда уровень аутофагии определяли по окрашиванию клеток флуоресцентным красителем MDC (рис. 4г–е). Хлорокин снижал базовый уровень аутофагии на 56 ± 4 %. Заметное снижение аутофагии в ответ на блокаду ВМ (сравнимую с хлорокином) предполагает, что конститутивно активная аутофагия может являться одним из доминирующих свойств опухолевой клетки, способной участвовать в ВМ. Таким образом, экспериментально подтверждено, что высокий базовый уровень аутофагии является обязательным и необходимым условием организации клеток меланомы в СПС. У нас нет ответа на вопрос, как аутофагия может активироваться при переходе клетки в агрессивную фазу роста и какой вклад она вносит в ВМ. Ответ, по-видимому, нужно искать в существовании неидентифицированных еще эндогенных/экзогенных активаторов аутофагии или несогласованности событий в ядре и цитоплазме клетки.

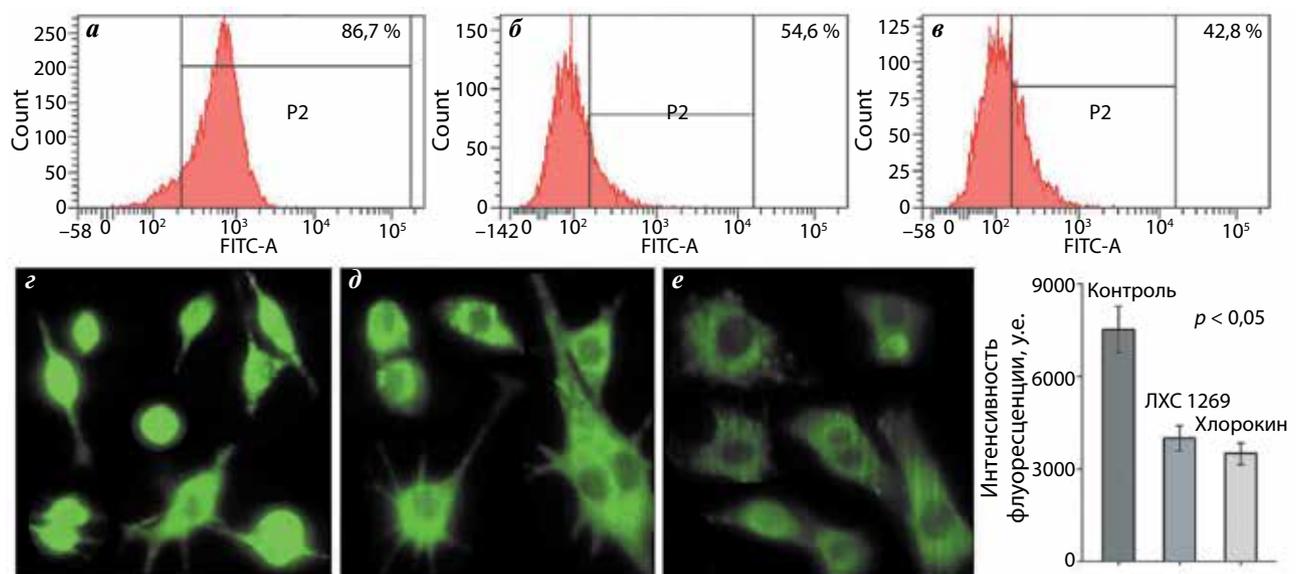


Рис. 4. Влияние специфического ингибитора васкулогенной мимикрии – ЛХС-1269 (10^{-7} моль) и хлорокина (20 мкмоль) на уровень аутофагии в клетках меланомы *mel P*: а, б – базальный уровень аутофагии определяли проточной флуориметрией; в, г – базальный уровень аутофагии определяли окрашиванием клеток флуоресцентным красителем монодансилкадаверинем

Сегодня не известно ни одного физиологического процесса, аналогичного ВМ, у взрослых или детей. Единственным примером ВМ, встречающимся у человека, является формирование цитотрофобластами васкулярных каналов в плаценте в ходе эмбриогенеза. Полученные нами данные о блокировании аутофагии ЛХС-1269 открывают новые возможности ингибирования роста опухоли с минимальным влиянием на нормальные физиологические процессы.

Заключение

По-видимому, на ранних стадиях трансформации клетки активация аутофагии способствует развитию защитного механизма, проявляя противоопухолевый эффект. На поздних стадиях заболевания при гипоксии или лучевой терапии, или действии противоопухолевых препаратов аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли.

В настоящей работе мы показали, что аутофагия участвует в формировании СПС на матригеле, которое является *in vitro* тестом ВМ. Эксперименты с использованием фармакологических ингибиторов аутофагии и siRNA-опосредованным снижением экспрессии генов, участвующих в инициации аутофагии или в терминальной ее стадии, подтвердили участие аутофагии в ВМ. Другим подтверждением участия аутофагии в ВМ явилось снижение базового уровня аутофагии в клетках меланомы блокатором ВМ – ЛХС-1269. Полученные нами результаты указывают на то, что аутофагия в опухолевых клетках не только поддерживает жизнеспособность клеток в условиях метаболического стресса, действия химио- и радиотерапии,

но и способна стимулировать процесс формирования альтернативной системы кровоснабжения опухоли – ВМ, которая может частично компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной микроциркуляторной сети. Становится очевидным, что аутофагия – это тот чувствительный индикатор, который сигнализирует о высокозлокачественном фенотипе опухолевой клетки. Все это подводит нас к идее, что для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований необходимо ингибировать аутофагию в опухолевых клетках. И поиск блокаторов аутофагии представляется как многообещающий подход к лечению рака.

В настоящее время проходят I и II фазы клинических испытаний около 20 низкомолекулярных ингибиторов аутофагии [20]. Предварительные результаты указывают на положительную динамику в лечении опухолей. Но нельзя игнорировать тот факт, что аутофагия – регулярное избавление от отработанного материала и получивших повреждение органелл клетки – имеет особенно большое значение для клеток нервной системы (нейронов). Когда система аутофагии работает в этих клетках слишком медленно или не безошибочно, это приводит к развитию таких нейродегенеративных расстройств, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона [21]. Для всех этих патологий характерны медленные, но неотвратимые изменения в функционировании головного мозга.

В ближайшие 5–10 лет, скорее всего, мы придем к более детальному пониманию процесса аутофагии в онкологии, что откроет нам либо новые эффективные методы терапии, либо позволит улучшить качество жизни онкологических больных.

Авторы благодарят А. Белявского и Е. Егорова за ценные советы в обсуждении работы. Авторы также выражают искреннюю благодарность Д. Хоченкову за помощь в интерпретации результатов по флуоресцентному изображению.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147(4):728–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
- Singh R., Cuervo A.M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011;13(5):495–504. DOI: 10.1016/j.cmet. PMID: 21531332.
- Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001;8(6):569–81. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400852. PMID: 11536007.
- Rabinowitz J.D., White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010;330(6009):1344–8. DOI: 10.1126/science.1193497. PMID: 21127245.
- Guo J.Y., Xia B., White E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* 2013;155(6):1216–9. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.019. PMID: 24315093.
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;10(1):51–64. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.06.001. PMID: 16843265.
- Sun K., Deng W., Zhang S. et al. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci* 2013;3(1):35–42. DOI: 10.1186/2045-3701-3-35. PMID: 24016776.

8. Gerger A., LaBonte M., Lenz H.L. Molecular predictors of response to antiangiogenesis therapies. *Cancer J* 2011;17(2):134–41. DOI: 10.1097/PP0.0b013e318212db3c. PMID: 21427557.
9. Cantelmo A.R., Pircher A., Kalucka J. et al. Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target? *Expert Opin Ther Targets* 2017;21(3):239–47. DOI: 10.1080/14728222.2017.1282465. PMID: 28081641.
10. Folberg R., Maniatis A.J. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004;112(7–8):508–25. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0810.x. PMID: 15563313.
11. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.
12. Kimlin L.C., Casagrande G., Virador V.M. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog* 2013;52(3):167–82. DOI: 10.1002/mc.21844. PMID: 22162252.
13. Yamada K.M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007;130(4):601–10. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.006. PMID: 17719539.
14. Amaravadi R.K., Lippincott-Schwartz J., Yin X.M. et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011;17(4):654–66. DOI: 10.1158/1078-0432. PMID: 21325294.
15. Ding Y., Zhao K., Wu Y., Xing C. Expression and significance of Beclin-1 in vasculogenic mimicry formation of gastric cancer. *Oncol Rep* 2014;17(7):716–9. PMID: 25070456.
16. Hönscheid P., Datta K., Muders M.H. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *Int J Radiat Biol* 2014;90(8):628–35. DOI: 10.3109/09553002. PMID: 24678799.
17. Pyo J.O., Nah J., Jung Y.K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* 2012;44(2):73–80. DOI: 10.3858/emm.2012.44.2.029. PMID: 22257882.
18. Barth S., Danielle Glick D., Kay F., Macleod K.F. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010;221(2):117–24. DOI: 10.1002/path.2694. PMID: 20989884.
19. Вартамян А.А., Барышникова М.А., Эктова Л.В. и др. Производные индолкарбазолов, блокирующие васкулогенную мимикрию в опухоли. Патент РФ № 2557554. *Бюлл. № 21*, 2015.
20. Ozpolat B., Benbrook D.M. Targeting autophagy in cancer management – strategies and developments. *Cancer Manag Res* 2015;7:291–9. DOI: 10.2147/CMAR.S34859. PMID: 26392787.
21. Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):345–57. DOI: 10.1038/nrn3961. PMID: 25991442.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ PD-L1 И PD-L2 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ РАЗЛИЧНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ И «ПУСТЫХ» ЛИПОСОМ

А.В. Пономарев, В.А. Мисюрин, А.А. Рудакова, А.В. Мисюрин, М.А. Барышникова

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

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. В последние годы достигнут значительный прогресс в иммунотерапии опухолей, однако пока мало информации о влиянии химиопрепаратов на взаимодействие опухоли и иммунной системы. Вызывает интерес вопрос о возможности лечения блокаторами PD-1 и его лигандов после химиотерапии.

Цель исследования – изучить изменение экспрессии матричной РНК (мРНК) и поверхностных молекул PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях меланомы человека после воздействия лекарственных форм аранозы – лиофилизата для приготовления раствора для инъекций (араноза-лио) и липосомальной, а также «пустых» липосом, не содержащих аранозы.

Материалы и методы. Исследование проводили на 11 клеточных линиях метастатической меланомы человека, 5 из которых несли мутацию BRAF. В количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени исследовали уровень экспрессии генов PD-L1 и PD-L2. В реакции иммунофлуоресценции оценивали экспрессию белков PD-L1 и PD-L2.

Результаты. мРНК PD-L1 и PD-L2 экспрессируется на меньшем уровне в клеточных линиях, имеющих мутации BRAF, но различия достоверны только для PD-L2 ($p = 0,1373$ и $p = 0,0207$ соответственно). Экспрессия поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в необработанных препаратами клеточных линиях детектируется только на клеточных линиях с диким типом BRAF. В целом, после воздействия липосомальной аранозы уровень экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 становится значительно ниже ($p = 0,0004$ и $p = 0,0442$ соответственно), чем в необработанных линиях. Араноза-лио и «пустые» липосомы в основном привели к увеличению уровня экспрессии PD-L1 ($p < 0,0001$ и $p = 0,0005$ соответственно) и PD-L2 ($p = 0,0005$ и $p = 0,0025$). Но на отдельных линиях наблюдался противоположный эффект. Изменения экспрессии белков PD-L1 и PD-L2 не коррелируют с изменениями уровня экспрессии мРНК. Экспрессия белка PD-L1 после инкубации с липосомальной аранозой повышается по сравнению с необработанными линиями ($p = 0,0269$), а после воздействия аранозы-лио и «пустых» липосом – уменьшается ($p = 0,0663$ и $p = 0,7213$ соответственно). Экспрессия белка PD-L2 после воздействия липосомальной аранозы значимо не меняется ($p = 0,1141$), а после инкубации с аранозой-лио и «пустыми» липосомами уменьшается ($p = 0,0021$ и $p = 0,008$).

Выводы. Полученные нами результаты согласуются с данными других исследователей и еще раз подтверждают, что уровень мРНК и белков PD-L1 и PD-L2 изменяется при различных воздействиях. Лекарственные формы аранозы, а также «пустые» липосомы оказывают разное влияние на экспрессию как мРНК, так и белков PD-L1 и PD-L2.

Ключевые слова: PD-L1, PD-L2, араноза, меланома

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-74-81

THE INFLUENCE OF ARANOZA DRUG FORMULATIONS AND «EMPTY» LIPOSOMES ON THE EXPRESSION OF PD-L1 AND PD-L2 IN HUMAN MELANOMA CELL LINES

A.V. Ponomarev, V.A. Misyurin, A.A. Rudakova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova

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

Introduction. In recent years, significant progress has been achieved in immunotherapy of tumors, however, little is known about the crosstalk between the tumor and the immune system. It seems reasonable to rise the question of patients treatment with PD-1 and its ligands blockers after chemotherapy.

Objective. To investigate the expression of cell surface molecules PD-L1 and PD-L2 both at the mRNA and protein levels in human melanoma cell lines after exposure to «Aranoza, lyophilisate for preparation of solution for injections» (aranoza-lío), liposomal formulation of aranoza and «empty» liposomes without aranoza.

Materials and methods. In this study we used 11 melanoma cell lines, 5 of which carried the BRAF mutation. In quantitative polymerase chain reaction in real time we investigated the level of PD-L1 and PD-L2 gene expression. Using flow cytometry we evaluated the expression of cell surface antigens PD-L1 and PD-L2.

Results. PD-L1 and PD-L2 mRNA are expressed at a lower level in cells with BRAF mutations, differences were significant only for PD-L2 ($p = 0.1373$ and $p = 0.0207$ respectively). A high basal level of protein PD-L1 and PD-L2 expression was observed in wild type BRAF melanoma cells. After exposure to liposomal aranoza the level of PD-L1 and PDL-2 mRNA expression was significantly reduced ($p = 0.0004$ and $p = 0.0442$ respectively) in compare to control non-treated cells. It is of interest, aranoza-lip and «empty» liposomes increased the expression of PD-L1 ($p < 0.0001$ and $p = 0.0005$ respectively) and PDL2 ($p = 0.0005$ and $p = 0.0025$). Of note, we observed an opposite effect in some melanoma cell lines. Moreover, changes in the expression of proteins PD-L1 and PD-L2 did not correlate with the mRNA level. The expression of PD-L1 protein after incubation with the liposomal aranoza increased dramatically compared to non-treated cells ($p = 0.0269$). Aranoza-lip and «empty» liposomes decreased the expression of PD-L1 protein ($p = 0.0663$ and $p = 0.7213$ respectively). The protein level of PD-L2 after exposure to liposomal aranoza did not change significantly ($p = 0.1141$), however, aranoza-lip and «empty» liposomes reduced the expression of PD-L2 ($p = 0.0021$ and $p = 0.008$).

Conclusion. These findings are consistent with those of other researchers and confirm that the level of PD-L1 and PD-L2 mRNA and protein are modulated after treatment. Also, various drug formulations of Aranoza, as well as the «empty» liposomes, have different effects on the expression of PD-L1 and PD-L2 mRNA and proteins.

Key words: PD-L1, PD-L2, aranoza, melanoma

Введение

В последние годы значительное развитие получила иммунотерапия опухолей. Разрешены к применению или находятся на последних фазах клинических испытаний новые иммунотерапевтические препараты для лечения меланомы, в том числе блокаторы взаимодействия PD-1 с PD-L1/PD-L2 [1, 2]. Данные препараты показывают хорошие результаты по сравнению с традиционной химиотерапией опухолей [3]. Было замечено, что их эффективность зависит от наличия или отсутствия молекулы PD-L1 в опухоли [4]. В нормальной физиологии система PD-L1/PD-1 играет важную роль в предотвращении аутоиммунных реакций. PD-1 обычно экспрессируется на Т- и В-клетках [5]. PD-1 взаимодействует с 2 лигандами: PD-L1 (B7-H1, CD274) и PDL2 (B7-DC, CD273), которые демонстрируют совершенно разные паттерны экспрессии. В норме PD-L1 (CD274) экспрессируется на многих популяциях иммунных клеток [6], тогда как PD-L2 (CD273) экспрессируется на небольшом уровне в дендритных клетках и активированных макрофагах [7, 8]. Экспрессия PD-L1 на уровне матричной РНК (мРНК) высока в нормальных человеческих органах, включая сердце, скелетные мышцы, плаценту и легкие [9], однако экспрессия белка PD-L1 у здоровых субъектов иммуногистохимически [10] не обнаруживается.

Интересно, что белок PD-L1 индуцируется в различных нелимфоидных клетках, включая эпителиальные [11, 12] и эндотелиальные [13], в ответ на воспалительные цитокины, присутствующие в очаге заболевания. Например, в воспаленной коже PD-L1 экспрессируется в некоторых клетках микрососудов и кератиноцитах, но в здоровой коже не обнаруживается [14]. Экспрессия PD-L1 в эпителиальных клетках почечных канальцев детектируется у пациентов с почечными заболеваниями, такими как интерстициальный нефрит, волчаночный нефрит

и IgA-нефропатия. Экспрессия PD-L1 на этих клетках *in vitro* повышалась после их стимуляции интерлейкином-1 альфа, липополисахаридом, фактором некроза опухоли альфа, интерфероном гамма или анти-CD40-антителами [15]. Таким образом, эпителиальная экспрессия PD-L1 индуцируется воспалительными стимулами как *in vitro*, так и *in vivo* [16].

Возможно, иммунологические механизмы, индуцирующие экспрессию PD-L1, также могут быть связаны с лекарственной устойчивостью к химиотерапии. Есть данные, что в некоторых клеточных линиях меланомы человека повышалась экспрессия поверхностного PD-L1 после выработки резистентности к вемурафенибу в процессе культивирования с препаратом [17, 18].

Несмотря на значительные успехи иммунотерапии, на сегодняшний день стандартным методом лечения пациентов с метастатической меланомой кожи без BRAF/сKIT-мутации остается химиотерапия [19].

Ряд исследований посвящен комбинации традиционной химиотерапии или таргетной терапии с иммунотерапией, в частности, изучается влияние химиопрепаратов на индукцию противоопухолевого иммунитета, что может помочь в выборе оптимального сочетания препаратов и в итоге улучшить клинический эффект [20–22].

В настоящее время многие комбинации иммунопрепаратов с химиопрепаратами находятся еще на доклинической стадии исследования. Часто непонятно, будет ли химиотерапия способствовать иммуногенности опухоли или же, наоборот, окажет иммуносупрессивный эффект, который может нивелировать положительное воздействие иммунотерапии. Для большинства таких комбинаций требуются тщательные клинические исследования [23].

К числу химиопрепаратов, применяемых для лечения метастатической меланомы, относятся и производные нитрозомочевины, в том числе араноza. Для

лечения меланомы кожи зарегистрирована лекарственная форма аранозы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио). В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей (НИИ ЭДиТО) ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России создана новая лекарственная форма аранозы – липосомальная [24, 25]. В исследованиях [26, 27] было показано, что липосомальная араноза *in vitro* оказывает воздействие на клеточные линии, устойчивые к аранозе-лио. Было обнаружено, что лекарственные формы аранозы по-разному воздействуют на клетки меланомы [28, 29].

В связи с этим мы решили изучить влияние 2 лекарственных форм аранозы – лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и липосомальной, а также «пустых» липосом, не содержащих аранозу, на экспрессию мРНК и поверхностных молекул PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях меланомы человека.

Материалы и методы

Клеточные линии

Исследования проводили на 11 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека: mel Cher, mel H, mel Gus, mel BGF, mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Is, mel Me, mel Mtr и mel Si, выделенных из опухолевого материала больных, проходивших лечение в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [30]. Клеточные линии различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций гена *BRAF* [31, 32]. Линии mel Hn, mel Ibr, mel II, mel Is, mel Si несут мутацию *BRAF*. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 ммоль NEPES, 2 ммоль L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при +37 °С в атмосфере 5 % CO₂ (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Противоопухолевые препараты

- «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 500 мг» (араноза-лио) производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
- липосомальная лекарственная форма аранозы (липосомальная араноза), предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Кроме лекарственных форм аранозы исследовали воздействие на клетки «пустых» липосом того же состава, который использовался для липосомальной аранозы.

Клетки инкубировали с лекарственными формами аранозы в концентрации 0,5 ИК₅₀ в течение 24 ч.

Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 моль натрия хлорида, 1 моль Трис-НСl pH 8,0, 1 ммоль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [33]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоцианатного буфера (4 моль тиоцианата гуанидина, 25 ммоль цитрата натрия, 0,5 % N-лаурил-саркозината натрия и 0,1 моль β-меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (pH 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (pH 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до +4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали ее с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при +37 °С, растворяли в 20 мкл деионизированной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) с использованием ревертазы брали 2 мкг мРНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse Transcriptase и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжи-

га использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизированной водой.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 ммоль Трис-НСl, 100 ммоль хлорида калия, 4 ммоль хлорида магния, 1 ммоль каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 ммоль β -меркаптоэтанола) и Taq-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нмоль прямого и 250 нмоль обратного праймеров, и 140 нмоль флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *PD-L1* и *PD-L2*, доступных на интернет-ресурсе PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

В каждом образце был исследован уровень экспрессии генов *PD-L1* и *PD-L2*. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DT-Lite («ДНК-Технология», Россия).

Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при +94 °С и 45 циклов денатурации в течение 10 с при +94 °С с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при +60 °С.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Nex. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [34]. Измерения уровня экспрессии проводились в 3 независимых повторях, после чего для анализа было рассчитано среднее значение. В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Реакция иммунофлуоресценции

После 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами клетки снимали с культуральных флаконов раствором Версена и 2 раза отмывали натрий-фосфатным буфером. Разносили в пробирки по 50 мкл и добавляли по 20 мкл антител к PD-L1 (CD274FITC, 558065, BD Pharmingen™) и к PD-L2 (CD273APC, 557926, BD Pharmingen™). Инкубировали в течение

30 мин, после чего 2 раза отмывали в натрий-фосфатном буфере. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (Becton Dickinson, США). Измерения проводили в 3 независимых повторях, после чего для анализа было рассчитано среднее значение.

Статистический анализ данных

Для сравнения базового уровня экспрессии PD-L1 и PD-L2 между разными группами клеток линий меланомы, различающихся по таким признакам, как наличие или отсутствие мутаций гена *BRAF* и степень дифференцировки, использовался однофакторный дисперсионный анализ (analysis of variation, ANOVA). Для сравнения эффектов, оказываемых на уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2 различными формами аранозы, был использован Т-критерий Уилкоксона для связанных выборок. Анализ был проведен в программе STATISTICA версии 7. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Клеточные линии метастатической меланомы кожи человека инкубировали в течение 24 ч с лекарственными формами аранозы – аранозой-лио и липосомальной, а также с «пустыми» липосомами, после чего оценивали изменение экспрессии мРНК и белков PD-L1 и PD-L2.

Некоторые клеточные линии – mel Cher, mel Bgf, mel Me – имеют высокий базовый уровень мРНК *PD-L1* или *PD-L2* (табл. 1). мРНК *PD-L1* и *PD-L2* экспрессируется на меньшем уровне в клетках, имеющих мутации гена *BRAF*, но эти различия были достоверны только для *PD-L2* ($p = 0,1373$ и $p = 0,0207$ соответственно).

Уровень экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* не зависит от степени дифференцировки клеточных линий меланомы ($p = 0,8922$ и $p = 0,9582$ соответственно) [31].

Определен уровень экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека (табл. 2). Экспрессия поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в не обработанных препаратами клеточных линиях чаще всего невысока или отсутствует. Положительная экспрессия хотя бы 1 из исследуемых белков детектируется только на 5 линиях из 11 (mel Cher, mel Gus, mel Bgf, mel Me, mel Mtp). Интересно, что все клетки, экспрессирующие белки PD-L1 или PD-L2, не имеют мутации гена *BRAF*.

Анализ изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* показал, что араноза в разных лекарственных формах оказывает неодинаковые эффекты. В целом, после воздействия липосомальной аранозы

Таблица 1. Изменение экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека

Клеточная линия	Мутации BRAF	Экспрессия мРНК, %							
		Необработанные клетки		Араноза-лио		Липосомальная араноза		«Пустые» липосомы	
		PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
mel Hn	+	8,84	0,39	50,00	0,00	10,88	0,00	131,95	0,00
mel Ibr	+	0,68	0,63	2,92	3,12	8,84	1,46	1,56	2,06
mel II	+	5,44	0,73	21,76	13,40	7,69	2,92	18,95	15,39
mel Is	+	0,63	0,00	0,78	0,01	0,36	0,26	0,90	0,04
mel Si	+	1,79	6,25	0,78	0,01	0,36	0,26	0,90	0,04
mel Cher	–	70,71	20,31	123,11	40,61	5,44	1,18	214,35	151,57
mel H	–	11,66	1,10	246,23	174,11	26,79	4,12	6,70	20,31
mel Gus	–	4,12	16,49	0,78	17,68	8,84	7,18	10,88	263,90
mel Bgf	–	12,50	75,79	1,27	107,18	0,96	3,35	12,50	123,11
mel Me	–	23,33	81,23	5,44	17,68	5,08	7,69	7,18	21,76
mel Mtp	–	8,80	13,40	1,46	4,42	0,01	1,67	1,10	1,10

Таблица 2. Изменение экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека

Клеточная линия	Мутации BRAF	Антиген-положительные клетки, %							
		Необработанные клетки		Араноза-лио		Липосомальная араноза		«Пустые» липосомы	
		PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2	PD-L1	PD-L2
mel Cher	–	4,1	2,4	1	0,5	16,2	0,3	2,6	7,4
mel Gus	–	0,7	30,8	1,3	24,8	20,1	2,8	1,3	0,6
mel Bgf	–	4,5	95,5	0,1	98	6,3	1,9	0,7	15,8
mel Me	–	0,8	9,9	0,9	0,7	0,7	1,7	1,9	25,9
mel Mtp	–	2,1	14	1,9	0,2	2,3	1,1	1,1	17,4

уровень экспрессии PD-L1 и PD-L2 становится значительно ниже ($p = 0,0004$ и $p = 0,0442$ соответственно), чем в исходных линиях. Но есть исключения: в линиях mel Ibr, mel H и mel Gus уровень экспрессии гена PD-L1 увеличился. Араноза-лио и «пустые» липосомы в основном привели к увеличению уровня экспрессии PD-L1 ($p < 0,0001$ и $p = 0,0005$ соответственно) и PD-L2 ($p = 0,0005$ и $p = 0,0025$) (рис. 1). На отдельных линиях наблюдался противоположный эффект (табл. 1).

Араноза-лио и «пустые» липосомы уменьшают уровень экспрессии белка PD-L1 в линиях меланомы ($p = 0,0663$ и $p = 0,7213$ соответственно). Инкубация с липосомальной аранозой, напротив, приводит к значительному повышению уровня экспрессии белка PD-L1 по сравнению с исходными линиями ($p = 0,0269$) (рис. 2а).

Инкубация с аранозой-лио и «пустыми» липосомами уменьшает уровень экспрессии белка PD-L2 ($p = 0,0021$ и $p = 0,008$). Уровень экспрессии PD-L2 после воздействия липосомальной аранозы значительно не изменился ($p = 0,1141$) (рис. 2б).

Заключение

Мы обнаружили, что белки PD-L1 и PD-L2 экспрессируются только на клеточных линиях с диким типом BRAF. Экспрессия мРНК и белка PD-L1 и PD-L2 на BRAF-отрицательных линиях достаточно заметно меняется после инкубации клеток как с разными лекарственными формами аранозы, так и с «пустыми» липосомами, однако изменения уровня белка не коррелируют с изменениями уровня мРНК. Учитывая тот факт, что в некоторых клеточных линиях «пустые» липосомы значимо

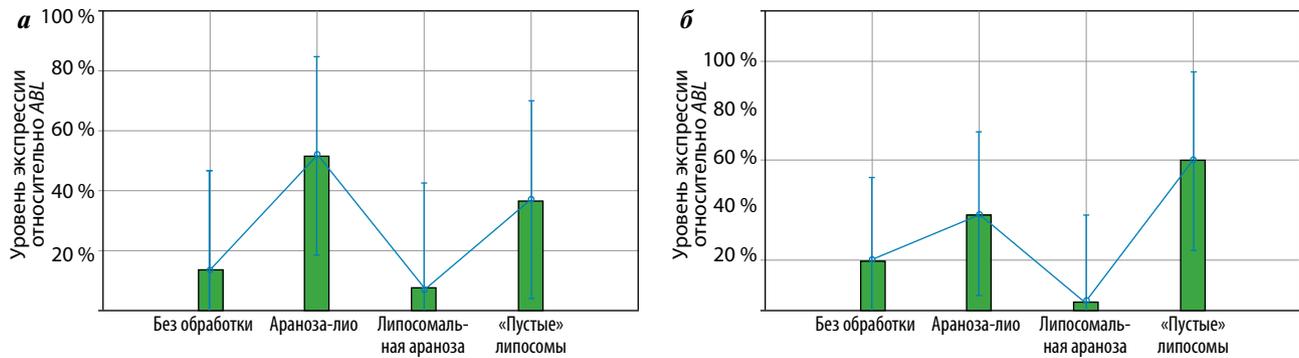


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии мРНК PD-L1 (А) и PD-L2 (Б) после воздействия исследуемыми препаратами

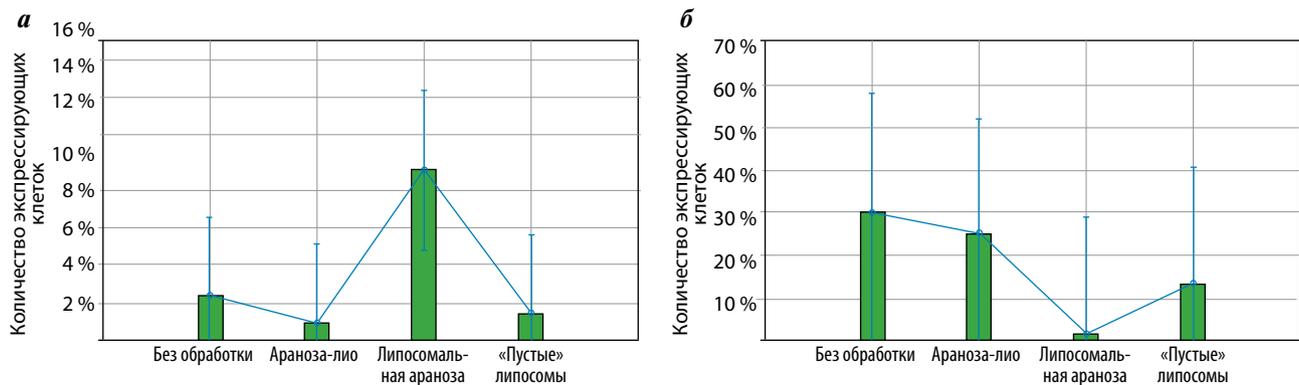


Рис. 2. Изменение уровня экспрессии белков PD-L1 (а) и PD-L2 (б) после воздействия исследуемыми препаратами

повышают уровень экспрессии мРНК PD-L1 или PD-L2, становится ясно, что подобные изменения могут быть вызваны не только противоопухолевыми химиопрепаратами. Однако мы не можем объяснить, какие механизмы задействованы при повышении уровня экспрессии мРНК PD-L1 или PD-L2 под влиянием аранозы-лио или «пустых» липосом.

В схожих исследованиях на клеточных линиях меланомы человека отмечена важность сигнальных белков MAPK и STAT3 в увеличении уровня экспрессии мРНК и белка PD-L1 при воздействии вемурафениба [17, 18] и STAT3 – в поддержании конститутивной экспрессии PD-L1 [35]. Также можно отметить, что в экспериментах *in vitro* на линиях плоскоклеточного рака пищевода человека облучение увеличивало поверхностную экспрессию PD-L1. Для плоскоклеточного рака пищевода лучевая терапия является хорошо налаженным лечебным воздействием и обеспечивает преимущества в выживаемости [36]. Для молекулы PD-L2 подобных данных в литературе не найдено.

В исследовании К.А. Schats и соавт. на 46 образцах метастазов меланомы изучали присутствие поверхностного PD-L1 методом иммуногистохимии

и его мРНК на 21 образце из 46. Данные иммуногистохимии показали высокую корреляцию с данными экспрессии мРНК PD-L1. Во всех образцах, где была измерена мРНК PD-L1, была обнаружена ее экспрессия на уровне от 1 до 250 % [37]. Эти результаты схожи с нашими данными, полученными на клеточных линиях, не обработанных препаратами. Схожие данные по экспрессии PD-L1 были получены на клеточных линиях меланомы человека и в работах других ученых [17, 18].

Наши результаты подтверждают данные других исследователей о том, что уровень мРНК и белка PD-L1 в клеточных линиях нестабилен.

Увеличение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в опухолевых клетках может способствовать защите опухоли от иммунного ответа. В нашем исследовании липосомальная форма аранозы не вызвала значительного повышения уровня экспрессии мРНК PD-L1 и PD-L2 в исследованных линиях меланомы человека. Мы обнаружили, что, несмотря на повышение уровня экспрессии мРНК PD-L1 или PD-L2 под действием аранозы-лио или «пустых» липосом, экспрессия белков PD-L1 или PD-L2 значимо не повышается, а в большинстве случаев, наоборот, снижается.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Franklin C., Livingstone E., Roesch A. et al. Immunotherapy in melanoma: recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(3):604–11. DOI: 10.1016/j.ejso.2016.07.145. PMID: 27769635.
- Ключагина Ю.И., Соколова З.А., Барышникова М.А. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей. *Онкопедиатрия* 2017;4(1):49–55. DOI: 10.15690/onco.v4i1.1684.
- Guan X., Wang H., Ma F. et al. The efficacy and safety of programmed cell death 1 and programmed cell death 1 ligand inhibitors for advanced melanoma: a meta-analysis of clinical trials following the PRISMA guidelines. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(11):e3134. DOI: 10.1097/MD.00000000000003134. PMID: 26986169.
- Patel S.P., Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015;14(4):847–56. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0983. PMID: 25695955.
- Pauken K.E., Wherry E.J. Overcoming T-cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* 2015;36(4):265–76. DOI: 10.1016/j.it.2015.02.008.
- Topalian S.L., Drake C.G., Pardoll D.M. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 2012;24(2):207–12. DOI: 10.1016/j.coi.2011.12.009. PMID: 22236695.
- Loke P., Allison J.P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(9):5336–41. DOI: 10.1073/pnas.0931259100. PMID: 12697896.
- Tseng S.Y., Otsuji M., Gorski K. et al. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T-cells. *J Exp Med* 2001;193(7):839–46. DOI: 10.1084/jem.193.7.839. PMID: 11283156.
- Dong H., Zhu G., Tamada K., Chen L. B7-H1, a 3rd member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med* 1999;5(12):1365–9. DOI: 10.1038/70932. PMID: 10581077.
- Dong H., Strome S.E., Salomao D.R. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793–800. DOI: 10.1038/nm730. PMID: 12091876.
- Nakazawa A., Dotan I., Brimnes J. et al. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2004;126(5):1347–57. DOI: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2004.02.004>. PMID: 15131796.
- Youngnak-Piboonratanakit P., Tsushima F., Otsuki N. et al. The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role. *Immunol Lett* 2004;94(3):215–22. DOI: 10.1016/j.imlet.2004.05.007. PMID: 15275969.
- Rodrig N., Ryan T., Allen J.A. et al. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8⁺ T-cell activation and cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2003;33(11):3117–26. DOI: 10.1002/eji.200324270. PMID: 14579280.
- Mazanet M.M., Hughes C.C. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T-cell cytokine synthesis. *J Immunol* 2002;169(7):3581–8. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.7.3581>. PMID: 12244148.
- Chen Y., Zhang J., Li J. et al. Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells. *Nephron Exp Nephrol* 2006;102(3–4):e81–92. DOI: 10.1159/000089686. PMID: 16282703.
- Ritprajak P., Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015;51(3):221–8. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.014. PMID: 25500094.
- Jiang X., Zhou J., Giobbie-Hurder A. et al. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res* 2013;19(3):598–609. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2731. PMID: 23095323.
- Atefi M., Avramis E., Lassen A. et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3446–57. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2797. PMID: 24812408.
- Практические рекомендации по лекарственному лечению злокачественных опухолей (RUSSCO). Под ред. В.М. Моисеенко. М.: Российское общество клинической онкологии, 2016. 524 с.
- Gotwals P., Cameron S., Cipolletta D. et al. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2017;17(5):2866–301. DOI: 10.1038/nrc.2017.17. PMID: 28338065.
- Simeone E., Grimaldi A.M., Festino L. et al. Combination treatment of patients with BRAF-mutant melanoma: a new standard of care. *BioDrugs* 2017;31(1):51–61. DOI: 10.1007/s40259-016-0208-z. PMID: 28058658.
- Ascierto P.A., Agarwala S., Botti G. et al. Future perspectives in melanoma research: meeting report from the «melanoma bridge». *Napoli, December 1st–4th 2015. J Transl Med* 2016;14(1):313. DOI: 10.1186/s12967-016-1070-y. PMID: 27846884.
- Harris S.J., Brown J., Lopez J. et al. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve. *Cancer Biol Med* 2016;13(2):171–93. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0015. PMID: 27458526.
- Козеев Г.С. Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата араноза. Автореф. ... дисс. канд. фарм. наук. М., 2013. 25 с.
- Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова С.А., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной липосомальной формы аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):24.
- Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2012;11(2):24.
- Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):41–53.
- Афанасьева Д.А., Мисюрин В.А., Пономарев А.В. и др. Изменение уровня экспрессии гена CD95/FAS в клетках линий меланомы под воздействием липосомальной аранозы. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(3):34–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-34-39.
- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Хоченкова Ю.А. и др. Липосомальная араноза не индуцирует аутофагию. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(1):15–8.
- Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.

31. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. Сибирский онкологический журнал 2010;37(1):29–39.
32. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена BRAF на способность клеток меланомы к аутофагии. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2013;3:68–72.
33. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty something years on. Nat Protoc 2006;1(2):581–5. PMID: 17406285.
34. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. Press Methods Mol Biol 2013;999:1–23. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2_1. PMID:23666687.
35. Lienlaf M., Perez-Villarroel P., Knox T. et al. Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma. Mol Oncol 2016;10(5):735–50. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.12.012. PMID: 26775640.
36. Chen M.F., Chen P.T., Chen W.C. et al. The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression. Oncotarget 2016;7(7):7913–24. DOI: 10.18632/oncotarget.6861. PMID: 26761210.
37. Schats K.A., Van Vré E.A., De Schepper S. et al. Validated programmed cell death ligand 1 immunohistochemistry assays (E1L3N and SP142) reveal similar immune cell staining patterns in melanoma when using the same sensitive detection system. Histopathology 2017;70(2):253–63. DOI: 10.1111/his.13056. PMID: 27496355.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ БЕЛКОВОГО СЕМЕЙСТВА HNRNP И ДРУГИХ БЕЛКОВ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ СПЛАЙСИНГ, В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Н.В. Пашинцева, Л.С. Еремина, К.В. Лисицкая, А.В. Иванов, Л.И. Ковалев, М.А. Ковалева, С.С. Шишкин
ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»;
Россия, 119071 Москва, Ленинский просп., 33/2

Контакты: Наталья Валентиновна Пашинцева pashintseva2009@yandex.ru

Введение. Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1, hnRNP A1) и другие РНК-связывающие белки, участвующие в сплайсинге, играют значительную роль в реализации наследственной информации, и их представленность в клетках может сильно меняться при различных заболеваниях, в частности при злокачественных опухолях.

Цель исследования – протеомное изучение hnRNP A1 и других РНК-связывающих белков, участвующих в процессах сплайсинга, в 10 культивируемых линиях человеческих злокачественных и нормальных клеток эпителиального и мезенхимального происхождения.

Материалы и методы. Для изучения белковых профилей использовался двумерный электрофорез культивируемых клеточных линий аденокарцином (LNCaP, DU-145, PC-3, 769-P), сарком (U2-OS, SK-UT-1B, RD), а также незлокачественных мезенхимальных клеток (SC5-MSC), миобластов и линии доброкачественной гиперплазии предстательной железы (BPH-1) с последующей масс-спектрометрической идентификацией белковых фракций.

Результаты. Белок hnRNP A1 определялся как мажорный во всех исследованных линиях злокачественных опухолей человека. В культивируемых мезенхимальных клетках и нормальных миобластах человека hnRNP A1 присутствовал в существенно меньших количествах, чем в опухолевых клетках, и исчезал после индукции дифференцировки миобластов.

Выводы. Повышенное содержание белка hnRNP A1 может свидетельствовать об активном процессе пролиферации клеток, в том числе опухолевых. HnRNP A1 и другие белки, участвующие в процессах сплайсинга, представляются перспективными объектами для дальнейшего изучения в трансформированных клетках человека.

Ключевые слова: саркома, аденокарцинома, белок hnRNP A1, ядерные белки, протеомика

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-82-90

PROTEOMIC IDENTIFICATION OF HNRNP FAMILY MEMBERS AND OTHER PROTEINS INVOLVED IN SPLICING IN HUMAN CULTURED CELLS

N.V. Pashintseva, L.S. Eremina, K.V. Lisitskaya, A.V. Ivanov, L.I. Kovalev, M.A. Kovaleva, S.S. Shishkin
A.N. Bakh Institute of Biochemistry of Russian Academy of Sciences; 33/2 Leninskiy Ave., Moscow 119071, Russia

Introduction. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) and other RNA-binding proteins involved in splicing participate in realization of genetic information and can be greatly changed in pathological conditions including tumors.

Objective. Proteomic study of hnRNP A1 and other RNA-binding splicing proteins in 10 human malignant and non-malignant cultured cell lines of mesenchymal and epithelial origin.

Materials and methods. Two-dimensional gel electrophoresis of adenocarcinomas (LNCaP, DU-145, PC-3, 769-P) and sarcomas (U2-OS, SK-UT-1B, RD) cell lines with following protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry have been carried out.

Results. HnRNP A1 has been identified as an abundant protein in all studied malignant cell lines. It has been revealed in lower amount in normal mesenchymal cells compared to malignant cultured cells and achieved undetectable levels in myoblasts after induction of differentiation.

Conclusion. High cellular level of hnRNP A1 can suggest high proliferative activity of cells including malignant those. Hence, hnRNP A1 and other RNA-binding splicing proteins hold promise to its further investigation in human transformed cells.

Key words: sarcoma, adenocarcinoma, protein hnRNP A1, nuclear proteins, proteomics

Введение

Сплайсинг является одним из ключевых этапов в реализации генетической информации. Принципиальным условием для вовлечения в сплайсинг первичных РНК-транскриптов в эукариотических клетках является их связывание со специальными белками и образование гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP) [1]. hnRNP, содержащие специальные РНК-связывающие домены и мотивы (RNA-recognition motifs, RRM), наряду со структурной (гистонотипной) функцией обладают и более тонкой функциональной специализацией. В настоящее время они считаются (наряду с малыми ядерными РНК) «ключевыми игроками» процессинга РНК (включая альтернативный сплайсинг) и пост-транскрипционной регуляции генной экспрессии [2]. Большинство из белков hnRNP способны не только связывать молекулы РНК и участвовать в сплайсинге, но и выполнять ряд других важных функций. Так, они участвуют в регуляции длины теломерной ДНК [3], контроле синтеза миелина [4], формировании сердечной мышцы [5] и гладких мышц [6] на ранних стадиях эмбриогенеза. Семейство hnRNP включает 16 главных и 19 минорных белков, многие из которых характеризуются как повсеместно встречающиеся (в том числе и hnRNP A1), однако их представленность в клетках может сильно меняться при различных патологических состояниях, в частности, при опухолевой трансформации [7]. Имеются доказательства вовлеченности отдельных hnRNP в процессы канцерогенеза, прогрессирования и метастазирования опухолей эпителиального происхождения. Например, повышенную продукцию белка hnRNP A1 связывают с опухолевой трансформацией клеток толстого кишечника и высокой инвазивностью клеток гепатокарциномы [8, 9]. Данные о белках hnRNP в опухолевых клетках мезенхимального происхождения ограничены [10].

Надо отметить, что, хотя hnRNP широко представлены в клетках человека, данные об их исследовании протеомными методами в различных типах нормальных и злокачественных клеток крайне ограничены [10, 11]. Известно, что культивируемые клетки человека представляют собой удобные модели для изучения молекулярных механизмов нормальной клеточной дифференцировки и ее нарушений в злокачественных опухолях разного происхождения. Для решения подобных задач, включающих идентификацию представителей отдельных белковых семейств, широко используются протеомные технологии [12]. Целью данной работы стало протеомное исследование hnRNP и других РНК-связывающих белков, участвующих в процессах сплайсинга, в 10 линиях культивируемых человеческих злокачествен-

ных и нормальных клеток эпителиального и мезенхимального происхождения (линий аденокарцином и сарком, а также незлокачественных мезенхимальных клеток).

Материалы и методы

Клеточные линии и их культивирование

Материалом для исследований послужили линии аденокарцином предстательной железы LNCaP (получена от д. б. н. И.Г. Шемякина, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Россия), DU-145, ВРН-1, РС-3 (получены из German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Германия), 769-P (получена из American Type Culture Collection, США), рабдомиосаркомы RD (получена из НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН), лейомиосаркомы SK-UT-1B и остеомиосаркомы U2-OS (получены из Института цитологии РАН). Кроме того, в работе анализировали белки нормальных миобластов [13] и мезенхимальных стволовых клеток человека SCS-MSC (получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН).

Для выращивания клеток линий LNCaP, DU-145, 769-P, ВРН-1, РС-3 и U2-OS использовали среду RPMI-1640 с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС), гентамицина и L-глутамина. Клетки линии SK-UT-1B культивировали в среде Игла MEM, а RD и мезенхимальные клетки – в среде DMEM, содержащей L-глутамин, гентамицин и ТЭС. Клетки миобластов культивировали в среде F-12. С целью инициирования процесса дифференцировки проводилось инкубирование миобластов в среде, содержащей 2 % лошадиной сыворотки. Все реагенты для культивирования были произведены в фирмах «ПанЭко» (Россия) и Biowest (Франция). Выращивание клеток производилось с использованием культурального пластика фирм Costar Group (США) и Nunc (Дания) в CO₂-инкубаторе фирмы Sanyo Electric Co. (Япония). Манипуляции, требующие стерильных условий, выполнялись в ламинарном шкафу II класса защиты фирмы Jouan Robotics (Франция). После достижения необходимой биомассы (10–20 × 10⁶ клеток) выращенные клетки механически снимали с поверхности матрасов, предварительно проинкубировав в бессывороточной среде в течение 1 ч при температуре +4 °С, чтобы смыть с поверхности клеток адсорбированные белки сыворотки, использованной при культивировании. Полученные препараты клеток до проведения протеомного анализа хранили при температуре –70 °С.

Экстракция клеточных белков и получение ядерных белков

Для экстракции белков препараты выращенных клеток гомогенизировали в 200 мкл традиционного

лизирующего раствора, который содержал 9 моль мочевины и 2 % амфолинов рН 3,5–10,0, а также неионный детергент и восстановитель дисульфидных групп. Для последующего проведения двумерного электрофореза использовали лизирующий раствор с добавлением 2 % Тритона X-100 и 5 % β -меркаптоэтанола [14].

Для получения ядерных белков культивируемые клетки суспендировали в фосфатно-солевом буфере и разрушали в мягких условиях (добавление Тритона X-100 до конечной концентрации 1 % и проведение нескольких циклов замораживания – оттаивания), затем центрифугированием осаждали клеточные ядра и 3-кратно промывали их фосфатно-солевым буфером.

Двумерный электрофоретический анализ белков

Для разделения белков использовался двумерный электрофорез с проведением неравновесного изоэлектрофокусирования (ИЭФ) в собственной модификации метода О'Фаррелла [14], которое проводилось в градиенте рН в стеклянных трубках ($2,4 \times 180$ мм), заполненных 4 % полиакриламидным гелем (ПААГ), приготовленным на 9 моль раствора мочевины с 2 % Тритона X-100 и 2 % смеси амфолинов. В основных экспериментах использовали амфолины рН 5–7 и 3,5–10,0 в соотношении 4 : 1, а для уточнения распределения белков в краевых зонах в ряде экспериментов применяли амфолины рН 4–6 (или 7–9) и 3,5–10,0 в том же соотношении. Белковые экстракты (100–150 мкл) наносили на «кислотный» край геля. ИЭФ проводили в приборе фирмы Bio-Rad Laboratories (США), модель 175, при 2400 В/ч суммарно на каждую колонку ПААГ. После ИЭФ колонки ПААГ использовали для фракционирования во 2-м направлении, проводившегося, как в 1-м варианте. Далее эта модификация, отличающаяся по условиям фракционирования от классической NERNGE-модификации, будет обозначена как NPGE (nonequilibrium pH gradient electrophoresis – неравновесный электрофорез в градиенте рН). На каждую клеточную линию получалось от 4 (мезенхимальные стволовые клетки) до 50 и более (линия DU-145) двумерных электрофореграмм (ДЭ).

Визуализацию белков окрашиванием Кумасси бриллиантовым голубым R-250 и нитратом серебра с последующим анализом полученных ДЭ выполняли, как описано ранее [14], с небольшими модификациями. Для определения молекулярных масс (Мм) белковых фракций использовали набор рекомбинантных белков «SM0671» Мм = 10–170 кДа (Fermentas, США). Денситометрию ДЭ проводили после сканирования (сканер Epson Expression 1680) и получения цифровых изображений с помощью специализированного пакета программ ImageMaster 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, США).

Идентификация белков методами масс-спектрометрии

Выделение белковых фракций на пластинах ПААГ, гидролиз трипсином и экстракцию пептидов для идентификации белков с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с ионизацией на матрице (matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS) проводили, как описано ранее [12], с небольшими модификациями. Образец (0,5 мкл) смешивали на мишени с таким же объемом раствора 20 % ацетонитрила, содержащего 0,1 % трифторуксусной кислоты и 20 мг/мл 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Sigma-Aldrich, США), и высушивали на воздухе. Масс-спектры получали на MALDI-TOF-масс-спектрометре Reflex III (Bruker, США) с ультрафиолетовым лазером (336 нм) в режиме положительных ионов в диапазоне Мм от 500 до 8000 Да. При MS/MS-анализе масс-спектры фрагментов регистрировали на масс-спектрометре в тандемном режиме при детекции положительных ионов. Фрагментация ионов индуцировалась подачей гелия в область начального участка траектории свободного дрейфа ионов (давление инертного газа 2×10^{-7} Па). Погрешность измерения масс-фрагментов для MS и MS/MS не превышала 0,005 % (50 ppm). На масс-спектре присутствовали только сигналы С-концевых фрагментов пептида, претерпевших разрыв по пептидной связи (γ -ионы). Идентификацию белков проводили с помощью программы Mascot, опция Peptide Fingerprint (Matrix Science, США) с использованием программного обеспечения FlexAnalysis Software (Bruker Daltonics GmbH, Германия) и поиском различных модификаций с помощью программы BioTools в базе данных NCBI nr.

Результаты

На типичных ДЭ клеточных линий при окраске нитратом серебра регистрировалось 550–600 фракций, подавляющее большинство которых распределялось в диапазоне Мм от 170 до 10 кДа. Используемая модификация NPGE обеспечивает достаточно высокое разрешение фракционирования, в том числе и щелочных белков с $pI > 8,70$. Среди белков с $pI > 8,70$, идентифицированных на всех ДЭ культивируемых клеток опухолей человека, оказались как минимум 2 изоформы белка hnRNP A1, эукариотический фактор элонгации трансляции альфа-1 (eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, EEF1A1) и сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином (splicing factor proline- and glutamine-rich, SFPQ) (рис. 1).

На рис. 2 представлены отдельные фрагменты ДЭ белков из клеток 3 аденокарцином и 3 сарком, на которых обозначен hnRNP A1. Как видно из рис. 2, белок hnRNP A1 на всех ДЭ культивируемых клеток

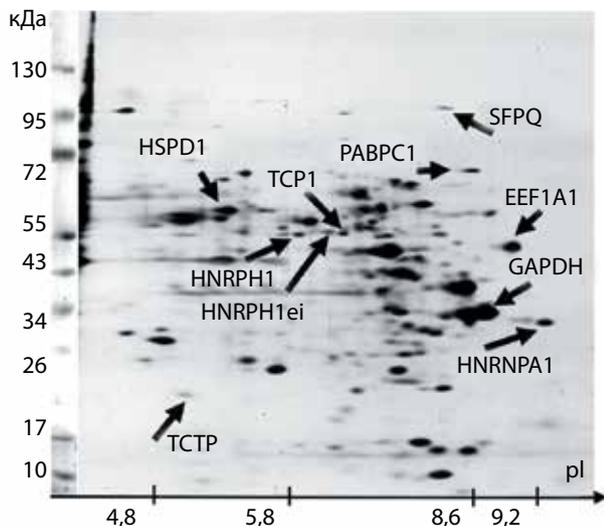


Рис. 1. Двумерная электрофорезграмма РНК-связывающих белков из культивируемых клеток линии DU-145, окраска нитратом серебра: HSPD1 – шаперонин 60; TCP1 – белок T-комплекса 1 альфа; HNRPH1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин H1; HNRPH1ei – электрофоретическая изоформа гетерогенного ядерного рибонуклеопротеина H1; TCTP – фортилин; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; SFPO – сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином; PABPC1 – полиаденилат-связывающий белок 1; EEF1A1 – эукариотический фактор элонгации трансляции альфа-1; HNRNPA1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1

злокачественных опухолей был представлен в виде нескольких изоформ и выявлялся даже при окрашивании ДЭ Кумасси бриллиантовым голубым R-250, что свидетельствует об относительно большом количестве этого белка в исследуемых биологических образцах. Таким образом, белок hnRNP A1 можно рассматривать как мажорный в опухолевых клетках. При компьютерной денситометрии самый высокий уровень белка hnRNP A1 определялся в лейомиосаркоме SK-UT-1B. Результаты идентификации hnRNP

A1 в различных клеточных линиях представлены в табл. 1. В качестве примера в табл. 1 приведены характеристики всех выявленных изоформ hnRNP A1 в линии 769-P.

Фракция hnRNP A1 на ДЭ мезенхимальных клеток выявлялась в существенно меньших количествах, чем в опухолевых клетках (рис. 3, а). В культивируемых миобластах человека фракция белка hnRNP A1 также выявлялась в меньшем количестве, чем в опухолевых клетках, причем она визуализировалась только на ДЭ клеток в стадии активной пролиферации и отсутствовала на гелях, где миобласты находятся в стадии дифференцировки (рис. 3, б и в). В миобластах и мезенхимальных стволовых клетках данная фракция выявлялась только на ДЭ, окрашенных нитратом серебра, и не определялась на ДЭ, окрашенных Кумасси бриллиантовым голубым R-250. Корректное сравнение содержания белка hnRNP A1 в нормальных мезенхимальных клетках и клеточных линиях злокачественных опухолей человека при денситометрии ДЭ, окрашенных нитратом серебра, не представлялось возможным, так как интенсивность окраски нитратом серебра зависит не только от количества белка в геле, но в значительной степени и от времени экспозиции красителя. Тем не менее, повышенное содержание белка hnRNP A1 свидетельствует об активном процессе пролиферации в клетках.

В большинстве исследованных клеточных линий белок hnRNP A1 был представлен сплайсинг-вариантом A1-A с экспериментальной Мм 33–36 кДа. В то же время фракция hnRNP A1, обнаруженная в мезенхимальных стволовых клетках человека, по электрофоретическим характеристикам и результатам масс-спектрометрической идентификации, вероятнее всего, соответствовала изоформе 2 hnRNP A1 (P09 651–3 по каталогу

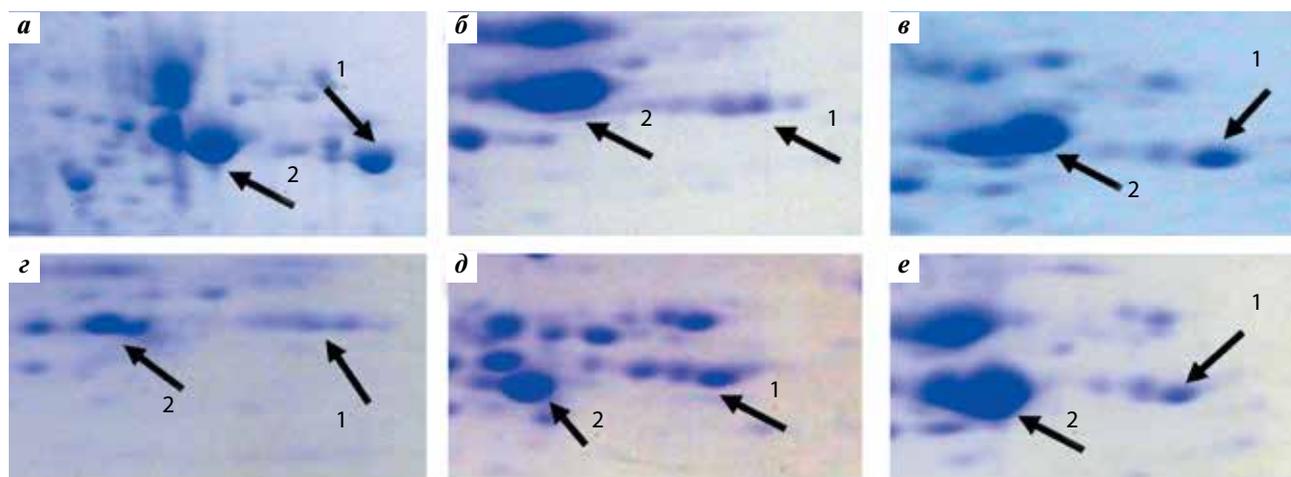


Рис. 2. Фрагменты двумерной электрофорезграммы белков из культивируемых клеток 3 линий аденокарцином и 3 линий сарком, окраска Кумасси бриллиантовым голубым R-250: а – линия DU-145; б – линия 769-P; в – линия LNCaP; г – линия U2-OS; д – линия RD; е – линия SK-UT-1B; 1 – фракция белка hnRNP A1; 2 – фракция глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (в качестве реперной точки)

Таблица 1. Результаты масс-спектрометрической идентификации hnRNP A1 в исследуемых клеточных линиях

Клеточная линия	Название белка (обозначение гена)	Номера в Protein NCBI/UniProt	S/M/C*	Мм, кДа/pI (эксп.)**	Мм, кДа/pI (расчет.)***
DU-145	Гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1 (hnRNP A1)	47939618/P09651	164/16/57	34,00/9,70	34,20/9,28
769-P			495/45/83	34,00/9,20	
			960/54/97	34,00/9,25	
			405/49/84	34,00/9,30	
LNCaP			195/20/41	33,00/9,15	
U2-OS			235/26/66	34,00/9,70	
RD			136/14/40	34,00/9,35	
SK-UT-1B			266/68/66	34,00/9,35	
SC5-MSC			349/33/79	29,40/9,35	
Миобласты	216/6/21	34,00/9,38			

*S/M/C – традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score – показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides – количество совпавших пептидов; Coverage – % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами. **Мм/pI (эксп.) – значения определены экспериментально по электрофоретическим характеристикам; Мм – молекулярная масса белка в кДа, pI – изоэлектрическая точка этого белка. ***Мм/pI (расчет.) – значения рассчитаны по аминокислотным последовательностям из базы данных UniProt с помощью программы Compute pI/Mw ExPASy с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций.

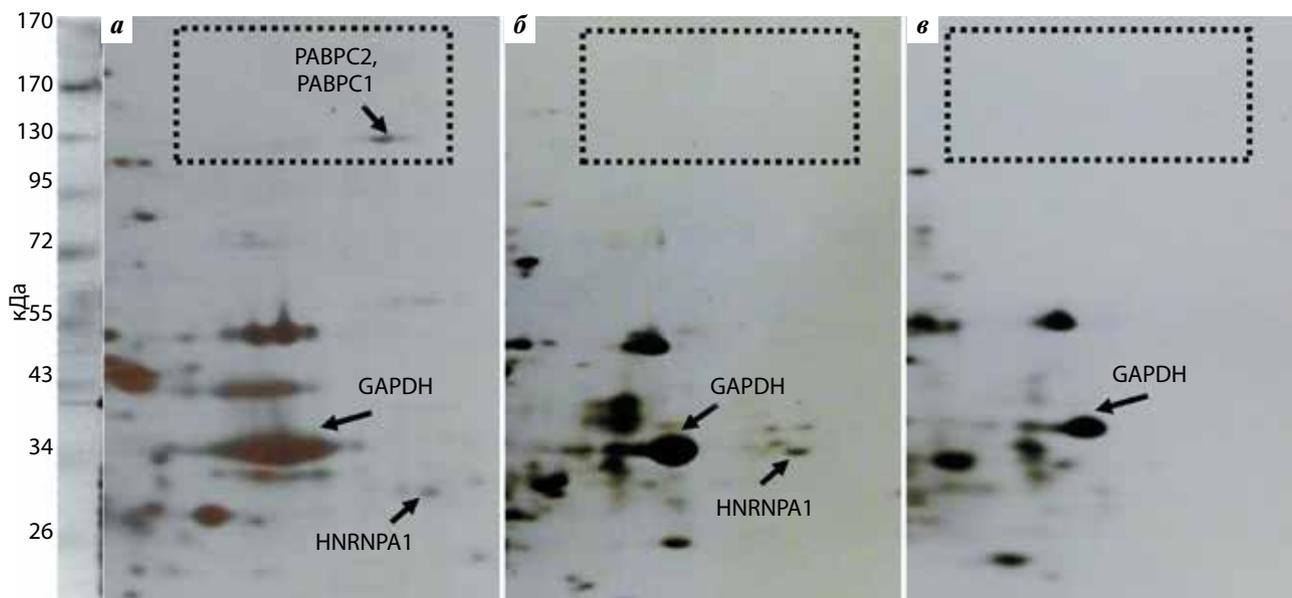


Рис. 3. Фрагменты двумерной электрофореграммы белков культивируемых незлокачественных клеток мезенхимального происхождения, окраска нитратом серебра: а – стволовые мезенхимальные клетки (SC5-MSC); б – культивируемые миобласты (нулевой день, стадия активной пролиферации); в – культивируемые миобласты (6-й день, стадия дифференцировки). PABPC1 – полиаденилат-связывающий белок 1; PABPC2 – полиаденилат-связывающий белок 2; GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; HNRNPA1 – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин A1

UniProt). Эта изоформа, о существовании которой на белковом уровне нет информации в базах данных и литературе, имеет расчетную Мм 29,4 кДа и отличается от изоформы A1-A отсутствием последовательности с 203-го аминокислотного остатка (а. о.) по 255-й а. о. Обнаруженная нами изо-

форма hnRNP A1 имела экспериментальную Мм около 29 кДа (рис. 3а).

Практически во всех изученных клеточных линиях были выявлены различающиеся по значениям pI электрофоретические изоформы белка hnRNP A1, существование которых, скорее всего, обусловлено



Рис. 4. Двумерная электрофореграмма белков из препаратов ядер клеток DU-145, цифрами 1–11 отмечены белки, участвующие в процессе сплайсинга мРНК

наличием каких-либо посттрансляционных модификаций, например, фосфорилирования. Прицельный анализ выявленных пептидов этого белка в различных линиях клеток человека не позволил обнаружить сайтов фосфорилирования. Однако в ходе масс-спектрометрического анализа электрофоретических изоформ белка hnRNP A1 в линии аденокарциномы почки 769-P удалось выявить ряд посттрансляционных модификаций, не встречавшихся в других линиях аденокарцином и сарком. В частности, диметилирование по аргинину было обнаружено сразу в нескольких выявленных пептидах, экспериментальная Мм которых отличалась от расчетной на 28 Да. По результатам тандемной масс-спектрометрии такая посттрансляционная модификация была подтверждена в 4 положениях: 194, 206, 218 и 225, соответствующих аминокислотному остатку аргинина (показатели Score 114, 49, 140 и 116 соответственно). Тем не менее эта модификация вряд ли существенно влияет на изоэлектрическую точку белка и в полной мере не может объяснить появление нескольких изоэлектрофоретических изоформ. Кроме hnRNP A1 в исследованных клеточных линиях были идентифицированы и другие представители семейства hnRNP, в частности, в клетках рака предстательной железы линии LNCaP удалось обнаружить hnRNP A2B1 и hnRNP G, в клетках PC-3 – hnRNP A2B1, в клетках доброкачественной гиперплазии предстательной железы BPH-1 – hnRNP A3, hnRNP G и hnRNP H1. Следует отметить, что в исследуемых злокачественных клетках был найден сплайсинг-фактор SFPQ – белок, выполняющий важные функции при реализации генетической информации

[15–17] и, возможно, вовлеченный в возникновение и прогрессию злокачественных опухолей [18, 19]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что белок SFPQ может представлять интерес как потенциальный биомаркер злокачественных опухолей, в том числе мезенхимального происхождения [20]. В клетках рака предстательной железы линий LNCaP и PC-3 были найдены такие участники процессов сплайсинга, как полиаденилат-связывающий белок 1 (polyadenylate-binding protein cytoplasmic 1, PABPC1) и белок NUDT21 (nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X) – type motif 21). Ранее было показано, что подавление экспрессии гена, кодирующего белок NUDT21, способствует подавлению опухолевых лимфоцитов [21]. В ряде клеточных линий, выведенных из злокачественных опухолей (LNCaP, ОКР-GS и RD), были идентифицированы 2 белка теплового шока HSPB1 (HSP 27) и HSPB5, стресс-индуцируемое фосфорилирование которых, по данным литературы, приводит к их ассоциации с ядерными пятнышками (nuclear speckles) – крупными субъядерными доменами, вовлеченными в сплайсинг РНК [22, 23].

В связи с широким динамическим диапазоном и сложным составом клеточных протеомов на общих ДЭ многие фракции ядерных белков оказываются минорными или не выявляются вовсе. Поэтому в данной работе было проведено параллельное изучение белков в препаратах ядер, полученных из культивируемых клеток аденокарцином и рабдомиосаркомы. С помощью протеомного анализа в препаратах ядерных белков при окраске нитратом серебра обычно удавалось детектировать более 400 белковых фракций. Типичная ДЭ белков из препаратов ядерных белков клеток DU-145 показана на рис. 4, и на ней отмечены те из идентифицированных белков, которые имеют отношение к процессу сплайсинга мРНК. Шесть из них оказались различными представителями семейства hnRNP, еще 2 были идентифицированы как изоформы белка SFPQ (табл. 2). Протеомное изучение ядерных белков клеток RD также позволило обнаружить белки SFPQ (S/M/C 192/15/28), hnRNP A1 (2 изоформы с S/M/C 241/21/61 и 192/18/56) и A2/B1 (2 изоформы с S/M/C 235/23/55 и 278/27/56), а кроме того, 2 изоформы белка hnRNP C1/C2 (S/M/C 144/13/32 и 121/13/29). Проведенный анализ публикаций, зарегистрированных в базе данных PubMed, не выявил сообщений об обнаружении большинства белков семейства hnRNP, перечисленных в табл. 2, в злокачественных опухолевых клетках.

Обсуждение результатов

НnRNP A1 – представитель отдельного семейства полифункциональных РНК-связывающих белков, участвующих в сплайсинге мРНК. По данным ряда

Таблица 2. Сплайсинг-белки, идентифицированные в ядерных фракциях клеток аденокарциномы линии DU-145; нумерация соответствует данным на рис. 4

№	Название белка (обозначение гена)	Номера в Protein NCBI/UniProt	S/M/C*	Мм, кДа/pI (эксп.)**	Мм, кДа/pI (расчет.)***
1	Галектин 1 (<i>LGALS1</i>)	4504981/P09382	155/9/63	14,50/5,0	14,70/5,30
2	NHP2-подобный белок 1 (<i>NHP2L1</i>)	4826860/P55769	119/7/56	14,50/9,0	14,20/8,72
3	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин A1, изоформа А (<i>hnRNP A1</i>)	4504445/P09651	180/18/57	34,00/9,50	34,20/9,27
4	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин A2/B1, изоформа A2 (<i>hnRNP A2B1</i>)	4504447/P22626	292/27/70	35,80/8,70	36,00/8,67
5	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин A2/B1, изоформа A2 (<i>hnRNP A2B1</i>), электрофоретический вариант	4504447/P22626	261/23/53	35,80/8,30	36,00/8,67
6	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин H3 (<i>hnRNP H3</i>)	7739445/P31942	206/19/80	38,00/7,05	31,50/6,76
7	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин F (<i>hnRNP F</i>)	4826760/P52597	164/16/37	48,00/5,70	45,70/5,37
8	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин H1, изоформа CRA_b (<i>hnRNP H1</i>)	119574194/P31943	216/23/44	52,00/6,95	43,70/6,47
9	Гетерогенный ядерный нуклеопротеин L, изоформа а (<i>hnRNP L</i>)	52632383/P14866	153/15/42	65,00/7,95	64,10/8,46
10	Сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином (<i>SFPQ</i>)	4826998/P23246	221/28/42	96,00/9,15	76,20/9,50
11	Сплайсинг-фактор, богатый пролином и глутамином, электрофоретическая изоформа (<i>SFPQ</i>)	4826998/P23246	116/18/41	96,00/8,70	76,20/9,50

*S/M/C – традиционные показатели идентификации, принятые в англоязычной литературе: Score – показатель соответствия или «счет очков»; Match peptides – количество совпавших пептидов; Coverage – % покрытия полной аминокислотной последовательности белка выявленными пептидами. **Мм/pI (эксп.) – значения определены экспериментально по электрофоретическим характеристикам; Мм – молекулярная масса белка в кДа, pI – изоэлектрическая точка этого белка. ***Мм/pI (расчет.) – значения рассчитаны по аминокислотным последовательностям из базы данных UniProt с помощью программы Compute pI/Mw ExPASy с учетом удаления сигнального пептида, но без учета других постсинтетических модификаций.

исследований, количественное содержание белка hnRNP A1 изменяется при опухолевой трансформации клеток, что указывает на его вовлеченность в процессы туморогенеза [24, 25]. Согласно полученным нами данным, белок hnRNP A1 присутствовал как мажорный (выявлялся даже при окрашивании ДЭ Кумасси бриллиантовым голубым R-250) практически во всех исследованных клеточных линиях злокачественных опухолей человека. В культивируемых мезенхимальных клетках и нормальных миобластах человека hnRNP A1 выявлялся в существенно меньших количествах, чем в опухолевых клетках (определялся только при окраске нитратом серебра), и исчезал после индукции дифференцировки миобластов. Таким образом, содержание белка hnRNP A1 в клетках может свидетельствовать об их пролиферативной активности. Наличие hnRNP A1 в активно пролиферирующих клетках объясняется тем, что он участвует в сплайсинге мРНК белков-регуляторов клеточной пролиферации, например, c-Src и CD44 [26]. По данным UniProtKB (Universal Protein Knowledgebase),

имеется 3 сплайсинг-варианта белка hnRNP A1. Каноническим вариантом считается изоформа A1-B (38,7 кДа, 372 а. о.), но наиболее распространена в клетках человека другая изоформа – A1-A (34,2 кДа, 320 а. о.), отличающаяся от канонической отсутствием фрагмента аминокислотной последовательности с 252-го а. о. по 303-й а. о. Соотношение изоформ A1-A и A1-B в клетках рака шейки матки HeLa составляет примерно 20 : 1 [27]. Третья изоформа – так называемая изоформа 2 (29,4 кДа, 267 а. о.) – отличается от канонической отсутствием а. о. с 203-го по 307-й, однако экспериментальное подтверждение существования данной изоформы до настоящего времени отсутствовало. При протеомном исследовании мезенхимальных стволовых клеток человека нам удалось обнаружить изоформу hnRNP A1, по электрофоретическим характеристикам и результатам масс-спектрометрической идентификации, вероятнее всего, соответствовавшую изоформе 2. Фракция на ДЭ, соответствующая этой изоформе, обладала Мм около 29 кДа и достаточно убедительными зна-

чениями показателей масс-спектрометрической идентификации (S/M/C 349/33/79). Однако для окончательного вывода о присутствии в мезенхимальных стволовых клетках человека именно изоформы 2 hnRNP A1 необходимо масс-спектрометрическое обнаружение диагностического для данной изоформы пептида и получение его спектра фрагментации.

Поскольку в большинстве изученных клеточных линий присутствовали различающиеся по значениям pI электрофоретические изоформы белка hnRNP A1, был осуществлен поиск посттрансляционных модификаций данного белка, в ходе которого в клеточной линии 769-P были обнаружены ацетилирование по серину в положении 2 и диметилирование по аргинину в положениях 194, 206, 218 и 225. Для белка hnRNP A1 метилирование по аргинину является почти столь же распространенной посттрансляционной модификацией, как фосфорилирование по серину. Очевидно, что эта стабильная модификация играет важную роль в функционировании белка. Рядом авторов было показано, что метилирование вовлечено в процессы белок-белкового взаимодействия, созревания рибонуклеопротеинов и клеточного сигналинга [28]. Все обнаруженные на данный момент сайты метилирования входят в RGG-бокс — последовательность полипептидной цепи с 190-го а. о. по 240-й а. о., богатую аргинином и глицином, которая содержит консервативный мотив связывания нуклеиновых кислот. Очевидно, метилирование hnRNP A1 на этом участке вовлечено в регуляцию связывания нуклеиновых

кислот. Действительно, ранее было показано, что способность белка связывать нуклеиновые кислоты обратно пропорциональна степени его метилирования по аргинину [29]. В базе данных UniProt сообщается о 5 сайтах метилирования белка hnRNP A1 с присоединением 2 метильных групп в 1 сайте. Сайты диметилирования по аргинину в положениях 194, 206, 218 и 225 были обнаружены у hnRNP A1, выделенного из клеток рака шейки матки HeLa [30, 31]. Нам удалось подтвердить наличие у этого белка диметилирования по аргинину в указанных позициях в клетках рака почки человека 769-P.

Заключение

Представленные результаты, свидетельствующие о присутствии в культивируемых клетках аденокарцином и сарком белка hnRNP A1 в качестве мажорного, указывают на возможную роль этого белка в реализации генетической информации в злокачественных опухолях. Участие данных белков в сплайсинге мРНК и других внутриклеточных процессах регулируется, в числе прочего, посттрансляционными модификациями, например, фосфорилированием и диметилированием. Соответственно, белок hnRNP A1, его различные изоформы, а также некоторые другие выявленные протеомными методами РНК-связывающие белки, вовлеченные в процессы сплайсинга, представляются интересными и перспективными объектами для дальнейшего изучения в трансформированных и нормальных клетках человека.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kumar A., Williams K.R., Szer W. Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem* 1986;261(24):11266–73. PMID: 3733753.
- Han S.P., Tang Y.H., Smith R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* 2010;430(3):379–92. DOI: 10.1042/BJ20100396. PMID: 20795951.
- Ford L.P., Wright W.E., Shay J.W. A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation. *Oncogene* 2002;21(4):580–3. DOI: 10.1038/sj.onc.1205086. PMID: 11850782.
- White R., Gonsior C., Bauer N.M. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) F is a novel component of oligodendroglial RNA transport granules contributing to regulation of myelin basic protein (MBP) synthesis. *J Biol Chem* 2012;287(3):1742–54. DOI: 10.1074/jbc.M111.235010. PMID: 22128153.
- Blech-Hermoni Y., Ladd A.N. RNA binding proteins in the regulation of heart development. *Int J Biochem Cell Biol* 2013;45(11):2467–78. DOI: 10.1016/j.biocel.2013.08.008. PMID: 23973289.
- Liu J., Beqaj S., Yang Y., Honoré B. et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-H plays a suppressive role in visceral myogenesis. *Mech Dev* 2001;104(1–2):79–87. PMID: 11404082.
- Chaudhury A., Chander P., Howe P.H. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA* 2010;16(8):1449–62. DOI: 10.1261/rna.2254110. PMID: 20584894.
- Ushigome M., Ubagai T., Fukuda H. et al. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int J Oncol* 2005;26(3):635–40. PMID: 15703818.
- Zhou Z.J., Dai Z., Zhou S.L. et al. Overexpression of hnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013;132(5):1080–9. DOI: 10.1002/ijc.27742. PMID: 22821376.
- Niforou K.M., Anagnostopoulos A.K., Vougas K. et al. The proteome profile of the human osteosarcoma U2-OS cell line. *Cancer Genomics Proteomics* 2008;5(1):63–78. PMID: 18359981.
- Ko C.C., Chen Y.J., Chen C.T. et al. Chemical proteomics identifies heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1 as the molecular target of quercetin in its anti-cancer effects in PC-3 cells. *J Biol Chem* 2014;289(32):22078–89. DOI: 10.1074/jbc.M114.553248. PMID: 24962584.
- Shishkin S., Kovaleva M., Ivanov A. et al. Comparative proteomic study of pro-

- teins in prostate cancer and benign hyperplasia cells. *J. Cancer Sci Ther* 2011;S1:003. DOI: 10.4172/1948.
13. Крохина Т.Б., Шишкин С.С., Раевская Г.Б. и др. Бюлл. эксп. биол. мед. 1996;122:314–7.
 14. Kovalyov L.I., Shishkin S.S., Efimochkin A.S. et al. The major protein expression profile and two-dimensional protein database of human heart. *Electrophoresis* 1995;16(7):1160–9. PMID: 7498159.
 15. Lee M., Sadowska A., Bekere I. et al. The structure of human SFPQ reveals a coiled-coil mediated polymer essential for functional aggregation in gene regulation. *Nucleic Acids Res* 2015;43(7):3826–40. DOI: 10.1093/nar/gkv156. PMID: 25765647.
 16. Rajesh C., Baker D.K., Pierce A.J. et al. The splicing-factor related protein SFPQ/PSF interacts with RAD51D and is necessary for homology-directed repair and sister chromatid cohesion. *Nucleic Acids Res* 2011;39(1):132–45. DOI: 10.1093/nar/gkq738. PMID: 20813759.
 17. Lowery L.A., Rubin J., Sive H. Whitesnake/SFPQ is required for cell survival and neuronal development in the zebrafish. *Dev Dyn* 2007;236(5):1347–57. PMID: 17393485.
 18. Dolnik A., Engelmann J.C., Scharfenberger-Schmeer M. et al. Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin remodeling and splicing. *Blood* 2012;120(18):e83–92. DOI: 10.1182/blood-2011-12-401471. PMID: 22976956.
 19. Jiang F.N., He H.C., Zhang Y.Q. et al. An integrative proteomics and interaction network-based classifier for prostate cancer diagnosis. *PLoS One* 2013;8(5):e63941. DOI: 10.1371/journal.pone.0063941. PMID: 23737958.
 20. Pashintseva N.V., Shishkin S.S., Lisitskaya K.V. et al. Study of splicing factor, proline- and glutamine-rich by proteomic techniques in human malignant and nonmalignant cell lines. *Protein Pept Lett* 2016;23(11):958–66.
 21. Gennarino V.A., Alcott C.E., Chen C.A. et al. NUDT21-spanning CNVs lead to neuropsychiatric disease and altered MeCP2 abundance via alternative polyadenylation. *Elife* 2015;8:4. DOI: 10.7554/eLife.10782. PMID: 26312503.
 22. den Engelsman J., Bennink E.J., Doerwald L. et al. Mimicking phosphorylation of the small heat-shock protein alphaB-crystallin recruits the F-box protein FBX4 to nuclear SC35 speckles. *Eur J Biochem* 2004;271(21):4195–203. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04359.x. PMID: 15511225.
 23. Vos M.J., Kanon B., Kampinga H.H. HSPB7 is a SC35 speckle resident small heat shock protein. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793(8):1343–53. DOI: 10.1016/j.bbamer.2009.05.005. PMID: 19464326.
 24. Ushigome M., Ubagai T., Fukuda H. et al. Up-regulation of hnRNP A1 gene in sporadic human colorectal cancers. *Int J Oncol* 2005;26(3):635–40. PMID: 15703818.
 25. Zhou Z.J., Dai Z., Zhou S.L. et al. Over-expression of hnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2013;132(5):1080–9. DOI: 10.1002/ijc.27742. PMID: 22821376.
 26. Rooke N., Markovtsov V., Cagavi E. et al. Roles for SR proteins and hnRNP A1 in the regulation of c-src exon N1. *Mol Cell Biol* 2003;23(6):1874–84. PMID: 12612063.
 27. Buvoli M., Cobianchi F., Bestagno M.G. et al. Alternative splicing in the human gene for the core protein A1 generates another hnRNP protein. *EMBO J* 1990;9(4):1229–35. PMID: 1691095.
 28. Liu Q., Dreyfuss G. In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1995;15(5):2800–8. PMID: 7739561.
 29. Rajpurohit R., Paik W.K., Kim S. Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *J Biochem* 1994;304(Pt 3):903–9. PMID: 7818496.
 30. Kim S., Merrill B.M., Rajpurohit R. et al. Identification of NG-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 1997;36(17):5185–92. DOI: 10.1021/bi9625509.
 31. Ong S.E., Mittler G., Mann M. Identifying and quantifying in vivo methylation sites by heavy methyl SILAC. *Nat Methods* 2004;1(2):119–26. PMID: 15782174.

АНАЛИЗ ДИНАМИКИ СУБПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК CD4⁺CD25⁺ ПРИ МЕТАСТАТИЧЕСКОМ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНОМ РАКЕ

М.С. Саяпина¹, А.А. Борунова¹, Т.Н. Заботина¹, Д.А. Носов²

¹ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 23;

²ФГБУ «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ;
Россия, 121359 Москва, ул. Маршала Тимошенко, 15

Контакты: Мария Сергеевна Саяпина maria.sayapina@mail.ru

Введение. Терапия интерфероном альфа (ИФН- α) остается возможной лечебной опцией у больных метастатическим почечно-клеточным раком (мПКР) с благоприятным и промежуточным прогнозом. Однако у ряда больных отмечается отсутствие клинического эффекта, несмотря на активацию клеточного звена противоопухолевого иммунитета. Представляет интерес изучение роли популяции супрессорных клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁺, которые, по данным различных авторов, могут подавлять противоопухолевый иммунный ответ. Повышение количества этих клеток в периферической крови обнаруживается при различных злокачественных новообразованиях.

Цель исследования — определить эффективность и переносимость ИФН- α у больных мПКР и изучить динамику субпопуляции CD4⁺CD25⁺ Т-лимфоцитов и ее связь с эффективностью терапии ИФН.

Материалы и методы. В период с 2011 по 2016 гг. 41 пациент с мПКР получал терапию ИФН- α . У 32 пациентов терапия проводилась в 1 линии, у 9 — в 2 и более. Оценка иммунологических параметров осуществлялась в течение 1 нед до начала иммунотерапии, через 2 нед после начала и через 8 нед в период контрольного обследования. Иммунофенотип лимфоцитов оценивали методом многоцветной проточной цитометрии с использованием антител, в том числе к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25 и перфорину. Статистический анализ и обработка данных выполнялись с помощью программы STATISTICA версии 13.

Результаты. Полный эффект достигнут у 2 (4,8 %) пациентов, частичный — у 9 (21,9 %) пациентов; объективный эффект (полная + частичная ремиссия) составил 26,8 %. Длительная стабилизация болезни (≥ 6 мес) отмечена у 19 (46,3 %) пациентов. Общая частота контроля над заболеванием (полная + частичная ремиссия + длительная стабилизация) составила 73,1 %. Медиана времени до прогрессирования составила 8 мес ($p = 0,03$). У пациентов с объективным ответом исходное содержание CD4⁺CD25⁺-популяции Т-лимфоцитов было практически в пределах донорских показателей ($3,5 \pm 2,1$ %) и составляло $4,4 \pm 3,0$ % ($p < 0,05$), в то время как у пациентов с прогрессированием заболевания исходное содержание этой субпопуляции Т-лимфоцитов было в 3 раза выше: $12,1 \pm 8,0$ %. При этом следует отметить тенденцию к снижению содержания данной субпопуляции на фоне лечения в группе с клиническим эффектом.

Заключение. Исходно повышенное содержание субпопуляции CD4⁺CD25⁺-Т-лимфоцитов в периферической крови больных может являться отрицательным прогностическим фактором при иммунотерапии ИФН- α , вероятнее всего за счет иммунорегуляторной субпопуляции CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127^{low}-Т-клеток (Treg). Целесообразно дальнейшее исследование данной субпопуляции Т-клеток как потенциального маркера эффективности иммунотерапевтического подхода.

Ключевые слова: Т-регуляторные клетки, интерферон альфа, метастатический почечно-клеточный рак

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-91-96

ANALYSIS OF CHANGES IN SUBPOPULATION OF T-REGULATORY CELLS CD4⁺CD25⁺ IN METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA

M.S. Sayapina¹, A.A. Borunova¹, T.N. Zabolina¹, D.A. Nosov²

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

²Central Clinical Hospital, Administration of President of Russia; 15 Marshala Timoshenko Str., Moscow 121359, Russia

Introduction. Treatment with interferon alpha (IFN- α) is a possible therapeutic option in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) with favorable and intermediate prognosis. However, in some patients there is a lack of clinical effect despite the activation of the cellular component of anti-tumor immunity. According to various authors the CD4⁺CD25⁺ suppressor cells may suppress anti-tumor immune response, and their study is of scientific interest. Increasing the number of these cells in the peripheral blood was found at various malignancies.

Objective. To study the efficiency and tolerance of IFN- α in patients with mRCC and to examine changes in subpopulation of CD4⁺CD25⁺ T-lymphocytes and their association with the efficiency of the therapy.

Materials and methods. Forty-one patients with mRCC received IFN- α in 2011 to 2016. Therapy was performed in the 1st line in 32 patients and in the 2nd line in 9 patients. Evaluation of immunological parameters was carried out within 1 week prior to immunotherapy, 2 weeks after the beginning and after 8 weeks in the control examination period. The immunophenotype of lymphocytes was assessed by multi-color flow cytometry using antibodies, including CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25 and perforin. Statistical analysis and data processing was performed using STATISTICA program (version 13).

Results. The complete effect was achieved in 2 (4.8 %) patients, partial regressions were recorded in 9 (21.9 %) patients, and long (>6 months) stabilizations of a tumor process were observed in other 19 (46.3 %) patients. The overall rate of disease control (complete + partial regressions + long stabilizations) was 73.1 %. The median time to progression was 8 months ($p = 0.03$). The baseline count of CD4⁺CD25⁺ T-lymphocytes in patients with an objective response was almost within the donor group (3.5 ± 2.1 %) and amounted to 4.4 ± 3.0 % ($p < 0.05$). The baseline count of this subpopulation of cells was thrice greater in patients with the progressive disease: 12.1 ± 8.0 %. It should be noted a tendency to reduce this count during therapy in the group with clinical effect.

Conclusion. The baseline count of subpopulations of CD4⁺CD25⁺ T-lymphocytes in the peripheral blood of patients can be a negative prognostic factor in immunotherapy IFN- α , most likely due to immunoregulatory subpopulations of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127^{low}-T-cells (Treg). It is advisable to further study this subpopulation of T-cells as a potential marker of the effectiveness of immunotherapeutic approaches.

Key words: T-regulatory cells CD4⁺CD25⁺, interferon alpha, metastatic renal cell carcinoma

Введение

В настоящее время установлено, что важную роль в индукции не только ауто толерантности, но и толерантности к опухолевым клеткам играет немногочисленная популяция регуляторных (супрессорных) CD4⁺CD25⁺-Т-клеток (Treg), которые предупреждают развитие различных аутоиммунных поражений, а также способны эффективно подавлять противоопухолевый иммунитет [1–3].

Характеристики Treg: роль FOXP3⁺

Treg-клетки впервые выявлены по экспрессии CD25, который представляет собой α -цепь высокоаффинного рецептора к интерлейкину-2 (interleukin-2, IL-2). В крови человека определяется примерно 4–6 % CD4⁺CD25⁺-Т-клеток с высоким уровнем экспрессии CD25, обладающих супрессорной функцией. Однако CD25 может кратковременно экспрессироваться и на активированных CD4⁺CD25⁺-эффекторных Т-клетках, что осложняет точное определение Treg-клеток. Позднее была выявлена субпопуляция CD4⁺CD25^{high}-Т-клеток, которые и осуществляют супрессорные функции, тогда как клетки с низкой экспрессией α -цепи рецептора IL-2 – CD4⁺CD25^{low} – регуляторной функцией не обладают и, очевидно, представляют собой эффекторные CD4⁺-Т-клетки в стадии активации [4, 5]. В последующем был описан ген, локализованный в хромосоме X, FOXP3 (forkhead box P3), который контролирует развитие и функционирование Treg-клеток и выявляется главным образом в ядре Treg [1, 6]. Связываясь с ДНК, FOXP3 действует как репрессор транскрипции, выступая антагонистом функций NFAT (nuclear factor of activated T-cells), играющего основную роль в экспрессии генов ряда цитокинов, продуцируемых периферическими Т-клетками. В результате FOXP3 ингибирует

продукцию провоспалительных цитокинов. Дефект Treg-клеток вследствие мутации гена FOXP3 вызывает развитие тяжелого аутоиммунного синдрома IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome – синдром X-сцепленной иммунной дисрегуляции, полиэндокринопатии и энтеропатии) – наследственного заболевания у детей [7]. Однако FOXP3 также может временно выявляться у эффекторных Т-клеток в ходе их активации. В последние годы выявлен негативный маркер Treg-клеток, CD127, α -цепь рецептора IL-7 (IL-7R α) [8], который экспрессируется на эффекторных, но не на регуляторных Т-клетках. Фенотип Treg при использовании этого маркера можно представить как CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺CD127^{low}, таким образом появилась возможность дифференцировать Treg и эффекторные CD4⁺CD25⁺-Т-клетки.

Популяция CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Т-клеток считается минорной, и содержание Treg-клеток в периферической крови составляет около 5–10 % от CD4⁺-Т-клеток у мышей и человека [9].

Известно несколько субпопуляций регуляторных Т-клеток: *натуральные*, возникающие в тимусе регуляторные Т-клетки CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (Treg); *индуцируемые* регуляторные Т-клетки 1-го типа (Treg-1), образованные на периферии, продуцирующие IL-10 и трансформирующий ростовой фактор бета (transforming growth factor beta, TGF- β), которые подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов; Т-лимфоциты *хелперы 3-го типа* (Th³), которые возникают на периферии и опосредуют супрессию через секрецию TGF- β . Поскольку Treg-1 и Th³ не имеют своего уникального Т-клеточного маркера, они могут быть идентифицированы только по функциональной активности в экспериментальных условиях [10].

Основной субпопуляцией CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ регуляторных Т-клеток считаются естественные,

или натуральные, регуляторные Т-клетки (nTreg). Эти клетки формируются в процессе нормальной дифференцировки в тимусе, а не под действием антигенной стимуляции. На мышинных моделях установлено, что тимические стромальные клетки, включая кортикальные и медуллярные тимические эпителиальные клетки и дендритные клетки, способствуют дифференциации и селекции Treg-клеток. Также в тимическом микроокружении необходимо присутствие IL-2 и IL-7 для развития Treg-клеток у мышей [6, 11].

Среди CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg-клеток встречаются индуцированные на периферии адаптивные Treg-клетки (iTreg). Показано, что FOXP3⁺Treg-клетки могут индуцироваться *in vitro* у человека из наивных CD4⁺-Т-клеток стимуляцией Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR) в присутствии TGF-β. Такие FOXP3⁺iTreg-клетки экспрессируют маркеры, ассоциированные с регуляторным фенотипом (CD25, CTLA4 и CD127^{low}), имеют способность к супрессии, но не проявляют характерного для CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺nTreg профиля генной транскрипции. Таким образом, обе эти субпопуляции – индуцированные на периферии iTreg-клетки и тимус-производные nTreg-клетки – экспрессируют *FOXP3* и подавляют иммунный ответ через контактзависимый механизм и продукцию растворимых факторов, включая цитокины TGF-β, IL-10 и IL-35. Однако естественные CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg-клетки отличаются устойчивостью в отношении поддержания регуляторной функции и экспрессии *FOXP3* на периферии [6, 12].

На данный момент существует несколько способов отличить натуральные Treg-клетки от индуцируемых на периферии. Так, для Treg-клеток характерна экспрессия CD45RO – маркера клеток памяти, однако было показано, что существует субпопуляция Treg, на мембране которых выявляется CD45RA, маркер наивных Т-клеток, что указывает на их тимусное происхождение и позволяет отличить их от натуральных Treg-клеток [5]. Также был выявлен полностью деметилированный промоторный регион гена *FOXP3*, который уникален для натуральных Treg-клеток тимусного происхождения [13]. Р.С. Janson и соавт., а также U. Varon и соавт. предполагают, что это является причиной нестабильной экспрессии *FOXP3* в Т-клетках [14, 15]. А. Thornton и соавт. описали транскрипционный фактор Helios, член семейства Ikaros, который четко разделяет популяцию FOXP3⁺Treg-клеток на 2 группы: FOXP3⁺Helios⁺nTreg и FOXP3⁺Helios⁻iTreg-клетки. Было продемонстрировано, что абсолютно все CD4⁺CD8⁻FOXP3⁺-тимциты экспрессировали этот транскрипционный фактор. Ни мышинные, ни человеческие натуральные Т-клетки, *in vitro* индуцированные к экспрессии *FOXP3* TCR-стимуляцией

в присутствии TGF-β, не экспрессировали Helios [13]. Поэтому транскрипционный фактор Helios был предложен в качестве маркера nTreg-клеток тимусного происхождения. Наконец, установлено, что для CD25⁺FOXP3⁺iTreg-клеток, индуцированных *in vivo*, отмечается высокий уровень экспрессии транскрипционного кофактора HOPX (homeobox only protein homeobox). HOPX экспрессируется в nTreg-клетках в 3 раза меньше, чем в iTreg-клетках. HOPX-дефицитные iTreg-клетки теряли способность к супрессии, в то время как для функционирования nTreg-клеток HOPX не требовался [16].

До настоящего времени специфический поверхностный маркер для Treg-клеток не определен. Регуляторные Т-клетки экспрессируют целый ряд функциональных молекул. Среди них в качестве клеточных маркеров Treg-клеток используют CD25 (α-цепь рецептора IL-2, IL-2Rα), CTLA-4 (CD152, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), GITR (glucocorticoidinduced TNF-receptor-related protein), CD95 (FAS), CD127^{low} (IL-7Rα), PD-1 (programmed cell death protein 1), TIM-3 (T-cell membrane protein 3), A2aR (adenosine A2a receptor), *LAG-3* (lymphocyte activation gene 3) и другие, поскольку они конститутивно экспрессируются регуляторными Т-клетками. Однако следует иметь в виду, что эти молекулы могут экспрессироваться и другими Т-клетками на определенных этапах дифференцировки. Так, молекулы CD25, CD69, CD127, CD45RO обнаруживаются и на Т-эффекторах. Также показано, что экспрессия таких маркеров, как CD39, CD73, CD101, GITR, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB), CD278 (ICOS) и CD120b (TNF RII), не находится в постоянной корреляции с экспрессией ключевого транскрипционного фактора Treg-клеток *FOXP3* [11, 17]. Таким образом, пул регуляторных Т-клеток крайне гетерогенен и одной из основных задач является определение специфического поверхностного маркера для более точного понимания свойств Т-регуляторных клеток, механизмов супрессорного воздействия, а также возможности их клинического применения.

Экспрессия регуляторными Т-клетками хемокиновых рецепторов имеет большое значение в привлечении и накоплении этих клеток в места локализации опухоли [9]. У онкологических больных отмечается увеличенное количество CD4⁺CD25^{high}Treg-клеток в периферической крови, опухолевом микроокружении, регионарных лимфатических узлах, опухолевой ткани, асцитной жидкости. Причем опухолевые клетки могут способствовать экспансии nTreg-клеток в опухолевое микроокружение [18]. В исследовании S.A. Siddiqui и соавт. было продемонстрировано, что у больных почечно-клеточным раком инфильтрация опухоли CD4⁺CD25⁺FOXP3-клетками ассоциирована с высоким уровнем смертности, распространен-

Клиническая эффективность терапии интерфероном альфа в зависимости от количества предшествующих линий у пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком, n (%)

Эффект	1 линия терапии (n = 32)	2 линии терапии и более (n = 9)	Во всей группе (n = 41)
Полный эффект	1 (2,4)	1 (2,4)	2 (4,8)
Частичный эффект	6 (14,6)	3 (7,3)	9 (21,9)
Стабилизация (≥6 мес)	18 (43,9)	1 (2,4)	19 (46,3)
Прогрессирование	7 (17)	4 (9,8)	11 (26,8)

ными стадиями TNM (TNM Classification of Malignant Tumours), большим размером опухоли и развитием внутри нее коагуляционного некроза, тогда как все эти признаки имеют независимое прогностическое значение для показателей смертности [19]. Также отмечено, что уровень CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg-клеток в периферической крови этих больных превышает донорские показатели, что может являться причиной подавления противоопухолевого иммунного ответа [20]. Более того, у больных метастатическим почечно-клеточным раком (мПКР) с повышенной экспансией CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺Treg-клеток в периферической крови ответ на вакцинотерапию и цитокинотерапию значительно хуже [21].

Материалы и методы

В период с 2011 по 2016 гг. в отделении клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России 41 пациент с мПКР получал лечение интерфероном альфа (ИФН-α) в дозе 6×10^6 МЕ/сут п/к 3 раза в неделю. Оценка иммунологических параметров осуществлялась в лаборатории клинической иммунологии опухолей ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России в течение 1 нед до начала иммунотерапии, через 2 нед после начала и через 8 нед в период контрольного обследования. Иммунофенотип лимфоцитов периферической крови онкологических больных и здоровых доноров (n = 15) оценивали методом многоцветной проточной цитометрии с использованием коммерческих моноклональных антител (Vecton Dickinson, США) к CD3, CD4, CD8, CD16, CD20, CD25 и перфорину, конъюгированных флуоресцеина изотиоцианатом, фикоэритрином и фикоэритрин-цианином. В работе было использовано трехцветное окрашивание поверхностных антигенов лимфоцитов.

Статистический анализ и обработка данных выполнялась с помощью программы STATISTICA версии 13. При сравнении иммунологических показателей использовались непарный W-критерий Уилкоксона, T-критерий Стьюдента

и метод дисперсионного анализа (analysis of variance, ANOVA). Различия считались значимыми при $p < 0,05$ (p двусторонний). Время до прогрессирования определялось с помощью метода Каплана – Мейера от даты начала иммунотерапии до даты регистрации прогрессирования или смерти от любой причины.

Результаты и их обсуждение

Эффективность иммунотерапии ИФН-α оценена у 41 пациента с мПКР. Полный эффект достигнут у 2 (4,8 %) пациентов, частичный – у 9 (21,9 %) пациентов; объективный эффект (полная + частичная ремиссии) составил 26,8 %. Длительная стабилизация болезни (≥6 мес) отмечена у 19 (46,3 %) пациентов. Общая частота контроля над заболеванием (полная + частичная ремиссии + длительная стабилизация) составила 73,1 %. У 32 пациентов терапия ИФН-α проводилась в 1 линию, у 9 – в 2 и более. Эффективность терапии в зависимости от количества предшествующих линий представлена в таблице.

На момент иммунотерапии у всех пациентов определялись метастазы различной локализации, среди которых наиболее частой являлись легкие (63,4 %).

Для всей группы из 41 пациента медиана выживаемости от начала иммунотерапии до прогрессирования заболевания составила 8 мес (рис. 1). Медиана времени наблюдения за больными, которые живы и продолжают наблюдаться, достигла 48 мес (от 24 до 60 мес).

Во время проведения иммунотерапии не было отмечено признаков токсичности III–IV ст. выраженности. Чаще всего отмечался гриппоподобный синдром, основным его проявлением было повышение температуры тела, зафиксированное у 92,6 % пациентов, из них I ст. выраженности – у 73 %, с ее пиком через 2–5 ч после введения ИФН-α. Озноб отмечался у 85,3 % пациентов, из них I ст. выраженности – у 60,9 %. Головная боль наблюдалась у 36,5 % пациентов, из них II ст. выраженности – у 12,2 %. Астения была у 20,6 % пациентов, из них II ст. выраженности – у 4,6 %. Снижение аппетита

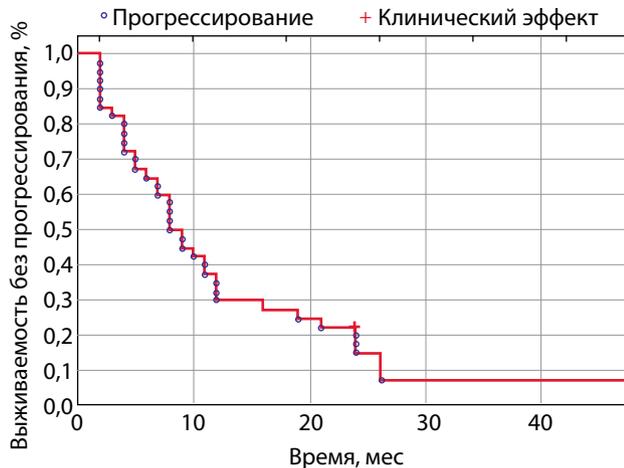


Рис. 1. Выживаемость без прогрессирования у пациентов с метастатическим почечно-клеточным раком, получающих интерферон альфа. Медиана 8 мес ($n = 41$), 95 % доверительный интервал (2,2–24)

отмечали 24,3 % пациентов, из них существенное (II ст. выраженности) – 2 (4,8 %) пациента. Выраженной гематологической токсичности не наблюдалось. Необходимо отметить, что побочные эффекты терапии ИФН- α были незначительными и не ухудшали качество жизни больных.

Исходное содержание $CD4^+CD25^+$ -популяции Т-лимфоцитов у пациентов с объективным эффектом было практически в пределах донорских показателей ($3,5 \pm 2,1$ %) и составляло $4,4 \pm 3,0$ % ($p < 0,05$), в то время как у пациентов с прогрессированием заболевания исходное содержание этой субпопуляции Т-лимфоцитов было в 3 раза выше: $12,1 \pm 8,0$ %. При этом следует отметить тенденцию к снижению содержания данной субпопуляции на фоне лечения в группе с клиническим эффектом (рис. 2).

Полученные данные в целом соответствуют результатам других клинических исследований, в которых изучалось значение исходного уровня Treg в качестве фактора, прогнозирующего эффективность иммунотерапевтических подходов при мПКР [22, 23].

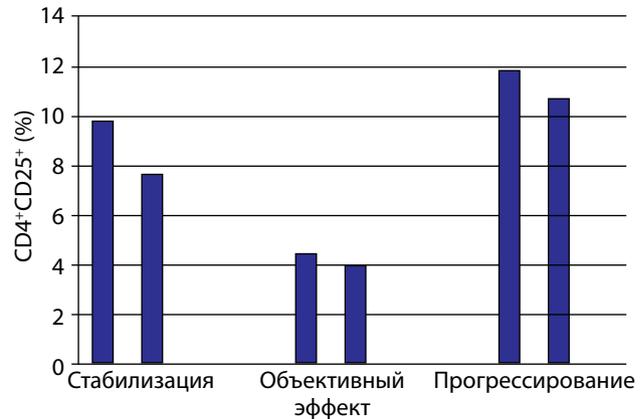


Рис. 2. Содержание $CD4^+CD25^+$ -Т-лимфоцитов в периферической крови больных метастатическим почечно-клеточным раком с наличием объективного эффекта и стабилизацией и больных с прогрессированием заболевания до начала иммунотерапии и через 2 мес

Заключение

Отсутствие клинического эффекта, несмотря на активацию клеточного звена противоопухолевого иммунитета, может быть связано с исходно повышенным содержанием в периферической крови супрессорной популяции Т-лимфоцитов с фенотипом $CD4^+CD25^+$. У больных мПКР с объективным эффектом исходное содержание $CD4^+CD25^+$ -популяции Т-лимфоцитов было практически в пределах донорских показателей ($3,5 \pm 2,1$ %) и составляло $4,4 \pm 3,0$ % ($p < 0,05$), в то время как у больных с прогрессированием заболевания исходное содержание этой субпопуляции Т-лимфоцитов было в 3 раза выше: $12,1 \pm 8,0$ %. Таким образом, исходно повышенное содержание субпопуляции $CD4^+CD25^+$ -Т-лимфоцитов в периферической крови больных может являться отрицательным прогностическим фактором иммунотерапии ИФН- α , вероятнее всего за счет иммунорегуляторной субпопуляции $CD4^+CD25^+FOXP3^+CD127^{low}$ -Т-клеток (Treg). Целесообразно дальнейшее исследование данной субпопуляции Т-клеток как потенциального маркера эффективности иммунотерапевтического подхода.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sakaguchi S. Naturally arising FOXP3-expressing $CD25^+CD4^+$ regulatory T-cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunology* 2005;6(4):345–52. DOI: 10.1038/ni1178. PMID: 15785760.
2. Wei W.Z., Morris G.P., Kong Y.C. Anti-tumor immunity and autoimmunity: a balancing act of regulatory T-cells. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53(2):73–8. DOI: 10.1007/s00262-003-0444-1. PMID: 14610619.
3. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. Иммунорегуляторные $CD25^+CD4^+$ -Т-клетки. Российский биотерапевтический журнал 2006;5(2):13–20.
4. Baecher-Allan C., Brown J., Freeman G. et al. $CD4^+CD25^{high}$ regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167(3):1245–53. PMID: 11466340.
5. Быковская С.Н., Карасев А.В., Лохонина А.В., Клейменова Е.Б. Анализ Т-регуляторных клеток $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ при аутоиммунных заболеваниях. Молекулярная медицина 2013;3:20–8.
6. Sakaguchi S., Miyara M., Costantino C.M., Hafler D.A. FOXP3⁺ regulatory T-cells

- in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10(7):490–500.
DOI: 10.1038/nri2785. PMID: 20559327.
7. Gambineri E., Torgerson T., Ochs H. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(4):430–5. PMID: 12819471.
 8. Liu W., Putnam A., Xu-Yu Z. et al. CD127 expression inversely correlates with FOXP3 and suppressive function of human CD4⁺Treg cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1701–11.
DOI: 10.1084/jem.20060772. PMID: 16818678. PMID: 16818678. PMID: 16818678.
 9. Yang Z.Z., Ansell S.M. The role of Treg-cells in the cancer immunological response. *Am J Immunol* 2009;5(1):17–28.
 10. Lyez-Hoyos M., Segundo D., Arias M. Cellular immunotolerance in the transplant. *Adv Exp Med Biol* 2012;741:44–59.
DOI: 10.1007/978-1-4614-2098-9_4. PMID: 22457102.
 11. Жулай Г.А., Олейник Е.К. Регуляторные Т-лимфоциты CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺. Перспективы применения в иммунотерапии. Труды Карельского научного центра РАН 2012;2:3–17.
 12. Workman C., Szymczak-Workman A., Collison L. et al. The development and function of regulatory T-cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(16):2603–22.
DOI: 10.1007/s00018-009-0026-2. PMID: 19390784. PMID: 19390784. PMID: 19390784.
 13. Thornton A., Korty P., Tran D. et al. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced FOXP3⁺ T-regulatory cells. *J Immunol* 2010;184(7):3433–41.
DOI: 10.4049/jimmunol.0904028. PMID: 20181882. PMID: 20181882. PMID: 20181882.
 14. Baron U., Floess S., Wieczorek G. et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T-cells from activated FOXP3⁺ conventional T-cells. *Eur J Immunol* 2007;37(9):2378–89.
DOI: 10.1002/eji.200737594. PMID: 17694575.
 15. Janson P.C., Winerdal M.E., Marits P. et al. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. *PLoS One* 2008;3(2):e1612.
DOI: 10.1371/journal.pone.0001612. PMID: 18286169.
 16. Hawiger D., Wan Y.Y., Eynon E.E., Flavell R.A. Homeodomain only protein is required for the function of induced regulatory T-cells in dendritic cell-mediated peripheral T-cell unresponsiveness. *Nat Immunol* 2010;11(10):962–8.
DOI: 10.1038/ni.1929. PMID: 20802482.
 17. Tran D.Q., Andersson J., Hardwick D. et al. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3⁺ regulatory T-cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 2009;113(21):5125–33.
DOI: 10.1182/blood-2009-01-199950. PMID: 19299332.
 18. Elkord E., Sharma S., Burt D.J., Hawkins R.E. Expanded subpopulation of FOXP3⁺ T-regulatory cells in renal cell carcinoma co-express Helios, indicating they could be derived from natural but not induced Tregs. *Clin Immunol* 2011;140(3):218–22.
DOI: 10.1016/j.clim.2011.04.014. PMID: 21570917.
 19. Siddiqui S.A., Frigola X., Bonne-Annee S. et al. Tumor-infiltrating FOXP3⁺ CD4⁺CD25⁺ T-cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):2075–81.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2139. PMID: 17404089.
 20. Cesana G.C., DeRaffae G., Cohen S. et al. Characterization of CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(7):1169–77.
DOI: 10.1200/JCO.2005.03.6830. PMID: 16505437.
 21. Schwarzer A., Wolf B., Fisher J.L. et al. Regulatory T-cells and associated pathways in metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients undergoing DC-vaccination and cytokine-therapy. *PLoS One* 2012;7(10):e46600.
DOI: 10.1371/journal.pone.0046600. PMID: 23118856.
 22. Finke J.H., Rini B., Ireland J. et al. Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2008;14(20):6674–82.
DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-5212. PMID: 18927310.
 23. Носов Д.А. Метастатический рак почки: новые лекарственные возможности и рациональные лечебные подходы. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 2012. 201 с.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ДИСЛИПИДЕМИИ АТОРВАСТАТИНОМ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ ИЗ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ

С.П. Крыжановский¹, Б.И. Гельцер², Т.А. Кузнецова³, Е.В. Персиянова^{1,3}, Т.С. Запорожец^{1,3}

¹ФГБУЗ «Медицинское объединение Дальневосточного отделения РАН»; Россия, 690022 Владивосток, ул. Кирова, 95;

²ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», Школа биомедицины;
Россия, 690922 Владивосток, о. Русский, пос. Аякс, Кампус ДВФУ, корп. М25;

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова»;
Россия, 690087 Владивосток, ул. Сельская, 1

Контакты: Елена Викторовна Персиянова helen-pers@yandex.ru

Введение. Перспективным направлением липидкорректирующей терапии является комплексное применение биологически активных веществ из морских гидробионтов.

Цель исследования – сравнительная оценка липидкорректирующего действия фуколама и маристима – препаратов на основе биологически активных веществ из морских гидробионтов – индивидуально и в комплексе с аторвастатином у пациентов с дислипидемией (ДЛП).

Материалы и методы. В исследование включены 250 пациентов с ДЛП и 40 практически здоровых доноров, использованы препараты аторвастатин, фуколам, маристим. В сыворотке крови определяли уровни показателей липидного спектра.

Результаты. У пациентов с ДЛП гиполипидемическое действие фуколама на фоне базисной терапии реализуется путем постепенного снижения уровня общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности, триглицеридов до контрольных значений. Эффективность фуколама сопоставима с таковой аторвастатина в дозе 10 мг/сут. Комплекс «фуколам – маристим» оказывает гиполипидемическое действие при выраженной гиперлипидемии.

Выводы. Комбинированная терапия с использованием биологически активных веществ природного происхождения может быть одним из путей повышения эффективности гиполипидемической терапии. Разработан алгоритм дифференцированной коррекции ДЛП путем включения в комплекс лечения фуколама и маристима.

Ключевые слова: дислипидемия, липиды крови, статины, фукоиданы, биологически активные комплексы из икры морских ежей

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-97-102

THE EFFECTIVENESS OF COMBINED THERAPY OF DYSLIPIDEMIA BY ATORVASTATIN AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM MARINE HYDROBIONTS

S.P. Krizhanovsky¹, B.I. Geltser², T.A. Kuznetsova³, E.V. Persyanova^{1,3}, T.S. Zaporozhets^{1,3}

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

²Far Eastern Federal University, School of biomedicine; M25 Build., FEFU Campus, Ayaks, Russky Island, Vladivostok 699922, Russia;

³G.P. Somov Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 1 Selskaya Str., Vladivostok 690087, Russia

Introduction. The perspective direction in therapy of dyslipidemia (DLP) is a complex application of biologically active substances from marine hydrobionts.

Objective. The purpose of research – to compare the lipidcorrective action of preparates based on biologically active substances from marine hydrobionts – fukolam and maristim – individually and in combination with atorvastatin in patients with DLP.

Materials and methods. 250 patients with DLP and 40 healthy donors were included in research. As medicines atorvastatin, fukolam, maristim were used. In the blood serum the levels of lipid spectrum were determined.

Results. Hypolipidemic action of fukolam in complex of basic therapy of patients with DLP was implemented by gradually reducing the total cholesterol, cholesterol of low-density lipoproteins, triglycerides levels to control values. The efficacy of fukolam was comparable with that of atorvastatin in a daily dose of 10 mg. Complex of «fukolam–maristim» showed hypolipidemic effect in severe hyperlipidemia.

Conclusions. Combined therapy with use of bioactive substances of natural origin may be one of the way to improve the efficiency of hypolipidemic therapy. We have developed the algorithm of differential correction of DLP by inclusion the fukolam and maristim in complex therapy.

Key words: dyslipidemia, blood lipids, statins, fucoidan, biologically active complexes from sea urchin eggs

Введение

Наиболее распространенным и эффективным классом лекарственных препаратов (ЛП), используемых в настоящее время для воздействия на липидный обмен, являются статины. Однако при длительном применении, а также при использовании в больших дозах они способны вызывать ряд достаточно серьезных побочных эффектов; отдельным группам пациентов эти ЛП вообще противопоказаны. Кроме того, у некоторых пациентов статины не оказывают липидснижающего эффекта [1, 2].

В связи с этим перспективным направлением липидкорректирующей терапии является комплексное применение статинов и липидснижающих препаратов, полученных из природных источников, которые бы служили защитой липопротеинов низкой плотности от окисления и позволяли при этом снижать дозу статина. Несмотря на постоянное пополнение фармакологического рынка новыми ЛП, остается актуальным поиск новых безвредных и эффективных средств гиполипидемической терапии из природных источников.

Большой интерес в этом плане представляют сульфатированные полисахариды (ПС) морских водорослей, в частности фукоиданы бурых водорослей и биологически активные комплексы из икры морских ежей.

Фукоиданы, характеризующиеся отсутствием токсичности и побочных эффектов, обладают широким спектром биологической активности, включая гиполипидемическую и антиоксидантную, в связи с чем их предлагают для коррекции дислипидемии (ДЛП) [3–6]. Кроме того, они обладают противовоспалительным, иммуномодулирующим действием, являются ингибиторами пролиферации гладкомышечных клеток сосудов, уменьшают гиперплазию интимы сосудов, снижают массу тела [7–9].

Большой интерес для медицины представляют и биологически активные вещества (БАВ) морских ежей. В клинических и экспериментальных исследованиях они проявляли противовоспалительное, антидиабетическое, гиполипидемическое, антиоксидантное действие и поэтому рекомендуются к использованию в комплексном лечении и для профилактики большого количества заболеваний [10].

Ранее нами в эксперименте было показано, что фукоидан – сульфатированный ПС бурой водоросли *Fucus evanescens* и маристим – комплекс БАВ из морских ежей – оказывают выраженное гиполипидемическое, антиоксидантное и противовоспалительное действие [11].

В настоящее время нет ЛП на основе сульфатированных ПС водорослей и биологически активных комплексов из икры морских ежей в связи с трудностями, связанными с получением стандартных образцов

этих БАВ [10, 12]. Однако за рубежом и в нашей стране для коррекции липидного обмена активно используют экстракты водорослей, содержащие комплекс БАВ, в том числе фукоиданы, которые нормализуют липидный профиль сыворотки крови, препятствуют развитию ожирения, а также улучшают состояние сердечно-сосудистой системы [9, 13]. На основе икры морских ежей также предлагают различные ЛП [14].

Целью работы явилась сравнительная оценка липидкорректирующего действия фуколама и маристима – препаратов на основе БАВ из морских гидробионтов – индивидуально и в комплексе с разными дозами аторвастатина у пациентов с ДЛП.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 250 пациентов с ДЛП в возрасте от 45 до 70 лет (средний возраст $60,0 \pm 1,3$ года), из них мужчин – 71 (28,4 %), женщин – 179 (71,6 %). Все пациенты находились на стационарном лечении в ФГБУЗ «Медицинское объединение Дальневосточного отделения РАН» (МО ДВО РАН) в период 2009–2013 гг. Пациенты, получавшие лечебные комплексы с включением фуколама и маристима (179 человек), наблюдались в дальнейшем в поликлинике МО ДВО РАН в течение 6 мес. Контрольную группу составили 40 практически здоровых людей (14 мужчин и 26 женщин) того же возраста.

В исследование включали пациентов с ДЛП, получающих по показаниям базисную терапию и не получавших ранее или получавших статины более 1 мес до участия в исследовании. Пациентов включали в исследование после подписания на добровольной основе письменного информированного согласия.

Критериями исключения пациентов из исследования служили наличие первичной ДЛП; острой коронарной патологии; хронической сердечной недостаточности III–IV функциональных классов; обострение хронических заболеваний сердечно-сосудистой, бронхолегочной, мочевыделительной, пищеварительной систем; эндокринных заболеваний (гипотиреоз; сахарный диабет I или II типа); заболеваний гепатобилиарной системы; хронической почечной недостаточности (уровень креатинина >220 мкмоль/л).

Исследование имело параллельный дизайн, было простым, открытым, контролируемым. Курс терапии с включением фуколама продолжался 6 мес, с использованием маристима – 1 мес. Результаты биохимических исследований оценивали через 30, 90 и 180 дней (при использовании фуколама, а также комплекса «фуколам – маристим») и через 30 дней (при использовании маристима) после начала курса терапии. Все пациенты получали базисную терапию, назначаемую по показаниям. Базисная терапия включала в себя препараты калия, селективные β -адреноблокаторы, антагонисты кальция.

Было сформировано 8 групп пациентов: группы 1 и 2 – пациенты, получающие аторвастатин в дозе 10 и 20 мг/сут соответственно; 3 – пациенты, получающие фуколам; 4 – пациенты, получающие аторвастатин 10 мг/сут и фуколам; 5 – пациенты, получающие аторвастатин 20 мг/сут и фуколам; 6 – пациенты, получающие маристим; 7 – пациенты, получающие аторвастатин 10 мг/сут и маристим; 8 – пациенты, получающие фуколам и маристим.

БАВ, ЛП

Фуколам – это первая отечественная биологически активная добавка к пище на основе ПС фукоидана, выделенного из водоросли *Fucus evanescens* (свидетельство Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора о государственной регистрации № 77.99.11.003. Е. 054 521.12.11 от 30.12.2011). Товарный знак Фуколам – Fucolam (свидетельство № 308 197). Одна капсула содержит 100 мг фукоидана и 400 мг альгината кальция. Способ применения и дозы: по 1 капсуле 1 раз в день утром во время еды. Промышленный выпуск фуколама осуществляется на экспериментальном производстве Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова Дальневосточного отделения РАН.

Маристим – натуральный продукт из гонад морских ежей, содержит уникальный комплекс БАВ (свидетельство Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора о государственной регистрации № 77.99.23.3. У. 6283.6.09 от 22.06.2009 ТУ 9265-241-00472012-09). Выпускается в виде капсул по 500 мг № 90. Одна капсула содержит БАВ: полиненасыщенные жирные кислоты – не менее 125 мг, в том числе омега-3-полиненасыщенные жирные кислоты – 85 мг, что составляет 4 % от адекватной суточной нормы потребления. Способ применения и дозы: по 3 капсулы 3 раза в день после еды. Биопрепарат из гонад морских ежей является дополнительным источником полиненасыщенных жирных кислот.

Способ совместного применения фуколама и маристима: фуколам по 1 капсуле в день (утром) и маристим по 3 капсулы 3 раза в течение дня. Пациентам рекомендовали принимать маристим через 2 ч после приема фуколама.

Аторвастатин – гиполипидемическое средство из группы статинов. В исследовании был использован аторвастатин фирмы KRKA (Словения).

Лабораторные методы исследования

В сыворотке крови определяли уровни показателей липидного спектра: общего холестерина (ХС), холестерина липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), холестерина липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), триглицеридов (ТГ), аполипопротеина А1 (апоА1), аполипопротеина В (апоВ), липопротеина (а) (ЛП (а)), окисленных липопротеинов низкой плотности (оЛПНП). Для оценки ате-

рогенных сдвигов рассчитывали коэффициенты атерогенности (КА), ХС/ЛПВП-отношение и ХС не-ЛПВП по соответствующим формулам:

$$КА = (ХС - ХС ЛПВП) / ХС ЛПВП;$$

$$ХС/ЛПВП-отношение = ХС ЛПВП / (ХС - ХС ЛПВП);$$

$$ХС не-ЛПВП = ХС - ХС ЛПВП.$$

Измерения проводили на автоматическом биохимическом анализаторе BioChem Analette (High Technology Inc., США), микропланшетном фотометре μ Quant (Bio-Tek, США) с использованием наборов фирм «Вектор-Бест» (Россия), DiaSys, Human (Германия); оЛПНП определяли иммуоферментным методом с использованием набора реактивов фирмы Biomedica (Австрия).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA версии 7 и представляли результат в виде средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$), критическое значение уровня значимости принималось равным 5 % ($p < 0,05$). Значимость различий оценивали с использованием W-критерия Уилкоксона.

Результаты и обсуждение

Проведена оценка гиполипидемического действия фуколама, который получали пациенты с ДЛП на фоне базисной терапии (без аторвастатина).

Под влиянием фуколама (группа 3) через 180 дней (срок наблюдения) выявлено снижение уровня атерогенных фракций липопротеинов крови: ХС и ХС ЛПНП – на 25,5 и 36,8 % ($p < 0,01$) соответственно и КА – на 46,3 % ($p < 0,01$). Содержание ХС ЛПВП и ТГ оставалось на уровне контрольных значений. К концу срока наблюдения под действием фуколама статистически значимо снизились уровень апоВ ($p < 0,05$) и коэффициент ХС не-ЛПВП ($p < 0,01$) (табл. 1).

Сочетанное применение аторвастатина в дозе 10 мг/сут и фуколама у пациентов с ДЛП (группа 4) позволило установить, что к концу срока наблюдения уровни ХС, ХС ЛПНП и КА снизились на 33 % ($p < 0,001$), 46 % ($p < 0,001$) и 45,9 % ($p < 0,001$) соответственно. Уровни оЛПНП и ЛП (а) снизились на 25,7 % ($p < 0,01$) и 47,1 % ($p < 0,01$) соответственно. ХС ЛПВП оставался на уровне контрольных значений. Обращает на себя внимание тот факт, что у пациентов этой группы произошло увеличение коэффициента ХС ЛПВП-отношение ($p < 0,001$) и снижение ХС не-ЛПВП ($p < 0,001$) на 40,4 и 41,3 % соответственно. На 18,5 % увеличился показатель апоА1 ($p < 0,01$) и на 13 % снизилось значение апоВ ($p < 0,05$). У пациентов группы 5, получавших аторвастатин в дозе 20 мг/сут и фуколам, показатели липидного спектра крови нормализовались

Таблица 1. Динамика показателей липидного обмена у пациентов с дислипидемией при разных схемах терапии с включением фуколама

Показатель	Контроль (n = 40)	Группа 1 Аторвастатин 10 мг/сут (n = 36)	Группа 2 Аторвастатин 20 мг/сут (n = 35)	Группа 3 Фуколам (n = 39)	Группа 4 Аторвастатин 10 мг/сут + фу- колам (n = 39)	Группа 5 Аторвастатин 20 мг/сут + фу- колам (n = 36)
ХС, ммоль/л	4,44 ± 0,10	***6,14 ± 0,19 **5,20 ± 0,20**	***6,43 ± 0,18 4,51 ± 0,20***	***6,55 ± 0,19 *4,88 ± 0,19***	***6,28 ± 0,19 ³ 4,21 ± 0,17***	***6,24 ± 0,10 * ³ 4,04 ± 0,13***, ¹
ТГ, ммоль/л	1,16 ± 0,07	<u>1,25 ± 0,16</u> 1,07 ± 0,10	<u>1,28 ± 0,15</u> 1,16 ± 0,10	<u>1,46 ± 0,15</u> 1,40 ± 0,09	<u>1,23 ± 0,14</u> 1,20 ± 0,15	*1,47 ± 0,11 0,97 ± 0,04***
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,65 ± 0,06	***4,06 ± 0,18 ***3,47 ± 0,15**	***4,33 ± 0,19 2,60 ± 0,19***	**4,40 ± 0,22 ¹ 2,78 ± 0,21***	***4,33 ± 0,12 * ¹ 2,34 ± 0,14***	***4,27 ± 0,14 * ³ 2,28 ± 0,14***
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,23 ± 0,04	<u>1,31 ± 0,09</u> 1,19 ± 0,05	<u>1,51 ± 0,12</u> 1,39 ± 0,06	<u>1,45 ± 0,10</u> 1,40 ± 0,03	<u>1,38 ± 0,15</u> 1,29 ± 0,07	<u>1,30 ± 0,08</u> 1,3 ± 0,04
КА	2,67 ± 0,12	*3,81 ± 0,30 *3,33 ± 0,14	*3,62 ± 0,39 2,36 ± 0,18**	*3,78 ± 0,37 ² 2,42 ± 0,17***	***3,95 ± 0,32 ³ 2,32 ± 0,20***	*3,96 ± 0,27 ** ³ 2,13 ± 0,15***
ЛПВП-отно- шение	0,38 ± 0,01	**0,29 ± 0,03 *0,30 ± 0,01	*0,32 ± 0,03 0,49 ± 0,06*	**0,29 ± 0,02 ¹ 0,43 ± 0,04**	**0,29 ± 0,03 ² 0,46 ± 0,04***	***0,27 ± 0,02 ** ³ 0,50 ± 0,04***
ХС не-ЛПВП	3,08 ± 0,15	***4,83 ± 0,23 ***4,01 ± 0,17	***4,92 ± 0,19 3,12 ± 0,21**	***5,11 ± 0,21 *3,48 ± 0,20**	***4,90 ± 0,13 **2,92 ± 0,17***	***4,93 ± 0,13 ** ³ 2,73 ± 0,13***
апоА1, мг/дл	141,8 ± 3,75	<u>142,38 ± 6,51</u> 144,95 ± 6,16	<u>128,73 ± 4,86</u> 141,80 ± 3,75**	<u>153,98 ± 5,24</u> ¹ 164,27 ± 6,81 ¹	<u>138,41 ± 6,45</u> ¹ 164,00 ± 5,86***	*130,63 ± 4,39 148,71 ± 5,63**
апоВ, мг/дл	119,59 ± 3,34	<u>137,33 ± 8,39</u> 124,63 ± 4,26	**142,99 ± 5,46 119,59 ± 3,34**	*156,72 ± 5,56 135,68 ± 3,75* ²	***151,95 ± 7,54 132,26 ± 7,77* ²	131,57 ± 5,95 113,79 ± 5,20**
ЛП (а), мг/дл	23,33 ± 1,75	***46,19 ± 6,37 ***43,49 ± 5,09	***54,14 ± 6,78 **40,04 ± 2,71**	**72,13 ± 21,73 *50,34 ± 10,23	***269,94 ± 11,70 ² **36,94 ± 4,97**	***44,00 ± 3,18 **34,08 ± 2,90***
оЛПНП, мкг/мл	1,52 ± 0,13	**3,01 ± 0,54 2,32 ± 0,35*	<u>1,98 ± 0,39</u> 1,57 ± 0,16	¹ 2,23 ± 0,63 1,80 ± 0,36*	* ³ 2,10 ± 0,40 1,56 ± 0,29**	¹ 1,23 ± 0,33 * ² 1,04 ± 0,23 ¹

Примечание. Показатели представлены в виде средних значений $M \pm t$; в числителе показатели до лечения, в знаменателе – через 180 дней после лечения. *Значимость различий показателей: слева от значения – в сравнении с контрольной группой, справа – до и после лечения, где *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. ¹ – значимость различий показателей: слева от значения – в сравнении с группой 1, справа – с группой 2, где ³ – $p < 0,001$; ² – $p < 0,01$; ¹ – $p < 0,05$. АпоА1 – аполипопротеин А1; апоВ – аполипопротеин В; КА – коэффициент атерогенности; ЛП (а) – липопротеин (а); оЛПНП – окисленные липопротеины низкой плотности; ТГ – триглицериды; ХС – общий холестерин; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности.

в еще большей степени. Следует отметить, что только в этой группе снизился уровень ТГ (табл. 1).

Действие маристима на фоне базисной терапии (группа 6) на показатели липидного профиля крови у пациентов с ДЛП проявлялось снижением уровня ХС на 12,3 % ($p < 0,05$), ТГ – на 25,1 % ($p < 0,05$), ХС ЛПНП – на 10 % ($p < 0,05$) и повышением уровня ХС ЛПВП на 11 % ($p < 0,05$) относительно исходных значений (табл. 2).

У пациентов с ДЛП, получавших маристим и 10 мг/сут аторвастатина (группа 7), через 1 мес

после начала лечения пришли к норме основные показатели липидограммы, и степень выраженности этих изменений была более значительной, чем у пациентов, получавших только аторвастатин в дозе 10 мг/сут (группа 1). По влиянию на уровень ХС и ХС ЛПНП комбинированная терапия в группе 7 (маристим с аторвастатином в дозе 10 мг/сут) была сопоставима с действием аторвастатина в дозе 20 мг/сут (группа 2) (табл. 1, 2).

У пациентов, получавших фуколам и маристим (группа 8), через 30 дней снизился уровень ХС

Таблица 2. Динамика показателей липидного обмена у пациентов с дислипидемией при разных схемах терапии с включением маристима

Показатель	Контрольная группа (n = 20)	Группа 6 Маристим (n = 15)	Группа 7 Аторвастатин 10 мг/сут + маристим (n = 15)	Группа 8 Фуколам + маристим (n = 35)
ХС, ммоль/л	4,44 ± 0,10	<u>*5,97 ± 0,92</u> 5,24 ± 0,53*	<u>6,00 ± 0,92</u> 5,03 ± 0,61*	<u>***6,51 ± 0,25</u> **5,12 ± 0,20***
ТГ, ммоль/л	1,16 ± 0,07	<u>1,67 ± 0,58</u> 1,25 ± 0,29*	<u>1,41 ± 0,63</u> 1,18 ± 0,46*	<u>1,03 ± 0,12</u> 1,08 ± 0,09
ХС ЛПНП, ммоль/л	2,65 ± 0,06	<u>3,49 ± 0,86</u> 3,14 ± 0,44*	<u>3,64 ± 0,70</u> 2,78 ± 0,81*	<u>***4,69 ± 0,25</u> **3,39 ± 0,23***
ХС ЛПВП, ммоль/л	1,23 ± 0,04	<u>1,25 ± 0,29</u> 1,39 ± 0,18*	<u>1,17 ± 0,21</u> 1,44 ± 0,17*	<u>*1,42 ± 0,05</u> 1,27 ± 0,08
КА	2,67 ± 0,12	<u>4,1 ± 1,7</u> 3,7 ± 1,9	<u>4,2 ± 0,31</u> 3,1 ± 0,26*	<u>***3,65 ± 0,22</u> *3,28 ± 0,25

Примечание. Показатели представлены в виде средних значений $M \pm t$; в числителе показатели до лечения, в знаменателе – через 30 дней после лечения. *Значимость различий показателей: слева – в сравнении с контрольной группой, справа – до и после лечения, где *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. КА – коэффициент атерогенности; ТГ – триглицериды; ХС – общий холестерин; ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности.

I. Исследование показателей липидного спектра крови у пациентов с МС, ИБС, ГБ

II. Определение степени тяжести гиперлипидемии

Гиперлипидемия легкой и средней степени:

– ХС 5,2–6,0 ммоль/л

– ХС ЛПНП 3,4–3,9 ммоль/л

Гиперлипидемия тяжелой степени:

– ХС >6,1 ммоль/л

– ХС ЛПНП >4,0 ммоль/л

Фуколам

- гиперлипидемия средней степени тяжести у пациентов с МС, ГБ
- гиперлипидемия тяжелой степени тяжести у пациентов с повышенными ферментами печени (АсАТ и АлАТ ≥ 3 нормы)

Фуколам в комбинации
с аторвастатином
в дозе 10 мг

- гиперлипидемия легкой и средней степени тяжести у пациентов с ИБС, ГБ и при их коморбидном течении

Фуколам в комбинации
с аторвастатином
в дозе 20 мг

- гиперлипидемия тяжелой степени тяжести, в том числе рефрактерная ЛП(а)-холестеринемия, у пациентов с ИБС, ГБ и при их коморбидном течении

Фуколам в комбинации
с маристимом

- гиперлипидемия тяжелой степени тяжести у пациентов с МС
- гиперлипидемия различной степени тяжести у пациентов с ИБС, ГБ с повышенными ферментами печени (АсАТ и АлАТ ≥ 3 нормы)

Алгоритм дифференцированной коррекции дислипидемий. ГБ – гипертоническая болезнь; ИБС – ишемическая болезнь сердца; МС – метаболический синдром; АлАТ – аланинаминотрансфераза; АсАТ – аспартатаминотрансфераза; ХС – общий холестерин; ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности

на 21,4 % ($p < 0,001$) и уровень ХС ЛПНП – на 27,7 % ($p < 0,001$) относительно исходных показателей. Содержание ХС ЛПВП в этой группе сохранялось на исходно нормальном уровне (табл. 2). При сравнении показателей липидного спектра сыворотки крови в группе 8 с показателями в группах 1 и 2 выявлено, что комплекс «фуколам – маристим» через 30 дней оказывал гипохолестеринемическое

действие, сопоставимое с действием аторвастатина в дозе 20 мг/сут (табл. 1, 2).

Полученные результаты позволили установить, что у пациентов с ДЛП гиполипидемическое действие фуколама реализуется путем постепенного снижения уровней ХС, ХС ЛПНП, ТГ. Эффективность биопрепарата при индивидуальном применении сопоставима с таковой аторвастатина в дозе 10 мг/сут, что дает возмож-

ность нормализовать липидный профиль крови у пациентов с ДЛП в тех случаях, когда применение статинов не показано. Применение фуколама также способствовало снижению атерогенных свойств крови (снижение ХС не-ЛПВП и КА, повышение ХС/ЛПВП-отношения) вследствие снижения уровня оЛПНП. Фуколам, как и аторвастатин, улучшает состояние липидтранспортной системы крови. Применение фуколама в комплексе с аторвастатином приводило к снижению содержания ЛП (а). Снижению уровня ЛП (а) в сыворотке крови придается в настоящее время большое значение, так как его рассматривают в качестве фактора риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, не зависящего от уровня ХС ЛПНП и ХС не-ЛПВП.

Результаты комбинированного применения фуколама и аторвастатина в дозе 10 мг/сут сопоставимы с действием аторвастатина в дозе 20 мг/сут, что позволяет в 2 раза уменьшить дозу ЛП, тем самым снизив риск нежелательных побочных эффектов и затраты на лечение.

Комплекс «фуколам — маристим» оказывает гиполлипидемическое действие при выраженной гиперлипидемии, что позволяет рекомендовать его в качестве гиполлипидемического средства сопровождения базисной терапии пациентов с ДЛП в стационарных и амбулаторных условиях. Особенно это актуально при низкой приверженности пациентов к статинотерапии и в случаях, когда имеются противопоказания для назначения статинов или других липидснижающих средств.

Заключение

Одним из путей повышения эффективности гиполлипидемической терапии может быть комбинированная терапия с использованием БАВ природного происхождения.

Полученные результаты позволили разработать алгоритм дифференцированной коррекции ДЛП путем включения в комплекс лечения БАВ из гидробионтов (см. рисунок).

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Chatzizisis Y.S., Koskinas K.C., Misirli G. et al. Risk factors and drug interactions predisposing to statin-induced myopathy: implications for risk assessment, prevention and treatment. *Drug Saf* 2010;33(3):171–87. DOI: 10.2165/11319380-000000000-00000. PMID: 20158283.
- Maldonado R.J.M., Lumbreras B., Jimenes M.H. et al. A pilot study in a community pharmacy to determine the efficiency and the effectiveness of statin prescriptions. *Aten Primaria* 2015;47(5):294–300. DOI: 10.1016/j.aprim.2014.05.016. PMID: 25262591.
- Kim M.J., Jeon J., Lee J.S. Fucoidan prevents high-fat diet-induced obesity in animals by suppression of fat accumulation. *Phytother Res* 2014;28(1):137–43. DOI: 10.1002/ptr.4965. PMID: 23580241.
- Huang L., Wen K., Gao X., Liu Y. Hypolipidemic effect of fucoidan from *Laminaria japonica* in hyperlipidemic rats. *Pharm Biol* 2010;48(4):422–6. DOI: 10.3109/13880200903150435. PMID: 20645721.
- Matloub A.A., El-Sherbini M., Borai I.H. et al. Assessment of anti-hyperlipidemic effect and physico-chemical characterization of water soluble polysaccharides from *Ulva Fasciata Delile*. *J Appl Sci Res* 2013;9(4):2983–93.
- Майстровский К.В., Раповка В.Г., Запорожец Т.С. Применение полисахаридов бурых водорослей в комплексном лечении облитерирующего атеросклероза сосудов нижних конечностей. Владивосток: Дальнаука, 2014. 123 с.
- Крыжановский С.П., Гельцер Б.И., Запорожец Т.С. и др. Бурые водоросли Тихого океана в лечении и профилактике атеросклероза. Владивосток: Дальнаука, 2016. 152 с.
- Fitton J.H., Stringer D.N., Karpinić S.S. Therapies from fucoidan. *Mar Drugs* 2015;13(9):5920–46. DOI: 10.3390/md13095920. PMID: 26389927.
- Zaporozhets T., Besednova N. Prospects for the therapeutic application of sulfated polysaccharides of brown algae in diseases of the cardiovascular system: review. *Pharm Biol* 2016; 54(12):3126–35. DOI: 10.1080/13880209.2016.1185444. PMID: 27252012.
- Ковалев Н.Н., Крыжановский С.П., Кузнецова Т.А. и др. Морские ежи: биомедицинские аспекты практического применения. Владивосток: Дальнаука, 2016. 126 с.
- Крыжановский С.П., Кузнецова Т.А., Запорожец Т.С., Макаренкова И.Д. Влияние биологически активной добавки к пище из икры морских ежей на биохимические показатели крови мышей при алиментарной гиперхолестеринемии. *Тихоокеанский медицинский журнал* 2011;1:62–4.
- Фукоиданы — сульфатированные полисахариды бурых водорослей. Структура, ферментативная трансформация и биологические свойства. Под ред. Н.Н. Беседновой, Т.Н. Звягинцевой. Владивосток: Дальнаука, 2014. 380 с.
- Panlasigui L.N., Baello O.Q., Dimantagal I.M., Dumelod B.D. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. *Asia Pac J Clin Nutr* 2003;12(2):209–14. PMID: 12810413.
- Kim Z., Ishkineev F., Khusnullina E., Gaifullina R. The use of histochrome in the complex treatment of the patients with acute coronary syndrome with ST segment depression diagnosed on ECG. *Modern Appl Sci* 2015;9(1): 161–9. DOI:10.5539/mas.v9n1p161.