



ISSN 1726-9784

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal



**Russian Journal
of Biotherapy**

3

ТОМ 16
2017

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

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

Российский Биотерапевтический Журнал

Rossiysky Bioterapevtichesky Zhurnal

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ И НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

УЧРЕДИТЕЛИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации
Научно-исследовательский институт экспериментальной диагностики и терапии опухолей

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

З.С. Шпрах, канд. фарм. наук

ЗАМЕСТИТЕЛИ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

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

М.А. Барышникова, канд. фарм. наук

РЕДКОЛЛЕГИЯ

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

ОСНОВАН В 2002 Г.

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

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

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

Редактор **В.Е. Ефремова**
Корректор **М.А. Андросова**
Дизайн **Е.В. Степанова**
Верстка **О.В. Гончарук**

Журнал зарегистрирован
в Федеральной службе по надзору
в сфере связи, информационных
технологий и массовых коммуникаций.
Регистрационный номер: № 77-11695
от 21.01.2002 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. № 3. 1–102
© ООО «ИД «АБВ-пресс», 2017
Подписной индекс в каталоге
агентства «Роспечать» — 81679
Отпечатано в типографии
ООО «Медиаколор»

Тираж 1000 экз.

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

3 ^{ТОМ 16}
'17

Мероприятия в 2018 г.



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

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

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

29–30
марта
2018 г.
Москва

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

Место проведения: г. Москва

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

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

Оргкомитет оставляет за собой
право отбора докладов.

The "Russian Journal of Biotherapy" is put on the Higher Attestation Commission list of periodicals (the list of leading peer-reviewed scientific journals recommended to publish the basic research results of doctor's and candidate's theses). In 2016, the journal has been registered with CrossRef; its papers are indexed with the digital object identifier (DOI).

Russian Journal of Biotherapy

PEER-REVIEWED THEORETICAL AND SCIENTIFIC-AND-PRACTICAL JOURNAL

FOUNDERS

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

EDITOR-IN-CHIEF

Z.S. Shprakh, PhD, Deputy Director for Research Work of N.N. Blokhin National Medical Research Oncology Center of the Ministry of Health of Russia, Director of the Research Institute of Experimental Diagnostic and Therapy of Tumors (Moscow, Russia)

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF

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

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

EDITORIAL BOARD

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

FOUNDED IN 2002

3 VOL. 16
'17

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

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

Editorial Office:

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

www.abvpress.ru

Editor V.E. Efremova
Proofreader M.A. Androsova
Designer E.V. Stepanova
Maker-up O.V. Goncharuk

*The journal is registered at the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology, and Mass Media
Registration number: ПИ № 77-11695
dated 21.01.2002; ПИ № ФЦ77-53039
dated 04.03.2013*

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

ISSN 1726-9784

Rossiyskiy Bioterapevticheskiy Zhurnal. 2017. Volume 16. No 3. 1–102

© PH "ABV-Press", 2017

Rospechat' catalogue index: 81679

Printed at the Mediacolor LLC
1,000 copies

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

ОБЗОРЫ ЛИТЕРАТУРЫ

<i>Е. М. Трещалина</i> Иммунодефицитные мыши Balb/c nude и моделирование различных вариантов опухолевого роста для доклинических исследований	6
<i>А. А. Вартамян</i> Метаболизм железа, ферроптоз, рак	14
<i>М. В. Киселевский, Н. Ю. Анисимова, И. О. Чикилева, Р. Я. Власенко, Ю. И. Должикова, С. М. Ситдикова, Ф. С. Сенатов, К. С. Янг, Д. С. Янг</i> Роль опухолеподобных мезенхимальных мультипотентных клеток при ревматоидном артрите	21
<i>Д. А. Рябчиков, Н. К. Чепелова, И. К. Воротников, Д. А. Денчик</i> Современные методы лечения рака молочной железы у пожилых	24
<i>Д. С. Хачатрян, В. А. Мисюрин, М. А. Барышникова, Н. В. Голубцова, А. В. Колотаев, К. Р. Матевосян</i> Производные хиназолинона для терапии опухолевых, паразитарных и нейродегенеративных заболеваний	32

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

<i>Д. А. Понкратова, И. В. Цыганова, А. С. Вихрова, А. А. Лушикова</i> ХАрактеристика пациентов с меланомой кожи и первично-множественными злокачественными опухолями: клинические наблюдения	43
<i>А. В. Пономарев, В. А. Мисюрин, А. А. Рудакова, О. С. Бурова, А. В. Мисюрин, М. А. Барышникова</i> Изменение экспрессии мРНК MDM2 и NFκB1 в клеточных линиях меланомы человека при воздействии 2 лекарственных форм аранозы	52
<i>Г. М. Волгарева, В. Д. Ермилова, А. В. Хачатурян, В. В. Татарский, Л. С. Павлова</i> Обнаружение онкогена E7 вируса папилломы человека 16-го типа в операционном материале от российских больных раком предстательной железы	59
<i>Л. П. Сушинина, А. П. Смирнова, С. В. Устинкина, Л. И. Смирнова, Т. А. Сидорова, М. П. Киселева, Л. М. Борисова, З. С. Шпрах</i> Синтез и изучение модифицированных фрагментов гастринна	63
<i>Е. Ю. Григорьева, Ю. В. Стукалов, Е. Ю. Колдаева, М. И. Лукашина, Т. А. Сидорова, А. С. Масько, Н. В. Позднякова</i> Цитотоксические и токсикологические характеристики окислительно-восстановительных дендримеров	69
<i>И. С. Голубева, А. Е. Бармашов, А. А. Рудакова, М. А. Барышникова, Н. С. Рукк, А. Ю. Скрябина, Г. Н. Апрышко</i> Цитотоксическая активность комплексов иодидов цинка и кадмия с антипирином, кофеином и фенантролином	75
<i>И. Д. Трещалин, В. А. Голибродо, М. И. Трещалин, Н. В. Еремкин, С. А. Цуркан, Э. Р. Переверзева</i> Токсикологический профиль препарата аймпил в хроническом эксперименте на крысах	79
<i>Ю. М. Букреев, Е. Н. Кособокова, С. С. Кардашова, М. В. Пинюгина, В. С. Косоруков</i> Мониторинг чистоты линий лабораторных мышей с использованием ДНК-маркеров	86
<i>А. В. Сергеев, В. С. Ананьев, А. Б. Капитанов, С. А. Коростылев, Ю. М. Букреев, Н. К. Власенкова, И. Р. Просалкова, В. В. Решетникова, И. Ж. Шубина</i> Фармакокинетика каротиноидов и каротинсодержащих препаратов	92

REVIEWS

<i>H.M. Treshalina</i> Immunodeficient mice balb/c nude and modeling of various types of tumor growth for preclinical studies	6
<i>A.A. Vartanian</i> Iron metabolism, ferroptosis and cancer	14
<i>M.V. Kiselevskiy, N. Yu. Anisimova, I.O. Chikileva, R. Ya. Vlasenko, Yu.I. Dolzhikova, S.M. Sidikova, F.S. Senatov, K.C. Yang, J.C. Yang</i> Role of tumor-like multipotent mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis.	21
<i>D.A. Ryabchikov, N.K. Chepelova, I.K. Vorotnikov, D.A. Denchik</i> Modern methods of treatment of breast cancer in the elderly.	24
<i>D.S. Khachatryan, V.A. Misyurin, M.A. Baryshnikova, N.V. Golubtsova, A.V. Kolotaev, K.R. Matevosyan</i> Quinazolinon derivatives for the treatment of neoplastic, parasitic and neurodegenerative diseases	32

ORIGINAL REPORTS

<i>D.A. Ponkratova, I.V. Tsyganova, A.S. Vikhrova, A.A. Lushnikova</i> Characteristics of the patients with cutaneous melanoma and multiple primary malignant tumors: clinical observations	43
<i>A.V. Ponomarev, V.A. Misyurin, A.A. Rudakova, O.S. Burova, A.V. Misyurin, M.A. Baryshnikova</i> The influence of drug formulations on the expression of MDM2 and NFkB1 mRNA in the melanoma cell lines.	52
<i>G.M. Volgareva, V.D. Ermilova, A.V. Khachatryan, V.V. Tatarskiy, L.S. Pavlova</i> Detection of human papillomavirus type 16 oncogen E7 in surgical materials from Russian prostate cancer patients	59
<i>L.P. Sushinina, A.P. Smirnova, S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, T.A. Sidorova, M.P. Kiseleva, L.M. Borisova, Z.S. Shprakh</i> Synthesis and investigation of modified gastrin fragments	63
<i>E. Yu. Grigor'eva, Yu.V. Stukalov, E. Yu. Koldaeva, M.I. Lukashina, T.A. Sidorova, A.S. Mas'ko, N.V. Pozdnyakova</i> Cytotoxic and toxicological characteristics of oxidation-reduction dendrimers	69
<i>I.S. Golubeva, A.E. Barmashov, A.A. Rudakova, M.A. Baryshnikova, N.S. Rukk, A. Yu. Skryabina, G.N. Apryshko</i> Cytotoxicity of zinc (II) and cadmium (II) iodide complexes with antipyrine, caffeine and phenantroline	75
<i>I.D. Treshchalin, V.A. Golibrodo, M.I. Treshchalin, N.V. Eremkin, S.A. Tsurkan, E.R. Pereverzeva</i> Toxicological profile of aimpila drug in chronic experiment on rats	79
<i>Yu.M. Bukreev, E.N. Kosobokova, S.S. Kardashova, M.V. Pinyugina, V.S. Kosorukov</i> DNA-markers for genetic monitoring of laboratory mouse.	86
<i>A.V. Sergeev, V.S. Anan'ev, A.B. Kapitanov, S.A. Korostelev, Yu.M. Bukreev, N.K. Vlasenkova, I.R. Prosalkova, V.V. Reshetnikova, I.Zh. Shubina</i> Pharmacokinetics of carotenoids and carotene containing compounds.	92

ИММУНОДЕФИЦИТНЫЕ МЫШИ BALB/C NUDE И МОДЕЛИРОВАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА ДЛЯ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Е. М. Трещалина

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

Контакты: Елена Михайловна Трещалина treshalina@yandex.ru

Получение доклинических моделей злокачественного роста в виде различных ксенографтов (гетеротрансплантатов), как правило подкожных, является наиболее важной областью использования nude-мышей в онкологии. В обзорной работе описаны характеристики полученных из Buffalo (США) и интродуцированных в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России Balb/c nude-мышей и систематизированы возможности их применения. Приведены различные варианты «пациентоподобных» моделей опухолевого роста, позволяющих персонализировать прогноз эффективности отобранных воздействий для конкретного пациента. Детализированы особенности моделирования метастазов различных опухолей человека: рака кишечника, поджелудочной железы, пищевода, легкого, молочной и предстательной желез, яичка и яичников, опухолей головы и шеи. Дана характеристика ортотопической трансплантации (модель MetaMouse) и экспериментальное подтверждение ценности гипотезы Педжета «seed and soil», постулирующей сопряженное участие в процессе метастазирования клеточного и тканевого компонентов опухоли. Описано применение подкожных ксенографтов в качестве контрольных линий клеток при изучении онкогенных потенций различных препаратов, рекомендованных для клеточной иммунотерапии человека. Приведены примеры и основная тематическая литература последних лет.

Ключевые слова: иммунодефицитные мыши, моделирование опухолевого роста, доклинические исследования

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-6-13

IMMUNODEFICIENT MICE BALB/C NUDE AND MODELING OF VARIOUS TYPES OF TUMOR GROWTH FOR PRECLINICAL STUDIES

E. M. Treshalina

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

Obtaining preclinical models of malignant growth in a variety of xenografts (heterotransplantation), usually the subcutaneous, is the most important area for the use of nude mice in oncology. In a review paper describes the characteristics of Balb/c nude mice obtained from Buffalo (USA) and introduced to the Federal State Budgetary Scientific Institution “N. N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Russian Ministry of Health of the Russian Federation and systematized their application. There are various variants «parentology» models of tumor growth, allowing you to personalize the forecast performance of selected impacts for a particular patient. Detailed modeling of metastases of various human cancers: colon cancer, pancreas, esophagus, lung, breast and prostate glands, testicles and ovaries, tumors of the head and neck. The characteristic of orthotopic (“MetaMouse” model) and experimental confirmation of the value of the hypothesis of Paget’s “seed and soil”, postulating a paired part of the process of metastasis of cell and tissue components of the tumor. Describes the use of the subcutaneous xenografts as control cell lines in the study of oncogenic potencies of the various drugs that are recommended for cellular immunotherapy of human. Examples and main thematic literature in recent years.

Key words: immunodeficient mice, tumor growth modeling, preclinical studies

Основные характеристики nude-мышей

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии) разведение и использование гибридных иммунодефицитных Balb/c nude- и bg/bgj nude-мышей с отсутствием трансплантационного иммунитета стартовало в 1974 г. после предоставления из NCI (Bethesda, США) семьи соответствующих

особей. В настоящее время разведение этих мышей на конвенциональном уровне поддерживается в специализированном отсеке под контролем различных показателей качества жизни, в том числе основного – устойчивой динамики массы тела (см. таблицу и рисунок) [1]:

- **CAnN. Cg-Foxn1nu/Crl**, полученные впервые в филиале Charls River Lab. (CRL, Япония) путем

скрещивания и обратного скрещивания между Balb/cA_{Вom}-nu и Balb/cAnNC_{гj}-nu. Беременные самки Balb/cAnNC_{гj}-nu получены из CRL в 1985 г. Эти мыши инбредные, генетический мониторинг подтверждает, что это Balb/c nude. У мышей отсутствует тимус и имеется дефицит Т-клеток. Гомозиготные особи лысые, цвет кожи непигментированный, гетерозиготные особи – волосатые, альбиносы;

- **bg/bgj nude**, полученные в НМИЦ онкологии на основе гибридов nu/nu × dgj/bgj и инбредных иммунокомпетентных мышей линии C57BL. Эти мыши инбредные, генетический мониторинг подтверждает, что это bg/bgj nude. У мышей отсутствует тимус и имеется дефицит Т-клеток. Гомозиготные особи лысые, цвет кожи непигментированный, гетерозиготные особи – волосатые, рыжие.

Характеристики иммунодефицитных мышей (самцы/самки 4–10-недельного возраста)

Линия	Шерсть	Т-клетки	В-клетки	НК-клетки
Balb/c nude CAnN. Cg-oxnl nu/Crl	–	–	+	+
bg/bgj nude				

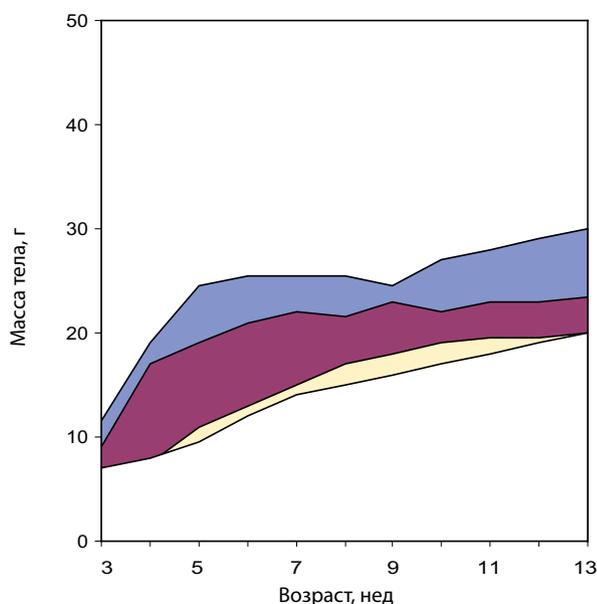
Создание новых моделей опухолевого роста

Иммунодефицитных животных традиционно используют для получения моделей различных злокачественных опухолей. Для экспериментальной онкологии и химиотерапии наиболее ценны перевиваемые линии подкожных (п/к) ксенографтов опухолей человека. Создать такую модель можно путем пер-

вичной имплантации фрагмента опухоли человека, полученного при оперативном удалении, либо при имплантации перевиваемой культуры клеток с целью адаптации ее к росту у мышей. Процесс получения таких линий длительный и трудоемкий, связанный прежде всего с поиском оптимальных условий для приживания ксенографта в организме животного и его полной биологической адаптацией. Последнее подтверждается стабильностью основных биологических характеристик роста, пролиферации, ангиогенеза, гистологической структуры и т. п. опухолевого узла в серии не менее 9 пассажей. Указанным путем в НМИЦ онкологии получены более 60 моделей опухолей человека различных локализаций: кишечника и желудка, легкого и дыхательных путей, мочеполовой, кроветворной и нервной систем, молочной железы, опорно-двигательного аппарата, в том числе соединительной ткани и меланомы, описанные в Коллекции опухолевых штаммов человека [2].

Доклинические исследования противоопухолевых воздействий

П/к ксенографт, частично моделирующий опухолевый процесс, может быть результатом имплантации адаптированной к росту на мышцах культуры опухолевых или трансформированных клеток, взятых в количестве, достаточном для получения опухолей у 100 % животных. Для улучшения прививаемости с использованием меньших количеств клеток используют иммобилизующие материалы (матригель, трехмерные скаффолды и т. п.) или дополнительные иммунодепрессивные воздействия, чаще – тотальное γ -излучение [3]. П/к ксенографты дают опухоли практически всех локализаций. При этом у мышей формируются опухолевые узлы солидного строения (солидные или плотные опухоли) или имеющие структуру лимфатического узла – ЛУ (гемобласты). Эти узлы и являются объектом терапии при проведении различных экспериментальных исследований противоопухолевых воздействий, в том числе доклинических. Для тестирования потенциальных противоопухолевых воздействий предложен ряд методических рекомендаций за рубежом и в нашей стране. Общим в рекомендациях является подход к оценке эффективности лечения, для чего используются количественные критерии изменения объема опухоли во времени, после проведения терапии. Для такого подсчета в качестве единиц измерения чаще используются единица массы или площади опухоли, реже – единица объема опухоли. Последнее вызвано чрезвычайно слабой инвазией п/к ксенографтов или ее отсутствием, что приводит к образованию плоского опухолевого узла. Терапию п/к ксенографтов начинают при достижении массы 34 мг (размеры 4 × 4 мм), что считается ранним лечением, или 68 мг (5 × 5 мм),



Стандартная динамика прироста массы тела nude-мышей

что считается поздним лечением. В качестве количественного критерия эффективности используется соотношение размеров или массы опухолевого узла в единицу времени в леченой и контрольной группах животных, выраженное в процентах: Т/С % (treatment/control). Минимально значимым служит $T/C \leq 42$ %. Это означает, что эффективным считается такое лечение, которое позволяет уменьшить опухоль более чем наполовину [3]. В редких случаях, например при трансплантации некоторых гемобластозов или секретирующих солидных опухолей репродуктивной системы, можно получить асцит. Такие проявления специфического процесса при доклинических исследованиях не используются, так как носят спорадический характер и рассматриваются как артефакт. П/к ксенографты, как правило, не метастазируют и отличаются слабой инвазией в окружающие ткани из-за дефектного строения кожи. Получить метастазы в легких можно, только прививая опухоль внутривенно, как это показано для наиболее агрессивных вариантов меланомы. Продолжительность жизни мышей с п/к ксенографтами различна и зависит от гистологической структуры опухоли. Медленнее всех растут карциномы легкого, латентный период (появление пальпируемой опухоли) достигает 1 мес. Выживаемость мышей ограничена иммунодефицитом — источником различных контаминантов, которые приводят их к гибели независимо от условий содержания. В силу указанных причин продолжительность жизни иммунодефицитных животных практически не используется для оценки эффективности лечения.

Доклинические модели метастазов опухолей человека

Моделирование метастазов рака кишечника

Эксперименты выполняют методом имплантации операционного опухолевого материала прямо от пациента (хирургическая ортотопическая имплантация, surgical orthotopic implantation, SOI) в толстую или слепую кишку nude-мышей. SOI выполняется под серозную оболочку кишки. Трансплантация операционного опухолевого материала из кишечника дает 100 % метастазов в регионарные ЛУ или в печень. Подобные результаты получают также, если трансплантировать опухолевую ткань из ксенографта рака толстой кишки или из полученного в результате трансплантации печеночного метастаза. Было также установлено, что метастатический потенциал ортотопически развившейся опухоли выше, если для инокуляции использовали фрагменты опухолевой ткани, а не взвесь опухолевых клеток с дополнительной гистологической верификацией процесса. Многочисленные опыты с моделированием метастазов рака кишечника показали, что ортотопическая трансплантация («пациентоподобная» модель) суще-

ственно повышает степень злокачественности трансплантата. Изучение чувствительности такой модели к клиническим препаратам показало, что она адекватна для доклинического изучения новых лекарств и для прогноза индивидуальной чувствительности пациента к лечению.

Моделирование метастазов рака яичка

Опыты с раком яичка, выполненные с двумя линиями клеток переходно-клеточной карциномы яичка, показали, что при трансуретральной инъекции в уринальную часть яичка nude-мышей наблюдали опухолевый рост в яичках и метастазы в легкие. П/к трансплантация этих клеточных линий вызывала опухолевый рост с множеством мелких инвазивных очагов, но без метастазов. Такие результаты получены и с клеточной линией карциномы яичка RT-4. При этом трансфекция мутантным онкогеном *N-ras* клеток RT-4 приводила к гиперэкспрессии этого гена и селекции RT-4-mr-10, клетки становились более инвазивными при трансуретральной инокуляции. При п/к трансплантации эти клетки не проявляли инвазивных свойств. В некоторых случаях при ортотопической трансплантации *ras*-трансфицированной линии клеток RT-4-mr-10 наблюдали не только мощный локальный опухолевый рост и увеличение зоны инвазии, но и полиорганное метастазирование. При инокуляции взвесью клеток ксенографта даже при трансфекции геном *ras* получали только местную инвазию, но не метастазы. Эти результаты показали, что на nude-мышях можно получить модель метастазирования путем ортотопической трансплантации первичного опухолевого материала (SOI).

Моделирование метастазов рака поджелудочной железы

Первые опыты по трансплантации рака поджелудочной железы были проведены с быстрорастущим вариантом карциномы COLO 357, которую инъецировали взвесью клеток в селезенку nude-мышам. В результате получили метастазы в печень и легкие. При этом было отмечено, что двусторонняя инвазия и генерализация процесса наступали значительно быстрее, чем метастазирование. В другом опыте результаты ортотопической трансплантации сравнили с п/к трансплантацией 2 вариантов рака поджелудочной железы COLO 357 и L3.3. Для перевивки использовали п/к ксенографты (первый пассаж), из которых готовили фрагменты 2×2 мм. Ксенографты были посажены в наружную часть поджелудочной железы. Операционная рана укрыта парафильмом, края окружающего железу сальника были ушиты так, чтобы ксенографт располагался в брюшной полости. В результате у большинства мышей выросли опухоли в месте инокуляции, появились метастазы в печени,

легких, регионарных и отдаленных ЛУ. Авторы утверждают, что использование кусочков опухоли в качестве ксенографта лучше, чем инъекция опухолевых клеток в поджелудочную железу, так как последнее приводит к быстрому попаданию клеток в местный кровоток, их рассеивание и элиминацию. Они считают, что данная модель аналогична клинической ситуации рака поджелудочной железы с поражением ретроперитонеальных ЛУ, печени и легких.

Особенности роста клеточных линий рака поджелудочной железы изучали при трансплантации в разные сайты: ортотопически в дуоденальную часть поджелудочной железы, гетеротопически в печень или под кожу. В ряде работ описаны результаты метастазирования ортотопического трансплантата и оказалось, что у молодых мышей можно получить опухолевый рост в печени через месяц, а у взрослых — не ранее чем через 1,5–2,0 мес. При этом наблюдали рост опухоли в другие органы, чаще всего в двенадцатиперстную кишку, реже — в органы брюшной полости и в почки. П/к опухоли не давали метастазов и не прорастали в другие органы. Первичный опухолевый материал рака поджелудочной железы трансплантировали ортотопически неоднократно и, если при этом использована методика SOI, опухоли получали в 100 % случаев, как в виде интенсивного местного роста, так и с инвазией и полиорганным метастазированием.

Моделирование метастазов опухоли головы и шеи

Для получения ксенографтов клеточную линию сквамозно-клеточной карциномы гортани имплантировали в полость рта nude-мышей. В результате превалировал инвазивный рост в мягкие ткани, венозные анастомозы и костный мозг, реже — в легкие и чрезвычайно мало — в ЛУ. При п/к трансплантации метастазов не получено. Использование SOI, включая метастазы языка и опухоли гортани, при имплантации в мягкие ткани ротовой полости, мимические мышцы и *m. mylohyoideus* получен инвазивный рост. Если трансплантировали тот же материал п/к, инвазии не было.

Моделирование метастазов рака пищевода

Линию клеток рака желудка G/F имплантировали под кожу или в стенку пищевода nude-мышей. При ортотопической трансплантации опухоли росли медленнее. При трансплантации в стенку пищевода почти у половины мышей опухоли прорастали в окружающие ткани и метастазировали в регионарные ЛУ и отдаленные органы, такие как печень, легкие. П/к растущие опухоли были инкапсулированы и не давали метастазов. Таким образом, стенка пищевода обеспечивала лучшее микроокружение

для линии клеток рака желудка G/F для экспрессии его метастатического потенциала. При использовании SOI можно получить хороший местный опухолевый рост, высокий процент метастазирования и полиорганные метастазы. Лучшие результаты получаются с инокулятом в виде суспензии клеток.

Моделирование метастазов рака легкого

Для получения ксенографтов опухолевые клетки инокулируют интраторакально (в грудную полость) или интрабронхиально nude-мышам. Для обеспечения успешной имплантации используют метод Meta-Mouse при торакотомии с инокуляцией опухоли в левое легкое дополнительно иммунодепрессированным nude-мышам или мышам SCID (Severe Combined Immuno Deficient). Результаты показывают, что эти методики позволяют эффективно получать локальный опухолевый рост как в nude-, так и в SCID- мышах при развитии регионарных и отдаленных метастазов. Хорошие результаты получены и трансплантацией клеточной линии дифференцированной крупноклеточной/сквамозно-клеточной карциномы легкого #2268. Выход опухолей составил 100 %, метастазы получены также в 100 % случаев. Наблюдают также метастазы во второе легкое и ЛУ. При п/к трансплантации опухоли росли локально без метастазов. Также успешно nude-мышам в левое легкое при торакотомии трансплантируют мелкоклеточную карциному линии Lu-24 по 1,5 мм³ опухолевой ткани. Опухоли получены в 100 % случаев, на 24-й день они достигали 10 мм в диаметре. У всех мышей получены регионарные и отдаленные метастазы, в том числе в правое легкое, грудную стенку, перикардий, пищевод, диафрагму, париетальную плевру и ЛУ. Эту же опухоль трансплантировали SCID-мышам. Оказалось, что у всех мышей на 17-й день появились опухоли, достигшие 7,5 мм в диаметре, картина метастазирования была идентичной, но сроки появления первых метастазов несколько короче.

Подобные результаты были получены при трансплантации мелкоклеточных карцином легкого Ku-130 и H-69 с существенным локальным ростом и выраженным метастазированием. В случае использования взвеси клеток в качестве инокулята наблюдали только локальный рост без метастазирования. При трансплантации опухолевой ткани в париетальную или висцеральную плевру nude-мышей получали раннюю или запущенную модель поражения плевры. Полученная модель, идентичная клинической ситуации по симптоматике, различиям между поражением париетальной (ранняя симптоматика) и висцеральной (поздняя симптоматика) плевры, причине и срокам гибели от дыхательной недостаточности, пригодна для доклинического изучения новых лекарств.

Злокачественная плевральная мезотелиома человека является одной из самых агрессивных и трудно лечимых опухолей. Адекватная модель необходима для улучшения терапевтической ситуации. Для получения первых моделей свежие фрагменты от пациентов со злокачественной мезотелиомой имплантировали в париетальную плевру nude-мышей. Во всех случаях получены локальный опухолевый рост и идентичная клинике симптоматика с распространением опухоли на обе половины грудной клетки при поражении медиастинальных ЛУ. Если опухоль не распространялась на вторую половину плевральной полости, симптоматика была сглажена. Морфологически опухоль была верифицирована. Модель вполне пригодна для доклинического изучения лекарств [4].

Моделирование метастазов рака предстательной железы

Опыты выполняются аналогично ксенографтам колоректального рака Du-154 или рака предстательной железы PC-3, когда мы имеем дело с гормоннезависимой опухолью. Опухоли у nude-мышей растут локально, иногда дают метастазы и инвазию, прорастают в окружающие ткани, в том числе в мочевой пузырь. Возможной причиной гибели мышей в этом случае может быть обструкция мочевого пузыря и гидронефроз.

Моделирование метастазов рака яичников

Посредством метода SOI трансплантируют опухоль яичника под капсулу яичника nude-мышам. Опыты с опухолевым материалом от пациенток с опухолями разной степени дифференцировки показали следующее. Трансплантат от пациентки с высокодифференцированной инкапсулированной опухолью и асцитом дал локальный опухолевый рост по типу цистаденокарциномы и мелкие метастазы в легкие. Трансплантат от пациентки с быстрорастущей первичной опухолью, занимающей всю брюшную полость, не дал локального роста, но вызвал метастазы в кишечник и париетальную брюшину. Последующие многочисленные эксперименты дали основание полагать, что для успешного моделирования метастазов яичника необходимо забирать трансплантат прямо от пациентки, опухоль должна расти локально в яичнике, а после трансплантации может метастазировать в легкие, давать отсева по брюшине и отдаленные органы, например в кишечник. Такие свойства позволили считать модель пригодной для доклинических целей и использовать ее.

Моделирование метастазов рака молочной железы

Опухолевый материал получают от пациенток и прямо трансплантируют nude-мышам в жировую ткань (складку) в области молочной железы, где опухоль растет экстенсивно и метастазирует в легкие.

Это первая и пока единственная модель метастазов рака молочной железы.

Возможные пути повышения метастазирования опухолей человека при ортотопической трансплантации nude-мышам

В результате анализа причин лучшего метастазирования ортотопически трансплантированных опухолей в сравнении с эктопически трансплантированными были сформулированы следующие условия, которые необходимо учитывать для хорошего результата. На первом месте — анатомические особенности опухоли, с которыми связано ее локальное микроокружение, включая возможность плохого кровоснабжения. Затем следует образование опухолевых эмболов и молекулы, которые могут специфически атаковать опухолевые клетки, а также тканеспецифичные молекулы экстрацеллюлярного матрикса. Обязательно определение локальных ростовых факторов и химических соединений, выделяемых локальным матриксом при контакте с трансплантатом.

Примеры таких соединений дают опыты с раком кишечника, клетки которого растут интрацеллюлярно и производят метастазы при высоком уровне продукции гепариназы и 2 типов IV коллагеназы (м. м. 92 и 64 kDa) в отличие от п/к трансплантированных клеток, которые не метастазируют. Эти ферменты считаются маркерами метастазирования ортотопически перевитых опухолей кишечника. Кроме этого, есть подтверждение тому, что фибробласты хозяина могут увеличивать способность клеток к метастазированию. Показано, что стромальные элементы ортотопического сайта, такие как фибробласты, способны взаимодействовать с эпителием органоспецифичной опухоли с запуском прямой клеточной инвазии в эктопический сайт.

Моделирование ортотопического рака почки

В качестве трансплантата используется (п/к) штамм рака почки человека РПоч1, полученный из удаленного опухолевого узла пациента НМИЦ онкологии [2]. Полученный ксенографт для ортотопической имплантации в паренхиму почки имеет адекватные трансплантационные характеристики: 100 % прививаемость и устойчивая динамика роста в течение не менее 3 нед. Гистологически опухоль светлоклеточная, представлена солидными полями крупных полиморфных клеток с митозами (10–15 в очаге), разделенными соединительно-тканевыми прослойками, и единичными очагами позднего некроза (21 сут роста), что свидетельствует о достаточном васкулогенезе. Наиболее ценны чувствительность модели к ингибиторам тирозинкиназ ($T/C_{\min} = 2–30\%$ без регрессии) и повышенные уровни экспрессии NK1.1 (в 1,5 раза) и CD8a (в 3,3 раза). Это

открывает возможность поиска на такой модели новых классических или таргетных цитостатиков и/или комбинаций для химио- или иммунотерапии диссеминированного рака почки [5, 6]. Важно также, что в Коллекции есть депонированная во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов одноименная оригинальная клеточная линия (рег. № Н-165). Такая тест-система выигрышна еще и потому, что позволяет оценить антипролиферативное действие агента или комбинации последовательно на 1 модели *in vitro/in vivo*.

Экспериментальные подтверждения гипотезы Педжета о ценности модели MetaMouse

Для того чтобы понять ведущую роль организма хозяина в опухолевой прогрессии, nude-мышам были трансплантированы гистологически верифицированные опухоли кишечника человека в серозную оболочку желудка (гетеротопический сайт) и серозную оболочку кишечника (ортотопический сайт) методом SOI. Для трансплантации были использованы 2 ксенографта: хорошо дифференцированная линия клеток Co-3 и мало дифференцированная линия клеток COL-3-ЖСК. После ортотопической трансплантации у 10 мышей наблюдали в основном идентифицированный визуально распространенный на серозную оболочку кишечника рост опухоли, локальный рост и метастазы в легкие найдены почти у половины мышей, наиболее часто встречались регионарные метастазы в ЛУ и инвазивный рост. В противоположность этому при гетеротрансплантации опухоли кишечника в желудок nude-мышам наблюдали мощный локальный рост с единичными случаями инвазии, без прорастания в серозную оболочку или инвазии в лимфатические сосуды. Этот опыт ясно показал, что только ортотопическая трансплантация в серозную или субсерозную оболочку приводит к требуемому характеру роста новообразования, который характеризуется способностью к инвазии, метастазированию и имплантации у иммунодефицитных мышей (ИДМ). Другими словами, оригинальный сайт реципиента при трансплантации опухолевого материала играет критическую роль в опухолевой прогрессии. Результаты трансплантации рака кишечника человека в печень nude-мышам показали, что таким образом можно моделировать метастазирование в печень. При этом выявлен интересный феномен обратного метастазирования (*reverse-metastazed*): метастазирующая опухоль кишечника человека, трансплантированная в печень nude-мышам, в свою очередь, метастазирует в кишечник. Эти данные демонстрируют избирательную способность злокачественной опухоли человека отсеивать и внедрять свои «семена» как в виде первичного, так и метастатического роста.

Изучение новых препаратов на «пациентоподобных» мышинных опухолевых моделях

Примером такого подхода могут служить эксперименты с использованием ингибитора матричных металлопротеиназ ВВ-94 (батимастат) в качестве ингибитора опухолевой прогрессии. Матричные металлопротеиназы, как известно, участвуют в росте и распространении метастазов опухолей. В опыте фрагменты рака кишечника человека были ортотопически трансплантированы методом SOI nude-мышами. ВВ-94 вводили мышам внутривентриально ежедневно более 2 мес. В результате масса леченой опухоли и частота инвазии уменьшились наполовину, частота полиорганного метастазирования — в 3 раза, а поджелудочная железа леченых мышей увеличилась при хорошей переносимости лечения. На основании этих данных ингибиторы металлопротеиназы были направлены на клиническое изучение, а модель признана пригодной для доклинических исследований средств адьювантной терапии рака.

Доклиническое изучение онкогенных потенциалов (туморогенности) различных агентов

В последние годы в России принят ряд важных правительственных решений по вопросам развития высокотехнологичных видов медицинской помощи, среди которых открытие новых криобанков для клеточных культур, основы клеточных медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП). Предпосылкой этому были разработки и успешное применение многих клеточных препаратов на основе различных функционально активных клеток [7–10]. МИБП проявляют регуляторно-репаративное и иммуностимулирующее действие, ориентированное на различные терапевтические цели. Соответственно свойствам МИБП используются для посттравматической реконструкции тканей [7], тканевой инженерии крупных сосудов [8], лечения инсулинзависимого сахарного диабета, производства противоионных или противоопухолевых вакцин и/или для заместительной терапии.

На доклинической стадии изучаются мезенхимальные и эмбриональные стволовые клетки, способные к переживанию *in vivo*. Поскольку имплантаты из культур клеток *in vivo* достаточно уязвимы для иммунологического надзора хозяина, разрабатываются методы иммобилизации с использованием различных матриц в виде близких к структуре губчатой кости микро- или трехмерных капсул (скаффолдов), в том числе из металлов.

Однако при этом возрастает опасность малигнизации клеток внутри скаффолда *in vivo*, не только в результате исключения иммунной реакции на атипичные клетки, но и по причине реставрации исходного клеточного фенотипа. Морфологические

исследования срезов могут выявить возможную атипичию, но только в мягких материалах. Канцерогенная или мутагенная активность некоторых металлов (никель или хром) известны, а онкогенные потенциалы современных пористых материалов из других металлов, например титана, не изучены. Применение новых МИБП невозможно без доклинического изучения их безопасности, что регламентировано рядом документов РФ. Одним из обязательных разделов доклинического изучения МИБП является определение онкогенных потенциалов или туморогенности, т. е. способности вызывать развитие злокачественной опухоли. Для выявления этого побочного действия на доклиническом этапе в настоящее время используются различные методики, наиболее достоверной из которых является п/к имплантация клеточного препарата мышам, лишенным трансплантационного иммунитета. Среди рекомендованных для изучения туморогенности животных — обычные иммунокомпетентные мыши, депрессированные классическими иммунодепрессантами (циклоспорином, азатиоприном, имураном, циклофосфаном, антилимфоцитарной, антиtimoцитарной сыворотками или антилимфоцитарным иммуноглобулином) или наследственные ИДМ, полученные нокаутированием генов, ответственных за трансплантационный иммунитет. Обычные иммунокомпетентные мыши дешевле и не требуют особых условий содержания, но биологически не вполне адекватны для современных МИБП. Но применение депрессанта создает не длительную, а временную иммуносупрессию, что не дает возможности достоверно оценить отдаленные проявления туморогенности, особенно при изучении иммобилизованных или инкапсулированных на носителях препаратов с отсроченным эффектом [11, 12].

Кроме того, наличие индуцированной системной иммуносупрессии, подавляющей все иммунные клеточные реакции, не дает возможности выявить пролиферативную активность клеток в ЛУ (мишенях возможного метастазирования) и дифференцировать ее от воспалительных изменений при применении нестерильных объектов.

ИДМ биологически интактны, так как не подвергаются экзогенным иммунодепрессивным воздействиям и вследствие этого могут давать адекватный биологический ответ на наличие туморогенности,

как в отношении опухолевого узла, так и в отношении диссеминации процесса. Важно то, что в качестве контроля в опытах на ИДМ параллельно используется группа животных, которым имплантируется такое же количество раковых клеток с близким к исследуемому препарату гистогенезом из доступных коллекций культур клеток [13], что дает возможность иметь доказательный отрицательный результат. Для подтверждения значимости указанной модели с использованием ИДМ при изучении онкогенных потенциалов МИБП различного происхождения, состава и назначения было предпринято настоящее исследование. В исследование включены МИБП интактные, в том числе нестерильные, и иммобилизованные на различных носителях, включая скаффолды из пористого титана.

Заключение

В настоящее время в России существуют de facto 2 учреждения, в которых имеются ИДМ, пригодные для выполнения экспериментальных и доклинических исследований. Питомник, филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, нарабатывает животных в Пушкино (Московская область) для продажи на территории РФ. Специализированный отсек НМИЦ онкологии нарабатывает животных для обеспечения и выполнения научно-исследовательских разработок в Москве. Наличие специализированного отсека для разведения и содержания иммунодефицитных животных в структуре НМИЦ онкологии, имеющем множество хирургических подразделений для лечения разнообразных злокачественных опухолей, позволило получить оригинальные модели опухолей человека, изучить основные характеристики их роста и выполнить ряд рекомендованных для внедрения плановых разработок в научно-исследовательских организациях, а также по заказам производителей лекарственных средств на территории России и стран СНГ. Обеспечение отечественными иммунодефицитными животными является основой современной материальной базы научно-исследовательских разработок, особенно на этапе бурного развития биотехнологических средств и таргетной терапии в онкологии.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Трещалина Е.М. Иммунодефицитные мыши разведения НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина РАМН: Возможности использования.

М.: Издательская группа НМИЦ онкологии, 2010.

2. Трещалина Е.М. Коллекция опухолевых штаммов человека. Под ред.

М.И. Давыдова. М.: Практическая медицина, 2009.

3. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and

- approval. Second ed. by B.A. Teicher and P.A. Andrews. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004.
4. Vailli V.E., Jacobs R.M., Norris A. et al. The histological classification of 602 cases of feline lymphoproliferative disease using the NCI working formulation. *J Vet Drugs Invest* 2000;12:296–306.
 5. Андропова Н.В., Ситдикова С.М., Морозова Л.Ф. и др. Моделирование ортотопического роста рака почки человека с перевиваемым штаммом РПоч1 на иммунодефицитных мышцах. *Российский биотерапевтический журнал* 2017;1:50–9. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-1-00-00.
 6. Самойленко И.В., Харкевич Г.Ю., Демидов Л.В. Применение блокатора рецепторов CTLA4 в лечении больших метастатической меланомой. *Российский медицинский журнал* 2015;1:4–9.
 7. Григорян А.С., Пилерович Е.Г., Павличенко Н.Н. и др. Влияние трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на посттравматические процессы при экспериментальной травме головного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):58–67.
 8. Григорян А.С., Кругляков П.В. Применение в тканевой инженерии крупных сосудов трансплантатов на основе аутогенных мононуклеарных клеток костного мозга. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):37–41.
 9. Зорин В.Л., Зорина А.И., Черкасов В.Р. Анализ зарубежного рынка регенеративной медицины. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):68–78.
 10. Панарин Е.Ф., Нудьга П.А., Петрова В.А. и др. Матрицы для культивирования клеток кожи человека на основе природных полисахаридов — хитина и хитозана. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2009;4(3):42–6.
 11. Pokrovsky V.S., Lesnaya N.A., Romanenko V.I., Treshalina H.M. A new triplet of combined chemotherapy with irinotecan, cisplatin and aranoza for lung cancer therapy. Abstract book of 20th International Congress of Anti-Cancer Treatment. Paris, 2009.
 12. Трешалина Е.М., Андропова Н.В., Райхлин Н.Т. Изучение онкогенных потенциалов различных иммунобиологических препаратов на иммунодефицитных мышцах. *Российский биотерапевтический журнал. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты* 2009;2:22.
 13. Кармацких О.Л., Ерофеев С.А., Кононович Н.А. и др. Опыт использования иммунологического препарата диплоидной клеточной культуры ЛЭЧ-4 (81) для замещения локального дефекта костной ткани длинных трубчатых костей собак. *Гений ортопедии: научно-теоретический и практический журнал* 2006;1:17–21.

МЕТАБОЛИЗМ ЖЕЛЕЗА, ФЕРРОПТОЗ, РАК

А.А. Вартамян

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

Контакты: Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

В 2012 г. была описана новая, железозависимая форма клеточной гибели – ферроптоз, отличающаяся по морфологическим, биохимическим и генетическим особенностям от апоптоза, аутофагии и программируемого некроза. В обзоре обсуждаются вопросы метаболизма железа в норме и при злокачественных новообразованиях, молекулярные характеристики ферроптоза и возможности терапии онкологических больных в свете новых данных.

Ключевые слова: метаболизм железа, ферроптоз, рак

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-14-20

IRON METABOLISM, FERROPTOSIS AND CANCER

A.A. Vartanian

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

In 2012 the new, iron-dependent form of cell death – ferroptosis – distinct from apoptosis, autophagy and programmed necrosis at morphological, biochemical, and genetic levels has been described. In this review we will discuss the iron metabolism in physiological and pathological processes in humans, the molecular characteristics of ferroptosis and therapeutic options of cancer patients in the light of new data.

Key words: iron metabolism, ferroptosis, cancer

Введение

Железо является наиболее распространенным и необходимым металлом в организме человека. Железо вовлечено в процесс переноса кислорода, опосредуемый гемоглобином или миоглобином [1]. Железо также участвует в биосинтезе ДНК и генерации аденозинтрифосфата в цикле Кребса [2, 3]. Кроме того, ионы железа задействованы в специализированных функциях нейронов и иммунной системы [4, 5]. Клетки получают железо в основном с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза трансферрина, сывороточного белка крови, способного связывать ионы Fe^{3+} . Большую часть этого железа клетки используют для включения в гем или кофакторы ферментов. Железо, не участвующее в метаболизме, в клетке депонируется в составе ферритина [6]. Как недостаток, так и избыток железа в организме человека могут вызывать тяжелые заболевания, и потому уровень его в организме жестко контролируется на посттранскрипционном уровне, тем самым обеспечивается биологическая доступность железа [7].

Ферроптоз – железозависимая форма программированной гибели клетки, впервые была описана в 2012 г. [8]. Ферроптоз морфологически и биохими-

чески отличается от апоптоза, некроза и аутофагии [9]. Ключевыми двигателями ферроптоза являются активные формы кислорода (АФК), которые образуются в ходе реакции Фентона (Fenton) – окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} .

В обзоре обсуждаются вопросы гомеостаза железа в норме и в условиях опухолевой трансформации, основные характеристики ферроптоза, а также возможности повышения эффективности противоопухолевой терапии модуляцией концентрации железа.

Метаболизм железа в норме и при злокачественных заболеваниях

В понимании метаболизма железа наступил новый этап в связи с обнаружением ряда переносчиков железа, транскрипционной регуляции активности генов, участвующих в метаболизме железа, пептидного гормона, гепсидина, продуцируемого гепатоцитами и регулирующего гомеостаз железа, а также открытием в 2012 г. ферроптоза – новой, железозависимой формы гибели клетки.

У млекопитающих железо сорбируется из пищи в виде нерастворимых солей в проксимальной части тонкого кишечника. При нейтральных рН Fe^{3+} , поступающий из пищи, имеет очень низкую растворимость,

и восстановление железа до Fe^{2+} существенно для его абсорбции. Восстанавливает Fe^{3+} в Fe^{2+} ферроредуктаза (реакция Haber–Weiss): $\text{Fe}^{3+} \rightarrow$ ферроредуктаза $\rightarrow \text{Fe}^{2+}$.

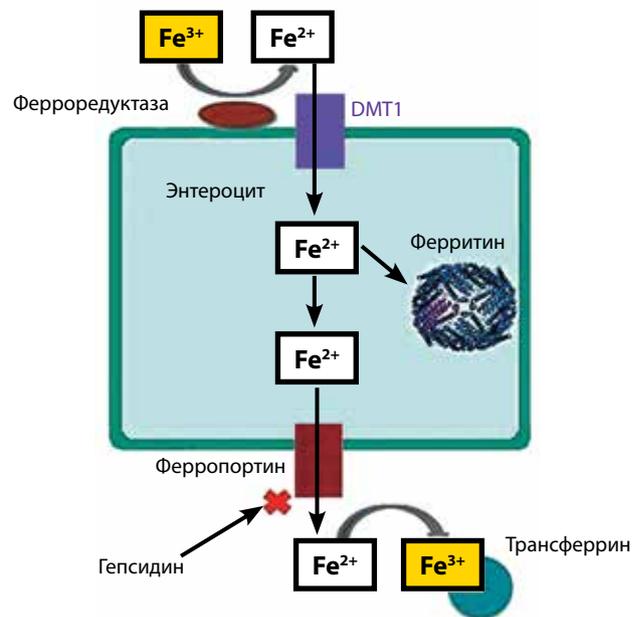
Основной путь поступления железа в энтероцит — его перенос через мембрану с помощью белкового транспортера-1 (DMT1), охарактеризованного для двухвалентных металлов. Внутриклеточный уровень железа регулируется главным образом путем депонирования его в клетке связыванием с ферритином. Ферритин участвует как в кратковременном, так и в длительном депонировании железа. Избыток железа, не связавшегося с ферритином, секретируется из клетки через базолатеральную мембрану в кровоток ферропортином (см. рисунок). Далее Fe^{2+} окисляется до Fe^{3+} гепестином (hephaestin), связывается с сывороточным белком — трансферрином, и разносится по всему организму для использования различными клетками (см. обзор [10]). Трансферрин является, пожалуй, самым важным участником метаболизма железа, именно поэтому он выступает одним из значимых диагностических маркеров дефицита этого металла. Связывание трансферрина со своим рецептором (TfR1, CD71) приводит к интернализации комплекса трансферрин/рецептор в клетку. В клетке железо диссоциирует из комплекса, а рецептор и трансферрин независимо возвращаются на поверхность клетки. Железо в клетке выполняет ряд метаболически важных функций, участвуя в синтезе гема или выступая кофактором ряда ферментов, например рибонуклеотидредуктазы, участвующим в биосинтезе ДНК, ферментов цикла Кребса, генерирующих аденозинтрифосфат — изоцитрат дегидрогеназы и сукцинат дегидрогеназы, а также аконитазы.

Универсальным регулятором метаболизма железа является гормон гепсидин, синтезирующийся в печени [11]. Гепсидин влияет как на абсорбцию поступающего с пищей элемента, так и на его высвобождение из макрофагов при утилизации стареющих эритроцитов. В ответ на повышение концентрации железа в крови в печени активируются синтез гепсидина и его секреция в кровоток, где гормон связывается с ферропортином, приводя к его деградации. В результате уровень железа в кровотоке снижается, снижается и уровень трансферринсвязанного железа. В случае недостатка железа транскрипция гепсидина подавляется, а уровень ферропортина возрастает, содействуя большей возможности использования железа в организме.

В отношении локализации свободного, не связавшегося с ферритином железа в клетках к настоящему времени имеется лишь ограниченное число данных из-за отсутствия соответствующих методов его обнаружения. Предполагают, что существуют небольшие клеточные лабильные пулы железа, и с этими пулами связывают токсичность железа для клетки.

Стремительный рост злокачественной опухоли требует значительно большего расхода железа, нежели метаболизм нормальных клеток. У онкологических больных дефицит железа обнаруживается постоянно [12]. Опухолевые клетки активно «изымают» из крови трансферрин, переносчик железа. Захват его тем значительнее, чем больше масса самой опухоли и чем более она злокачественна. Опухолевые клетки накапливают также ферритин, депонирующий железо, причем иногда в таких количествах (например, в клетках рака молочной железы), что он может играть роль маркера, т. е. с его помощью можно отличать злокачественное поражение молочной железы от доброкачественного [13]. Одна из причин такого активного поглощения железа опухолевыми клетками заключается в необходимости этого металла для биосинтеза ДНК и неконтролируемой пролиферации клеток.

Железо является также активной частью дыхательных ферментов, и при его недостатке ткани не могут усваивать кислород. Особенно от недостатка кислорода страдают опухолевые клетки. Чтобы выжить, клетки переходят на анаэробное образование энергии, частично покрывающее энергетические затраты. У онкологических больных нарушена также



Абсорбция железа в кишечнике. Железо сорбируется из пищи в виде нерастворимых солей Fe^{3+} . Ферроредуктаза восстанавливает Fe^{3+} в Fe^{2+} . Перенос Fe^{2+} в клетку осуществляется с помощью белкового транспортера — DMT1. Внутриклеточный уровень железа регулируется путем депонирования его в клетке связыванием с ферритином. Избыток железа, не связавшегося с ферритином, секретируется из клетки в кровоток с ферропортином. Гепестин окисляет Fe^{2+} в Fe^{3+} , который связывается с трансферрином и разносится по всему организму для использования различными клетками. Гепсидин является универсальным регулятором метаболизма железа

доставка железа тканям. Установлено, например, что трансферрин крови при росте злокачественных новообразований менее насыщен железом [14]. Затруднено выведение железа из мест депонирования. Было показано, что в клетках молочной железы, пораженных раком, количество ферропортина значительно ниже, чем в здоровых клетках молочной железы [15]. Накапливаются данные, указывающие на то, что чем агрессивнее опухоль, тем меньше в клетках содержится ферропортина. При этом, как показывают результаты вскрытия, печень и селезенка погибших от рака людей зачастую перегружены железом [16]. Реалистичным выглядит сценарий, согласно которому одной из основных причин смертности от рака являются расстройства, вызванные нарушением обмена железа в организме: железо участвует в биосинтезе ДНК и генерации аденозинтрифосфата.

Ферроптоз

В 2012 г. в лаборатории Стоквила (Колумбийский университет, США) была описана новая, железозависимая форма программируемой гибели клетки – ферроптоз [8]. Эта форма гибели клетки была связана с накоплением в клетке АФК, которые образуются в результате 2-й стадии реакции Haber–Weiss – реакции Фентона: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$. Реакция Фентона сводится к следующему: избыток железа, не связавшийся с ферритином или ферропортином, генерирует гидроксил-радикал. Реакционная способность гидроксил-радикала чрезвычайно высока, он способен окислить практически любое вещество клетки, включая ДНК, белки, липиды.

В начале 2000-х годов, когда В. R. Stockwell только начинал свои работы в этой области, лаборатория занималась скринингом соединений, направленных на гибель опухолевых клеток с мутациями в RAS-онкогене. В 2003 г. такое соединение было обнаружено – эрастин (erastin) [17]. Эрастин вызывал массовую гибель опухолевых клеток, но морфологические или биохимические характеристики апоптоза, такие как конденсация ядра, фрагментация ДНК или расщепление поли(АДФ-рибозо)-полимеразы, отсутствовали. На гибель клеток не влияли также ингибиторы каспаз или ингибиторы некроза или аутофагии. В 2008 г. в лаборатории были обнаружены еще 2 соединения, которые вызывали гибель клеток по типу, подобную гибели, вызванной эрастином, – RSL3 и RSL5 (RAS related lethal 3 и RAS related lethal 5) [18]. Далее выяснилось, что хелаторы железа блокировали гибель клетки, индуцированную такими соединениями [19]. К 2012 г. стало очевидным, что решающее значение для такой формы гибели клетки имеют ионы железа. Именно по этой причине ферроптоз и получил свое название, как отдельная форма

гибели клетки. Более детальное исследование вопроса выявило, что ведущую роль в запуске ферроптоза играют АФК, которые образуются в ходе реакции Фентона, а не при работе митохондриальной электрон-транспортной цепи [20].

Ферроптоз по морфологическим, биохимическим и генетическим особенностям отличается от апоптоза, аутофагии и программируемого некроза. Для гибели клетки по типу ферроптоза характерны такие морфологические изменения, как сжатие клетки и уменьшение размеров митохондрий, уменьшение и даже исчезновение митохондриальных крист. Наблюдается также повышение плотности внутренних мембран митохондрий [20].

Гибель клетки по типу ферроптоз индуцируется 2 классами низкомолекулярных соединений: соединениями, снижающими уровень глутатиона в клетке, и блокаторами глутатион пероксидазы. Глутатионзависимые ферменты работают во всех частях клетки, включая ядро, митохондрии и эндоплазматическую сеть [21]. Глутатион пероксидаза катализирует восстановление перекисей липидов в соответствующие спирты и восстановление пероксида водорода до воды [22]. Оба класса индукторов ферроптоза ведут к аккумулярованию в клетках АФК, которые, взаимодействуя с жирными кислотами мембран, приводят к их окислению. Таким образом, метаболизм железа и перекисное окисление липидов являются центральными медиаторами ферроптоза. В последние годы была выявлена взаимосвязь ферроптоза с такими заболеваниями, как болезнь Харрингтона, перивентрикулярная лейкомаляция, ишемическое повреждение печени и острая почечная недостаточность (см. обзор [9]).

Гибель клетки по типу ферроптоз тесно связана с другой формой клеточной гибели – аутофагией. Аутофагия, катаболический процесс удаления отработанных органелл, долгоживущих белков, патогенов и продуктов распада с помощью двухмембранных фагосом, сопровождает жизнедеятельность нормальной клетки на протяжении всего времени ее существования. На ранних стадиях опухолевой трансформации клетки активация аутофагии способствует развитию защитного механизма, проявляя противоопухолевый эффект. На поздних стадиях заболевания: при гипоксии, лучевой терапии или действии противоопухолевых препаратов, аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли. Сегодня получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что аутофагия является одним из ключевых факторов в поддержании баланса железа в клетке: протеолиз железосодержащих белков (а это долгоживущие белки) осуществляется кислыми гидролазами лизосом

[23]. Было показано, что ферритин проникает в лизосомы с помощью механизмов, характерных для аутофагии: наблюдалось повышение уровня LC-3B — белка мембран аутофагосом. Подтверждением участия аутофагии в метаболизме железа стали результаты с нокадаун ключевых генов, контролирующих аутофагию. Нокадаун гена *ATG5* — белка мембраны аутофагосом — приводил к блокированию ферроптоза, индуцированного эрастином. Более того, на клетках рака поджелудочной железы и рака молочной железы было показано, что хелаторы железа увеличивают уровень LC-3B и количество аутофагосом [24]. Более детальное исследование этой работы выявило, что авторы судили об аутофагии по увеличению количества аутофагосом, что может являться результатом активации инициации аутофагии или результатом супрессии деградации аутофагосом в целом. Нужны дополнительные исследования, например, с использованием блокаторов поздней стадии аутофагии, которые помогут выяснить, какие мишени задействованы при запуске аутофагии железом.

В ранних работах о клеточной гибели по типу ферроптоз было показано, что высокую чувствительность к ферроптозу проявляли опухолевые клетки с мутациями в генах семейства *RAS*, что предполагало, что для индукции ферроптоза необходим активный *RAS-RAF-MEK*-сигнальный путь. Следует отметить, что ферроптоз-чувствительные клетки с мутацией в *RAS*-онкогене характеризуются повышенной экспрессией CD71 и низким уровнем экспрессии ферритина — белков, принимающих активное участие в метаболизме железа [25]. Впоследствии на 117 клеточных линиях было показано, что эрастин индуцирует ферроптоз независимо от того, выявлена ли в опухолевой клетке мутация в генах семейства *RAS* [19]. Сегодня ферроптоз представляет собой важную потенциальную мишень для противоопухолевой терапии.

Ингибиторы ферроптоза также были идентифицированы [26]. В основном это хелаторы железа (ферростатин, дефероксамин, деферасирокс, липроксстатин-1) и соединения, снижающие уровень АФК в клетке (витамин E, N-ацетил-цистеин, глутатион). И если индукцию ферроптоза можно рассматривать как потенциальное противоопухолевое воздействие, то блокаторы ферроптоза, по всей видимости, будут востребованы для минимизации повреждений, вызванных ишемической болезнью, и для купирования нейродегенеративных заболеваний.

Терапия, направленная на железо

Количество железа во взрослом организме поддерживается скоординированными процессами импорта железа, его утилизации и хранения. Обмен железа у человека примечателен высокой степенью

сохранности его запасов. В норме за год теряется всего лишь 10 % этого элемента. В последние годы с развитием молекулярно-биологических технологий понимание метаболизма железа в связи с молекулярными механизмами канцерогенеза, индуцированного этим металлом, значительно расширилось. Выяснилось, что железо в организме выполняет двойную роль: при определенных условиях ионы железа могут запустить процессы канцерогенеза, тогда как в организмах с уже имеющимися злокачественными новообразованиями ионы железа способны повысить эффективность противоопухолевой терапии.

Первые публикации об участии железа в прогрессии злокачественных новообразований появились в начале 2000 годов. Был опубликован обзор о роли железа в запуске канцерогенеза (см. обзор [27]). В частности, обсуждалась необходимость этого металла для пролиферации клеток, он обеспечивает переход из фазы G1 в фазу S клеточного цикла. Позднее в США в рандомизированном исследовании, включающем более 8 тыс. человек, было выявлено, что чем выше содержание железа в крови, тем больше риск рака. Особенно чаще наблюдалось злокачественное поражение мочевого пузыря и пищевода [27]. В другом исследовании, тоже в США, было показано, что у мужчин и женщин после климакса с высоким уровнем железа в крови подверженность предраковым полипам в толстой кишке в 5 раз выше, чем у тех, в чьем организме уровень железа в норме. Возможно, именно наличие железа объясняет тот известный факт, что красное мясо (которое богато железом) способствует развитию рака толстой кишки [28].

Возможность эффективного предотвращения индуцированного железом риска процесса канцерогенеза путем хелатирования этого металла детально обсуждается в обзоре [29]. Появились данные и о том, что снижение уровня железа путем кровопускания уменьшало риск опухолеобразования у пациентов с атеросклерозом сосудов конечностей [30]. Таким образом, железо может быть важным фактором, определяющим вероятность возникновения рака.

В рутинной практике сегодня используют экспрессию белков, связывающих железо, как маркеров агрессивности опухоли. Так, количество ферропортина в клетках рака предстательной железы, молочной железы и гепатоцеллюлярной карциномы, было значительно ниже, чем в здоровых клетках [31–33]. Причем чем агрессивнее рак, тем меньше в клетках содержится ферропортина. Сывороточный уровень гепсидина, негативного регулятора ферропортина, заметно повышен у больных раком предстательной железы, молочной железы, множественной миеломой, неходжкинской лимфомой, гепатоцеллюлярной карциномой, раком яичника, раком желудочно-кишечного тракта, раком толстой кишки (см. обзор [34]).

Получены предварительные результаты доклинических исследований, указывающих на то, что сочетание индукторов ферроптоза с цитотоксическими препаратами может интенсифицировать избирательную гибель опухолевых клеток. Сегодня с Fe^{3+} -зависимой клеточной гибелью связывают большие надежды в терапии опухолей. Ввиду своей высокой химической активности присутствие железа в свободном, не связанном с ферритином или ферропортином состоянии способствует накоплению в клетке радикалов кислорода, что приводит к перекисному окислению липидов мембран митохондрий и разрыву их внешней мембраны. К ферроптозу оказались весьма чувствительны диффузная крупноклеточная В-лимфома, светлоклеточный рак почки, гепатоцеллюлярная карцинома, рак панкреатической железы, рак шейки матки, рак предстательной железы, остеосаркома или рак яичника (см. обзор [35]). В этих типах рака сочетание эрастина – индуктора ферроптоза – с темозоломидом, цисплатином, цитарабином, доксорубицином, адриамицином значительно уменьшало рост экспериментальной опухоли в мышцах. Недавно было показано, что введение железосодержащей воды до начала экспериментальной лучевой терапии приводило к редукции показателя степени суперспирализации ДНК крови уже в ранние сроки после лучевого воздействия, а также к определенному снижению роста экспериментальных глиом по сравнению с контролем, что, весьма вероятно, связано с ферроптозом [36].

Другим оптимистичным направлением противоопухолевой терапии на основе модуляции метаболизма железа в опухолевой клетке оказались опубликованные недавно данные об использовании терапевтических антител к CD71 или конъюгатов трансферрина, которые связываются с CD71 и интернализуются в клетку [37, 38]. Подобный подход может быть реализован для терапии рака молочной железы, рака почки, немелкоклеточного рака легкого, где наблюдается высокий уровень экспрессии CD71.

Несомненный интерес вызывают и исследования американских коллег, которым удалось с помощью молекулярно-биологических методов заблокировать экспрессию ферритина в клетках Т-лимфомы. Это привело к резкому повышению концентрации свободного, несвязанного железа, которое, в свою очередь, приводило к гибели опухолевых клеток [39].

Глубокий интерес вызывают данные о комбинировании антиангиогенных препаратов (бевацизумаб, сорафениб) с препаратами, снижающими уровень железа в крови [40, 41]. Логика такого подхода к лечению злокачественной опухоли сводилась к следующему: недостаток железа снижает уровень сывороточного гемоглобина, который доставляет кислород к тканям, следовательно, недостаток железа должен

повышать гипоксию и запускать ангиогенез. В экспериментальной модели рака легкого, растущей в C57/Black-мышцах, рост опухоли заметно снижался в ответ на бевацизумаб в мышцах с низким содержанием сывороточного железа. Уровень железа в крови C57/Black-мышей понижали желездефицитной диетой. Об эффективности комбинирования железа с антиангиогенной терапией свидетельствуют и данные ретроспективного исследования, включающего 43 пациента с раком толстой кишки. Ответ на лечение бевацизумабом был выше у больных с низким содержанием гемоглобина, чем у больных с нормальным содержанием гемоглобина (41,2 % против 17,6 %) [42].

Исследования последних лет привели нас к осознанию факта, что за развитие злокачественного процесса отвечает лишь крайне небольшое число клеток, способных давать начало опухолевому процессу, непрерывно пополняя популяцию клеток опухоли и регенерируя ее после удаления или разрушения большинства ее клеток. В 2006 г. был введен термин «стволовая клетка опухоли», которая определялась как клетка, долгоживущая, медленно пролиферирующая и способная к самообновлению и поддержанию гетерогенных популяций в опухоли. Эффективность существующей терапии оценивается способностью уменьшить размер опухоли. Но даже если мы отмечаем полную регрессию опухоли, всегда остается возможность ее повторного роста, потому что лечение было направлено на удаление основной популяции – пролиферирующих опухолевых клеток, а не стволовых клеток опухоли. На сегодняшний день мы слишком мало знаем о сигнальных путях, которые поддерживают жизнеспособность стволовой клетки опухоли. Обнаруженные недавно данные о том, что захват железа посредством CD71/трансферрин был заметно повышен у стволовых клеток глиобластомы по сравнению с нестволовыми клетками глиобластомы [43], чрезвычайно важные. Эти результаты указывают на то, что железо, по всей видимости, может стать еще одной мишенью для терапии, направленной на стволовые клетки опухоли.

Заключение

Накопленные за последнее десятилетие данные о механизмах действия железа можно разделить на 3 группы.

- Эпидемиологические исследования связывают повышенный уровень ионов железа с риском возникновения рака.
- Опухолевые клетки репрограммируют метаболизм железа, активируя экспрессию рецептора трансферрина (CD71) и подавляя экспрессию ферритина.
- В доклинических исследованиях показано, что использование хелаторов железа, терапевтических

антител к CD71 или конъюгатов трансферрина, которые связываются с CD71 и интернализуются в клетку, способствует повышению эффективности цитотоксической химиотерапии.

Таким образом, железо вовлекается в механизмы канцерогенеза, и железом можно убить опухолевую клетку. Сегодня мы стоим у самых истоков проблемы, и на многие вопросы не только нет ответов, но и достаточного количества объективных данных, чтобы сформулировать гипотезу. Индукторы ферроптоза – это не просто соединения, вызывающие массивное окисление биомолекул клетки, как это делает, например, H_2O_2 . Эрастин и другие индукторы ферроптоза не содержат остатки химических групп с редокс-активностью. В то же время ингибиторы ферроптоза блокируют летальность эрастина или RSL3, но не АФК в целом. По-прежнему неясной

остается роль железа в генерации АФК: медь (Cu^{2+}) и кобальт (Co^{2+}) также способны катализировать реакцию Фентона. В чем все же тогда заключается специфическая роль железа? И, что чрезвычайно важно, экспрессия каких маркеров указывает на чувствительность опухолевых клеток к ферроптозу?

Давно уже известно, что окислительный стресс, являющийся следствием дисбаланса про- и антиоксидантных систем клетки и отражающийся в избыточном образовании в клетке АФК, приводит к клеточной гибели по типу апоптоз. Апоптоз с точки зрения защиты клетки от окислительного стресса рассматривается сегодня как важная, хотя и крайняя, мера борьбы с неконтролируемой продукцией АФК. Почему АФК, генерируемые в реакции Фентона, активируют не апоптоз, а ферроптоз? Может, действительно, ферроптоз – это своего рода «саботаж» клетки [44]?

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kleingardner J.G., Bren K.L. Biological significance and applications of heme proteins and peptides. *Acc Chem Res* 2015;48(7):1845–52. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00106. PMID: 26083801.
- Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis – an update. *Frontiers in pharmacology* 2014;5:124–129. PMID: 24982634.
- Munoz M., Villar I., Garcia-Erce J.A. An update on iron physiology. *World journal of Gastroenterology* 2009;15:4617–4626. PMID: 19787824.
- Soares M.P., Weiss G. The Iron age of host-microbe interactions. *EMBO Rep* 2015;16(11):1482–500. DOI: 10.15252/embr.201540558. PMID: 26474900.
- Li K., Reichmann H. Role of iron in neurodegenerative diseases. *J Neural Transm (Vienna)* 2016;123(4):389–99. DOI: 10.1007/s00702-016-1508-7. PMID: 26794939.
- Yévenes A. The ferritin superfamily. *Subcell Biochem* 2017;83:75–102. DOI: 10.1007/978-3-319-46503-6-3. PMID: 28271473.
- Wang J., Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 2011;434:365–381. PMID: 21348856.
- Dixon S.J., Stockwell B.R. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;49:1060–1072. PMID: 22632970.
- Xie Y., Hou W., Song X. et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ* 2016;23:369–379. DOI: 10.1038/cdd.2015.158. PMID: 26794443.
- Wallace D.F. The Regulation of Iron Absorption and Homeostasis. *Clin Biochem Rev* 2016;37(2):51–62. PMID: 28303071.
- Reichert C.O., da Cunha J., Levy D. et al. Hepcidin: Homeostasis and Diseases Related to Iron Metabolism. *Acta Haematol* 2017;137(4):220–236. DOI: 10.1159/000471838. PMID: 28514781.
- Ludwig H., Evstatiev R., Kornek G. et al. Iron metabolism and iron supplementation in cancer patients. *Wien Klin Wochenschr* 2015;127(23–24):907–19. DOI: 10.1007/s00508-015-0842-3. PMID: 26373748.
- Kabat G.C., Rohan T.E. Does excess iron play a role in breast carcinogenesis? An unresolved hypothesis. *Cancer Causes Control* 2007;18(10):1047–53. PMID: 17823849.
- Gozzelino R., Arosio P. Iron Homeostasis in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2016;17(1):E130 – E138. DOI: 10.3390/ijms17010130. PMID: 26805813.
- Drakesmith H., Nemeth E., Ganz T. Ironing out Ferroportin. *Cell metabolism* 2015;22(5):777–87. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.09.006. PMID: 26437604.
- Kew M.C. Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Liver Cancer* 2014;3(1):31–40. DOI: 10.1159/000343856. PMID: 24804175.
- Dolma S., Lessnick S.L., Hahn W.C. et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* 2003;3:285–96. PMID: 12676586.
- Yang W.S., Stockwell B.R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem Biol* 2008;15:234–45. PMID: 18355723.
- Bedford M.R., Ford S.J., Horniblow R.D. et al. Iron chelation in the treatment of cancer: a new role for deferasirox? *J Clin Pharmacol* 2013;53(9):885–91. DOI: 10.1002/jcph.113. PMID: 23740857.
- Dixon S.J. Ferroptosis: bug or feature? *Immunol Rev* 2017;277(1):150–7. DOI: 10.1111/imr.12533. PMID: 28462529.
- Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995;251:3–7. PMID: 7651209.
- Brigelius-Flohe R., Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 2013;1830:3289–303. PMID: 23201771.
- Kidane T.Z., Sauble E., Linder M.C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:C445–55. DOI: 10.1152/ajpcell.00505.2005. PMID: 16611735.

24. Terman A., Kurz T. Lysosomal iron, iron chelation, and cell death. *Antioxid Redox Signal* 2013;18(8):888–98. DOI: 10.1089/ars.2012.4885. PMID: 22909065.
25. Yagoda N., von Rechenberg M., Zaganjor E. et al. RAS-RAFMEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature* 2007;447:864–8. DOI: 10.1038/nature05859. PMID: 17568748.
26. Cao J.Y., Dixon S.J. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci* 2016;73:2195–209. DOI: 10.1007/s00018-016-2194. PMID: 27048822.
27. Fonseca-Nunes A., Jakszyn P., Agudo A. Iron and cancer risk – a systematic review and meta-analysis of the epidemiological evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2014;23:12–31. PMID: 24243555.
28. Turner N.D., Lloyd S.K. Association between red meat consumption and colon cancer: A systematic review of experimental results. *Exp Biol Med*(Maywood) 2017;42(8):813–39. DOI: 10.1177/1535370217693117. PMID: 28205448.
29. Corcé V., Gouin S.G., Renaud S. et al. Recent advances in cancer treatment by iron chelators. *Bioorg Med Chem Lett* 2016;26(2):251–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.11.094. PMID: 26684852.
30. Zacharski L.R., Chow B.K., Howes P.S. et al. Decreased cancer risk after iron reduction in patients with peripheral arterial disease: results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2008;100(14):996–1002. DOI: 10.1093/jnci/djn209. PMID: 18612130.
31. Durigova A., Jacot W., Pouderoux S. et al. Iron metabolism in breast cancer: knowledge and future. *Ann Biol Clin (Paris)* 2012;70(4):387–96. PMID: 22796610.
32. Xue D., Zhou C.X., Shi Y.B. et al. Decreased expression of ferroportin in prostate cancer. *Oncol Lett* 2015;10(2):913–6. PMID: 26622594.
33. Wang Q., Zhou J., Zhong D. et al. Ferroportin in the progression and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Eur J Med Res* 2013. DOI: 10.1186/2047-783X-18-59. PMID: 24360312.
34. Nicolae C.D., Coman O.A., Ene C. et al. Hepcidin in neoplastic disease. *J Med Life* 2013;15;6(3):355–60. PMID: 24146699.
35. Yu H., Guo P., Xie X. et al. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumorous diseases. *J Cell Mol Med* 2017;21(4):648–57. DOI: 10.1111/jcmm.13008. PMID: 27860262.
36. Ivanov S.D., Semenov A.L., Mikhelson V.M. et al. Effects of iron ion additional introduction in radiation therapy of tumor-bearing animals. *Radiats Biol Radioecol* 2013;53(3): 296–303. PMID: 24450211.
37. Daniels T.R., Delgado T., Helguera G. et al. The transferrin receptor: targeted delivery of therapeutic agents into cancer cells. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2006;121:159–76. PMID: 16920030.
38. Daniels T. R., Delgado T., Rodriguez J.A. et al. The transferrin receptor: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clin Immunol* 2006; 121(2):144–58. PMID: 16904380.
39. Kiessling M.K., Klemke C.D., Kaminski M.M. et al. Inhibition of constitutively activated NF- κ B induces ROS- and iron dependent cell death in cutaneous T cell lymphoma. *Cancer Res* 2009;69(6):2365–74. DOI: 10.1158/0008-5472. PMID: 19258503.
40. Lachiaier E., Louandre C., Godin C. et al. Sorafenib induces ferroptosis in human cancer cell lines originating from different solid tumors. *Anticancer Res* 2014;34:6417–22. PMID: 25368241.
41. Ohara T., Noma K., Urano S. et al. A novel synergistic effect of iron depletion on antiangiogenic cancer therapy. *Int J Cancer* 2013;132(11): 2705–13. DOI: 10.1002/ijc.27943. PMID: 23161652.
42. Kitamura H., Koike S., Nakazawa K. et al. A reversal in the vascularity of metastatic liver tumors from colorectal cancer after the cessation of chemotherapy plus bevacizumab: contrast-enhanced ultrasonography and histological examination. *J Surg Oncol* 2013;107(2):155–9. DOI: 10.1002/jso.23244. PMID: 22903532.
43. Schonberg D.L., Miller T.E., Wu Q. et al. Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* 2015;28:441–55. PMID: 26461092.
44. Green D.R., Victor B. The pantheon of the fallen: why are there so many forms of cell death? *Trends Cell Biol* 2012;22:555–6. DOI: 10.1016/j.tcb.2012.08.008. PMID: 22995729.

РОЛЬ ОПУХОЛЕПОДОБНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕВМАТОИДНОМ АРТРИТЕ

М.В. Киселевский¹, Н.Ю. Анисимова¹, И.О. Чикилева¹, Р.Я. Власенко¹, Ю.И. Должикова¹,
С.М. Ситдикова¹, Ф.С. Сенатов², К.С. Янг³, Д.С. Янг⁴

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

²НИТУ «МИСиС»; Россия, 119991 Москва, Ленинский проспект, 4;

³School of Dental Technology, College of Oral Medicine, Taipei Medical University, Taipei 11031, Taiwan

⁴Graduate Institute of Nanomedicine and Medical Engineering College of Biomedical Engineering,
Taipei Medical University, Taipei 11031, Taiwan

Контакты: Сурия Мансуровна Ситдикова suriyasitdikova@yandex.ru

Мезенхимальные стволовые (мультипотентные) клетки (МСК) считаются стабильным, безопасным и доступным источником клеток-предшественников для целей регенеративной медицины. Однако МСК не только могут участвовать в процессах репарации тканей, но и при воздействии триггеров и медиаторов воспаления способны к трансформации, приобретая при этом свойства опухолевых клеток. Настоящий обзор посвящен роли МСК в патогенезе ревматоидного артрита. Высокая скорость пролиферации, отсутствие контактного торможения и инвазивный рост трансформированных МСК является важным механизмом деструкции хряща при ревматоидном артрите.

Ключевые слова: мультипотентные стволовые клетки, ревматоидный артрит, деструкция, хрящ

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-21-23

ROLE OF TUMOR-LIKE MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN RHEUMATOID ARTHRITIS

M. V. Kiselevskiy¹, N. Yu. Anisimova¹, I. O. Chikileva¹, R. Ya. Vlasenko¹, Yu. I. Dolzhikova¹,
S. M. Sitdikova¹, F. S. Senatov², K. C. Yang³, J. C. Yang⁴

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

²National University of Science and Technology "MISIS"; 4 Leninsky Prospekt, Moscow 119991, Russia;

³School of Dental Technology, College of Oral Medicine, Taipei Medical University, Taipei 11031, Taiwan;

⁴Graduate Institute of Nanomedicine and Medical Engineering College of Biomedical Engineering, Taipei Medical University,
Taipei 11031, Taiwan

Multipotent mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) are regarded as a stable, safe and easily available source of precursor cells for purposes of regenerative medicine. However, under repeated replication in tissue reparation processes and action of inflammatory mediators, aged MSCs may be transformed and obtain certain tumor-cell characteristics. The present review deals with the MSCs role in pathogenesis of rheumatoid arthritis. High proliferation speed, lack of contact inhibition and invasive growth of transformed MSCs is an important mechanism of cartilage destruction in rheumatoid arthritis.

Key words: mesenchymal stem cells, rheumatoid arthritis, destruction, cartilage

Введение

В последние годы во всем мире активно исследуют стволовые (мультипотентные) клетки как стабильный, безопасный и доступный источник клеток-предшественников для целей регенеративной медицины. Эти клетки из-за их способности дифференцироваться в специализированные, развивающиеся из мезодермы, были названы мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). МСК, также известные

как мультипотентные стромальные мезенхимальные клетки, существуют в тканях, развивающихся из различных источников. Эти клетки являются самовосстанавливающимися, мультипотентными, легкодоступными и обладают способностью к пролиферации *in vitro*, сохраняя при этом геномную стабильность. Однако известно, что МСК под воздействием воспалительных факторов подвержены трансформации и могут проявлять свойства, подобные опухолевым клеткам.

Перспективы применения МСК

Клиническое применение МСК сопряжено с минимальными этическими проблемами, т. е. отсутствуют реальные препятствия для их использования в клеточной терапии, регенеративной медицине и восстановлении тканей [1]. Поэтому, в отличие от стволовых эмбриональных клеток, МСК активно исследуются в качестве терапевтических средств для различного клинического применения.

МСК присутствуют не только в тканях плода и костном мозге, но также во многих тканях взрослых. Так, клетки, обладающие характеристиками МСК, были выделены из жировой ткани, амниотической жидкости, амниотической мембраны, тканей зубов, эндометрия, зачатков лимба, менструальной и периферической крови, слюнной железы, кожи, синовиальной жидкости [2].

Одно из определяющих свойств МСК — их способность к дифференцировке в мезодермальные линии: адипоциты, остеоциты и хондроциты. МСК также могут дифференцироваться в другие клетки мезодермального происхождения, в частности в миоциты [3]. Несмотря на мезодермальное происхождение, МСК показали способность к трансдифференцировке в нейронные клетки эктодермального происхождения, а также клетки, происходящие из энтодермы, такие как гепатоциты и панкреоциты [4–6].

В современную эпоху клеточной и регенеративной терапии МСК представляют большой интерес, о чем свидетельствуют многочисленные клинические исследования. Из-за иммуномодулирующих свойств МСК использовали не только для целей регенеративной медицины, но и для терапии аутоиммунных заболеваний человека, в частности остеоартрита. Вместе с тем проблемы безопасности применения МСК до конца не решены. Хотя МСК вызывают лишь слабые неблагоприятные эффекты, предполагается, что при длительном культивировании эти клетки могут приобретать свойства, способствующие росту и метастазированию опухоли [2]. Очевидно, несмотря на данные доклинических испытаний, свидетельствующих об отсутствии у МСК туморогенных свойств [7], существует вероятность их трансформации в процессе длительного культивирования.

Трансформированные МСК при ревматоидном артрите

МСК могут не только участвовать в репаративных процессах органов и тканей, но и играть важную роль в патогенезе аутоиммунных заболеваний, в частности в развитии ревматоидного артрита (РА). При РА отмечается выраженное морфологическое изменение синовиальной оболочки, включая формирование агрессивной опухолеподобной структуры,

называемой паннусом, который захватывает и разрушает хрящ, а также субхондральную костную ткань [8]. Паннус состоит из различных типов клеток, включая воспалительные, иммунные и мезенхимальные. Последние, называемые фибробластоподобными синовиоцитами ревматоидного артрита (РАФПС), играют важную роль в инвазивной деструкции ткани за счет высвобождения большого количества ферментов, разрушающих суставную матрицу. РАФПС морфологически характеризуются как незрелые, трансформированные фибробласты и по сравнению с обычным фибробластоподобным синовиоцитом (ФПС) имеют более высокую скорость пролиферации и высокую инвазивность, вторгаясь в хрящ и разрушая его [9, 10]. Механизмы, лежащие в основе опухолеподобного фенотипа РАФПС, могут быть обусловлены дедифференцировкой нормальных ФПС, по-видимому, путем накопления генетических и эпигенетических аномалий, сходных с таковыми при онкологических заболеваниях [11]. В поддержку этой гипотезы свидетельствует гиперэкспрессия РАФПС ряда протоонкогенов, в том числе *myc*, *ras* и *fos* [12]. Другая точка зрения, отвергающая гипотезу «трансформации», основана на замедлении пролиферации РАФПС после нескольких пассажей в культуре [13].

Происхождение РАФПС также является предметом дискуссий. Предполагают, что РАФПС могут происходить из нормальных ФПС или представлять собой субинтимальные фибробласты, мигрировавшие в область поражения и приобретшие измененную морфологию. Недавно было обнаружено, что часть гетерогенной популяции обладает свойствами, которые обычно ассоциируются с МСК. При стимуляции в культуре часть РАФПС подобно МСК может дифференцироваться в хондроциты, остеобласты, адипоциты и миоциты [14]. Псевдотрансформация нормальных ФПС бывает обусловлена хроническим воздействием на эти клетки воспалительной среды суставов при РА. В соответствии с такой теорией РАФПС представляют собой дедифференцированные предшественники резидентных ФПС, индуцированные артритопатогенными стимулами, например хронической вирусной или бактериальной инфекцией.

Хроническое воспаление в суставе может вызывать стабильно повышенные уровни сигналов повреждения, что обеспечивает постоянный приток в сустав МСК. В то же время воспалительная среда в артритных суставах, способствуя рекрутированию МСК из костного мозга, блокирует сигналы дифференцировки, исходящие из микроокружения, поддерживая клетки в недифференцированном состоянии. Поэтому РАФПС могут рассматриваться как МСК, арестованные на разных стадиях дифференцировки. Кроме того, РАФПС могут рассматриваться

как недифференцированные прекурсоры, а не как дифференцированные предшественники резидентных ФПС [15]. Вместе с тем накопленные к настоящему моменту данные свидетельствуют о том, что синовиальные МСК обладают свойствами трансформированных клеток, в частности, у них отсутствует контактное торможение. Нормальные культивируемые фибробласты размножаются в культуре до тех пор, пока не достигнут слияния, после чего синтез ДНК прекращается. Трансформированные МСК теряют этот механизм контроля.

Наиболее убедительные свидетельства трансформации синовиоцитов РА *in vivo* были продемонстрированы на модели иммунодефицитных (SCID) мышцей. Клетки синовиальной ткани больных РА были имплантированы в область хряща мышцей SCID, проникали в хрящевую матрицу и вызывали изменения, похожие на деструктивный паннус [16]. Это явление наблюдается даже при использовании чистой популяции долговременно культивируемых РАФПС [17]. Поэтому понятие о том, что ревматоидный синовиум является локально-инвазивной

опухолью, имеет право на существование. Синовиоциты больных с остеоартритом и нормальные дермальные фибробласты неспособны к инвазии в хрящ. Эти признаки указывают на то, что данный вид активности уникален для РАФПС и является убедительным доказательством их необратимой трансформации, которая позволяет оставаться им активными даже после удаления из воспалительной суставной среды. Культивируемые РАФПС при введении в суставную полость мышцей продолжают мигрировать и вторгаться в хрящ без дополнительной экзогенной стимуляции.

Заключение

Таким образом, МСК не только могут участвовать в процессах репарации тканей, но и при воздействии триггеров и медиаторов воспаления способны к трансформации, приобретая при этом свойства опухолевых клеток. Высокая скорость пролиферации, отсутствие контактного торможения и инвазивный рост трансформированных МСК служат важным механизмом деструкции хряща при РА.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Horwitz E.M., Le Blanc K., Dominici M. et al. International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393–5. DOI: 10.1080/14653240500319234.
- Ullah I., Subbarao R.B., Rho G.J. Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective. *Biosci Rep* 2015/35/art:e00191. DOI: 10.1042/BSR20150025.
- Wakitani S., Saito T., Caplan A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995;18:1417–26. DOI: 10.1002/mus.880181212.
- Xu W., Zhang X., Qian H. et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype *in vitro*. *Exp Biol Med* 2004;229:623–31.
- Tang D.Q., Wang Q., Burkhardt B.R. et al. *In vitro* generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. *Am J Stem Cells* 2012;1:114–27.
- Gabr M.M., Zakaria M.M., Refaie A.F. et al. Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant* 2013;22:133–45. DOI: 10.3727/096368912X647162.
- Rengasamy M., Gupta P.K., Kolkundkar U. et al. Preclinical safety & toxicity evaluation of pooled, allogeneic human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Indian J Med Res* 2016;6:852–64. DOI: 10.4103/ijmr. IJMR_1842_15.
- Firestein G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356–61. DOI: 10.1038/nature01661.
- Pap T., Muller-Ladner U., Gay R.E., Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:361–7. DOI: 10.1186/ar113.
- Edwards J.C. Fibroblast biology. Development and differentiation of synovial fibroblasts in arthritis. *Arthritis Res* 2000;2:344–47. DOI: 10.1186/ar110.
- Firestein G.S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996;39:1781–90. DOI: 10.1002/art.1780391103.
- Muller-Ladner U., Kriegsmann J., Gay R.E., Gay S. Oncogenes in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995;21:675–90.
- Lafyatis R., Remmers E.F., Roberts A.B. et al. Anchorage-independent growth of synoviocytes from arthritic and normal joints. Stimulation by exogenous platelet-derived growth factor and inhibition by transforming growth factor-beta and retinoids. *J Clin Invest* 1989;83:1267–76.
- Yamasaki S., Nakashima T., Kawakami A. et al. Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology (Oxford)* 2004;43:448–52.
- Li X., Makarov S.S. An essential role of NF- κ B in the tumor-like phenotype of arthritic synoviocytes. *PNAS* 2006;103(46):17437. DOI: 10.1007/s10753-015-0220-3.
- Geiler T., Kriegsmann J., Keyszer G.M. et al. A new model for rheumatoid arthritis generated by engraftment of rheumatoid synovial tissue and normal human cartilage into SCID mice. *Arthritis Rheum* 1994;37:1664–71.
- Müller-Ladner U., Kriegsmann J., Franklin B.N. et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996;49:1607–15.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ЛЕЧЕНИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ПОЖИЛЫХ

Д.А. Рябчиков¹, Н.К. Чепелова², И.К. Воротников¹, Д.А. Денчик¹

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

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

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

Течение рака молочной железы у пожилых имеет ряд особенностей, что связано с повышенным риском развития различного рода осложнений. Рекомендации по лечению рака молочной железы у пожилых носят противоречивый характер — от радикальных операций до консервативной терапии. На сегодняшний день нет конкретных клинических рекомендаций в отношении данной возрастной группы, что делает эту статью актуальной.

Ключевые слова: рак молочной железы, фактор прогноза, молекулярный подтип, гормональная терапия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-24-31

MODERN METHODS OF TREATMENT OF BREAST CANCER IN THE ELDERLY

D.A. Ryabchikov¹, N.K. Chepelova², I.K. Vorotnikov¹, D.A. Denchik¹

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

²Sechenov University; p. 2, 8 Trubetskaya St., 119991 Moscow, Russia

The prognosis of breast cancer in the elderly is associated with increased risk of various complications. Recommendations for the treatment of breast cancer in this group of patients are controversial and range from radical surgery to conservative therapy. There are no specific clinical recommendations for this age group. It makes this problem relevant.

Key words: breast cancer, prognosis factor, molecular subtype, hormonal therapy

Введение

В структуре заболеваемости злокачественными новообразованиями среди женщин рак молочной железы (РМЖ) занимает первое место. В возрастной группе 60 лет и старше у женщин РМЖ составляет 18 % всей онкопатологии [1]. Пятилетняя выживаемость при РМЖ между странами существенно различается — от 95 % и более в Северной Америке, Швеции и Японии, до 60 % в странах со средним уровнем дохода и менее 40 % в странах с низким уровнем дохода [2]. Течение РМЖ у пожилых имеет ряд особенностей, что сопряжено с повышенным риском развития осложнений. Так, чаще обнаруживается множественная лекарственная устойчивость, что может привести к снижению эффективности лекарственной терапии. С увеличением возраста больных нарастает экспрессия гена *Vcl-2*, препятствующего апоптозу. Также отмечено, что с возрастом снижаются продукция сосудистого эпителиального фактора роста и ангиогенез, что и оказывает влияние на рост и метастазирование опухоли [3].

Современные подходы лечения основаны на клинических исследованиях, которые включают молодых женщин с РМЖ без выраженных сопутствующих патологий. Результаты этих исследований не могут быть экстраполированы на пожилых пациенток [4]. Следует отметить, что с возрастом у женщин увеличивается количество сопутствующих заболеваний. На момент постановки диагноза у многих пациенток отмечаются 2 и более сопутствующих патологий [5]. Так, в возрасте 65 лет и старше только 8 % больных со злокачественными опухолями не имеют сопутствующих заболеваний, 37 % больных имеют 2, а 55 % больных — 3 и более сопутствующих патологий [6]. Продолжительность жизни у таких пациенток значительно короче, и оценка результатов лечения разительно отличается от основной выборки.

Рекомендации по лечению РМЖ у пожилых противоречивы — от радикальных операций до преимущественно консервативной терапии [7]. Крупных рандомизированных исследований по лечению пожилых больных РМЖ не так много, поскольку

возраст старше 65 лет часто является критерием включения для клинических исследований и не существует конкретных клинических рекомендаций в отношении данной возрастной группы [8–10].

В 2007 г. было начато исследование The FOCUS: «Рак молочной железы у пожилых: оптимизация клинического руководства с использованием клинико-патологических и молекулярных данных». База данных The FOCUS является самым большим, наиболее детализированным источником информации, основанным на выборке пожилых пациенток с РМЖ. База данных включает 3672 пациентки, у которых в период с 1997 по 2004 г. был диагностирован РМЖ в возрасте 65 лет и старше на момент постановки диагноза. Выявлено, что прогноз у женщин с РМЖ ухудшается с возрастом, независимо от молекулярного подтипа опухоли и методов лечения. Это было подтверждено как данными Национального онкологического регистра, так и когортного исследования FOCUS и исследования TEAM [11]. Результаты похожего исследования были опубликованы в JAMA в 2012 г. Данные разделили по 3 возрастным группам: моложе 65 лет, 65–74 года, 75 лет и старше. В этом исследовании, как и в предыдущем, было выявлено, что у пожилых женщин рак диагностируют в более поздней стадии (большой размер опухолей, чаще в узловой форме). Адьювантная химиотерапия (ХТ) проводилась в 51,3 % случаев среди женщин в возрасте моложе 65 лет, 22,9 % в возрастной группе 65–74 года и 5,2 % среди женщин в возрасте 75 лет и старше. Наблюдалось увеличение смертности от РМЖ с возрастом, от 5 % среди самой молодой группы до 8 % среди самых пожилых пациенток в соответствии с показателем многофакторных относительных рисков со значением 1,63 (95 % доверительный интервал 1,23–2,16; $p < 0,001$).

N.A. De Glas и соавт. выявили, что женщины с большим количеством сопутствующих заболеваний имели более высокий риск развития послеоперационных осложнений [12]. К общим послеоперационным осложнениям относятся патологии со стороны центральной нервной системы (инсульт), сердечно-сосудистой (инфаркт миокарда), легочной системы (пневмония), а также лимфатический отек верхней конечности [7]. Интересно, что большее количество сопутствующих заболеваний было связано с более высоким риском рецидивов среди пациенток моложе 75 лет и с меньшим риском возникновения рецидива среди более пожилых (≥ 75 лет). Вызывает интерес и тот факт, что сосуществование психиатрических сопутствующих заболеваний (в основном отражающих слабоумие) было связано с более низким риском возникновения рецидива [13]. Имеются также данные, которые свидетельствуют о том, что ожирение у больных РМЖ увеличивает

риск специфической и общей смертности у женщин в пременопаузе и постменопаузе. Увеличение массы тела после постановки диагноза увеличивает общую смертность [14]. При I–II стадиях РМЖ отмечено, что смертность выше от сопутствующей патологии (11,2 %), чем от рака (8,7 %). При III–IV стадиях смертность от РМЖ почти в 10 раз выше (58,7 %), чем от сопутствующей патологии (6,3 %), в последующие 3 года наблюдения [7].

C. Schairer и соавт. установили взаимосвязь наличия в анамнезе диабета с течением и прогнозом РМЖ у пожилых. Отмечено, что ожирение, сахарный диабет (СД) связаны с более высоким риском отечно-инфильтративного РМЖ [15]. Данные исследований влияния СД на прогноз заболевания очень противоречивые. В метаанализе, включавшем более 48 тыс. женщин с РМЖ, было отмечено, что диабет независимо связан с плохим прогнозом общей (ОВ) и безрецидивной выживаемости (БРВ) [16]. В другом исследовании проведен мультивариабельный регрессионный анализ для оценки токсичности ХТ при наличии у больных СД. Риск смертности от РМЖ и от всех других причин был оценен с помощью метода Каплана–Майера. Выявлена достоверная корреляция между наличием у больных СД, использованием ХТ и смертностью. Пациенты с РМЖ, не получающие ХТ, имели сходные показатели смертности при наличии и отсутствии СД в анамнезе. Однако у пациентов с СД, получающих ХТ, был отмечен значительно более высокий риск смертности, чем у пациентов без СД [17]. Однако есть и противоположные данные, которые сообщают о тенденции к более благоприятному прогнозу РМЖ у женщин с диабетом, что также было наиболее выражено у самых пожилых пациентов [18].

Гормональная терапия

Исследование уровней рецепторов стероидных гормонов в опухоли у пожилых больных в ряде случаев является решающим фактором для определения тактики лечения. Сопоставляя клинические данные с лабораторными результатами исследований тканей опухоли молочной железы, изучали прогностическую ценность часто используемых маркеров опухолей различных подтипов. Было обнаружено, что молекулярные подтипы (люминальный А, люминальный В, люминальный В Her2/neu⁺, Her2/neu⁺, тройной негативный) имеют большое прогностическое значение в пожилой популяции, даже после того как стали учитывать конкурирующую смертность [19]. Это исследование частично отвергает гипотезу о том, что природа опухоли у пожилых отличается или имеет более благоприятное течение, чем у более молодых пациентов, так как было показано, что наиболее агрессивные подтипы опухоли у молодых пациентов

(ERBB2+ и тройной негативный) также предсказывают худший прогноз. В то же время у выборки пожилых пациентов чаще наблюдался более благоприятный люминальный А тип по сравнению с показателями в предыдущих исследованиях, проведенных среди молодых пациентов.

Меньше противоречий и неопределенности существует вокруг гормональной терапии (ГТ) у пожилых пациенток. Для пациенток с HR⁺ метастатическим РМЖ руководства от National Comprehensive Cancer Network (NCCN) относят эндокринную терапию к лечению первой линии [20]. К сожалению, со временем многие рецептор-положительные опухоли становятся резистентными к эндокринной терапии, и такие пациенты могут стать кандидатами для получения ХТ. С учетом того, что ГТ обычно хорошо переносится, рассмотрение ее использования у пожилых пациентов должно проводиться в каждом случае с рецептор-положительными опухолями при тщательном контроле токсичности. Несмотря на то что хирургический метод лечения является основным для РМЖ, ряд проспективных клинических исследований продемонстрировал хорошие результаты применения ГТ у пожилых пациентов с небольшими рецептор-положительными опухолями. Женщины получали только тамоксифен вместо операции или совместно с оперативным вмешательством. Некоторые исследования демонстрируют более высокие показатели прогрессирования заболевания у женщин, не подвергшихся оперативному лечению [21].

На основе рандомизированных клинических исследований был проведен метаанализ оценки эффективности и побочных эффектов ингибиторов ароматазы (ИА) и тамоксифена у женщин в постменопаузе с ранним РМЖ. Основным компонентом адъювантной эндокринной терапии у женщин в постменопаузе с положительными эстрогеновыми рецепторами служит тамоксифен или ИА. Исходя из этого, БРВ и ОВ улучшались при монотерапии ИА по сравнению с тамоксифеном у данной категории больных [22]. Последовательная терапия ИА после тамоксифена улучшала БРВ по сравнению с тамоксифеном в монорежиме, но не улучшала ОВ [22]. Для побочных эффектов, связанных с сердечно-сосудистой системой, не было обнаружено различий между ИА (моно- или секвенированной терапией) и тамоксифеном, тогда как при секвенированной терапии по сравнению с ИА был более низкий риск сердечно-сосудистых осложнений. Переломы чаще связаны с ИА, тогда как риск развития рака эндометрия и венозной тромбоэмболии выше при использовании тамоксифена. ИА превосходят тамоксифен в качестве адъювантной ГТ для постменопаузального РМЖ с положительными эстрогеновыми рецепторами РМЖ.

Еще одно исследование показало преимущество неоадъювантной ГТ перед неоадъювантной ХТ у больных в менопаузе. Был проведен метаанализ среди операбельных пациенток с люминальным РМЖ в менопаузе. Частота клинического ответа между неоадъювантной ГТ и неоадъювантной ХТ была статистически различной. У пациенток, получавших неоадъювантную ГТ, также увеличилось количество органосохраняющих операций по сравнению с пациентками, получавшими ХТ. Было отмечено, что пациентки, получающие ГТ, лучше переносят лечение, что способствует выживаемости [23].

Химиотерапия

Объединенные данные клинических испытаний в рамках Alliance for Clinical Trials in Oncology (Alliance, ранее – Cancer and Leukemia Group B, CALGB) и в исследованиях с использованием данных Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER-Medicare) позволяют предположить, что применение ХТ у пожилых пациенток имеет такую же эффективность, как и у молодых, однако риск связан с большей токсичностью применяемых препаратов из-за сниженного почечного клиренса, низкого функционального статуса и ряда иных факторов [8, 24]. С возрастом частота сердечных заболеваний увеличивается, пожилые пациентки находятся в зоне риска по поводу сердечной токсичности препаратов. Отмечено, что трастузумаб может вызвать сердечную недостаточность [25]. Комбинация режимов трастузумаба с доцетакселом и карбоплатином сходна по эффективности с трастузумабом и антрациклинсодержащей ХТ, но ассоциируется с меньшей сердечной токсичностью [26–28]. Однако также имеются данные о кардиотоксичности антрациклинов, в то время как безантрациклиновые схемы могут быть использованы без серьезного риска осложнений сердечно-сосудистой системы у пожилых.

В исследовании SEER отмечено развитие сердечной недостаточности в группе 66–70 лет у 38 % пациенток, получающих адъювантную терапию на основе антрациклинов, по сравнению с 28 % при безантрациклиновой адъювантной ХТ, однако парадоксально – не было отмечено существенной разницы среди пациенток в возрасте 71–80 лет. В ретроспективном анализе 5 исследований метастатического РМЖ, проведенном Ассоциацией онкологии в Пьемонте, пожилые пациенты продемонстрировали сходную эффективность от системной ХТ в сравнении с более молодыми участниками исследований (в возрасте 50–69 и < 50 лет) с точки зрения частоты объективного ответа, времени до прогрессирования заболевания и ОВ [29]. Примечательно, что уровни токсического воздействия были одинаковыми у более молодых и пожилых пациентов. Таким образом,

оказалось, что преимущества ХТ, которая применима к более молодым пациентам, также актуальны, по крайней мере для подгруппы пожилых пациентов. Это относится к определенным пожилым пациентам, остальным требуются другие терапевтические стратегии [20].

Руководство SIOG для пожилых пациентов рекомендует режим ХТ одним препаратом по сравнению с комбинированной ХТ из-за меньшей степени токсичности. В руководстве SIOG говорится, что «предпочтение следует отдавать лекарственным препаратам с лучшими профилями безопасности (таким, как еженедельные таксаны, доксорубин, капецитабин и винорелбин), применение которых изучалось для пожилых пациентов» [30].

Трастузумаб и пертузумаб, моноклональные антитела против Her2 рекомендованы для большинства пациентов с Her2⁺ РМЖ, при этом комбинация трастузумаба, пертузумаба и таксанов указана в качестве предпочтительного режима терапии первой линии для лечения Her2⁺ метастатического РМЖ [20]. Обнаружено, что используемый маркер Her2 также является серьезным прогностическим фактором рецидива у более пожилых пациенток с РМЖ [31], что сопоставимо с результатами исследований у более молодых пациентов. Анализы NCCN в рамках программы SEER-Medicare говорят о том, что пожилые пациенты, приступив к лечению по схемам с трастузумабом, с меньшей вероятностью, чем молодые женщины, способны завершить 1 год терапии [9, 10]. Повышенная кардиотоксичность у пожилых женщин, получающих трастузумаб, подчеркивает необходимость регулярного наблюдения за сердечной функцией, однако данные SEER-Medicare говорят о недостаточном мониторинге [32]. Мультицентровые клинические исследования проводятся для изучения подходов к лечению пациентов с Her2⁺ РМЖ с меньшим токсическим эффектом. Можно избежать лечения антрациклинами с помощью таких схем, как доцетаксел – карбоплатин – трастузумаб, или используя схемы с более низкой интенсивностью, такие как паклитаксел – трастузумаб [33].

Было проведено 2 крупных проспективных рандомизированных исследования, в ходе которых изучали эффективность и переносимость капецитабина в качестве адъювантной терапии у пожилых женщин с РМЖ. В исследовании CALGB 49907 [34] 633 пациентки с I–III стадиями рака с опухолями не менее 1 см были рандомизированы для получения стандартной ХТ: доксорубин + циклофосфамид (АС) в течение 4 курсов или циклофосфамид, метотрексат и фторурацил (СМФ) в течение 6 курсов (на выбор врача/пациента) – против капецитабина в течение 6 курсов. В результате при оценке 3-летней БРВ были выявлены следующие показатели: 85 % против 68 %

и 91 % против 86 % соответственно. Эти результаты недавно обновлены после 7 лет наблюдения [27] и остались неизменными, что свидетельствует о неполноценности капецитабина по сравнению со стандартной ХТ. Следует отметить, что различия в результатах между группами лечения по CALGB 49907 наблюдались в первую очередь среди пациентов с гормонально отрицательными опухолями молочной железы [34].

В другом исследовании (Ibandronate and Capecitabine in Elderly Women – ICE) 1358 больных РМЖ в возрасте 65 лет и старше были рандомизированы для получения ибандроната в течение 2 лет и получения ибандроната (2 года) плюс капецитабин в течение 6 курсов. Анализ исследования продемонстрировал сходные результаты между группами лечения через 3 года, а также не выявил никакой разницы в ОВ [28]. Более того, как в исследованиях CALGB 49907, так и в исследовании ICE у пациентов, получавших капецитабин, чаще отмечался токсический эффект, а переносимость была меньше ожидаемой. В исследовании CALGB 49907 также отмечено, что большее число женщин завершили плановый курс лечения АС, чем те, которым был назначен капецитабин [34].

Лучевая терапия

Адъювантная лучевая терапия (ЛТ) – стандартная процедура для всех пациентов, которым выполняется органосохраняющая операция [35–39]. В метаанализе Оксфордского университета проведена оценка показателей выживаемости пациенток после лампэктомии среди 2 групп, в одной из которых получали ЛТ после операции, а в другой не получали. В результате применение ЛТ приводило к двукратному уменьшению рецидива. Тем не менее абсолютное снижение данного показателя в течение 10 лет у женщин старше 70 лет составляет всего 8,8 % по сравнению с женщинами моложе 70 лет, что составило 17,7 % соответственно [35]. В другом исследовании женщинам в возрасте 65 лет и старше с люминальным РМЖ T1–2N0M0 после лампэктомии проводилась эндокринная терапия в сочетании или без ЛТ. У пациенток, которые получали ЛТ, было отмечено значительное снижение частоты местных рецидивов на протяжении 5 лет [40]. Эти данные подтверждаются еще в нескольких исследованиях [41].

Оценка сигнального лимфатического узла иногда опускается по 3 причинам. Во-первых, пациентки с высоким риском хирургических осложнений не должны подвергаться общей анестезии. Во-вторых, если пациентке противопоказано проведение ХТ из-за медицинских сопутствующих заболеваний, оценка лимфатических узлов не проводится, поскольку дополнительная информация не повлияет

на решение проведения системной терапии. Третье обоснование для отказа оценки лимфатических узлов основано на экстраполяции от ACOSOG (American College of Surgeons Oncology Group) Z0011, которая показала отсутствие преимущества подмышечной лимфодиссекции в клинически не вовлеченной подмышечной области [42], что также подтверждают более новые исследования, в которых не было обнаружено снижения показателей выживаемости в группе, подвергшейся лимфодиссекции после изучения сигнальных лимфатических узлов [40]. Исследования базы данных SEER оценивали использование и потенциальную выгоду облучения всей железы у пожилых пациентов. R.J. Cohen и соавт. продемонстрировали улучшение ОВ у женщин в возрасте 70+ [38]. Медиана выживаемости составила 13,1 года для женщин, которым были выполнены операция и ЛТ, и 11,1 года для тех, кто получал только хирургическое лечение. БРВ улучшилась приблизительно на 2 %, и это улучшение сохранялось в течение 15 лет. ОВ была улучшена на 15,5 % через 5 лет (88,6 % против 73,1 %), 23,3 % через 10 лет (65 % против 41,7 %) и 19,6 % через 15 лет (39,6 % против 20 %). Korah и соавт. провели аналогичное исследование, продемонстрировав улучшение БРВ и ОВ с добавлением ЛТ к хирургическому лечению у пациентов с T1–2 с положительными эстрогеновыми рецепторами РМЖ [39]. Они показали аналогичное улучшение выживаемости примерно на 2 % через 5 лет, что удвоилось до 4 % к 8 годам. ОВ также увеличилась с добавлением ЛТ на 19 % через 5 лет и на 23 % через 10 лет.

В 2011 г. экспертами консенсуса ASTRO был сформирован научный совет для создания клинических рекомендаций [43] и определения показаний к послеоперационному режиму гипофракционированного облучения молочной железы. В основу легли результаты 4 крупных проспективных исследований, которые продемонстрировали схожие показатели локального контроля и примерно равное число поздних осложнений. Согласно рекомендациям укороченный гипофракционированный курс ЛТ на молочную железу (42,5 Гр за 16 фракций) может быть применен после органосохраняющих операций при соблюдении следующих условий: возраст старше 50 лет, стадия pT1–2N0, отсутствие предшествующей ХТ, при планировании колебание дозы в пределах молочной железы ± 7 %, сердце не должно попадать в зону облучения. Что касается токсичности терапии, то было отмечено, что гипофракционирование ассоциировано с меньшим риском развития лучевых дерматитов \geq II степени (27,4 % против 62,6 % при традиционном фракционировании, $p < 0,001$) и боли в облучаемой молочной железе (24,2 % против 41,1 %, $p = 0,003$) [44].

Для пациенток, не подходящих под соответствующие критерии, нет однозначных данных по применению этого метода, однако ряд экспертов считают гипофракционирование приемлемым для пациенток с метастазами в подмышечных лимфатических узлах, получавших ХТ [45]. Другим вариантом, который может быть особенно подходящим для пожилых людей, является ускоренное частичное (парциальное) облучение молочной железы (Accelerated Partial Breast Irradiation, APBI). Это новый метод ЛТ только на ложе удаленной опухоли, который обеспечивает быстрое и удобное лечение после органосохраняющих операций. APBI проводится 2 раза в день в течение 5 дней подряд с интервалом между фракциями 6 ч. По рекомендациям консенсуса ASTRO критериями отбора пациентов для этой процедуры являются: возраст старше 60 лет, размер опухоли < 2 см, люминальный тип, недольковый рак, отрицательные края > 2 мм, N0, отсутствие признаков сосудистой инвазии [46]. Несоблюдение данных критериев может привести к неудовлетворительным косметическим результатам, а также развитию токсических эффектов. Так, проанализировав результаты проведения APBI после органосохраняющих операций у женщин с РМЖ, был сделан вывод о том, что чем больше женщина не подходила под критерии отбора, тем выше у нее наблюдалась частота локальных неудач [47]. В канадском исследовании RAPID рандомизировали пациенток на облучение всей груди, используя гипофракционированный подход 42,5 Гр в 16 фракциях или 50 Гр в 25 фракциях по сравнению с внешним лучевым APBI 38,5 Гр в 10 фракциях, 2 раза в день. Ранние результаты указывают на то, что у APBI был более плохой косметический эффект через 3 года по сравнению с группой облучения всей груди (35 % против 17 %, $p < 0,001$). Кроме того, токсичность 1-го и 2-го классов была увеличена в группе APBI по сравнению с группой облучения всей груди, но не было различий в токсичности III+ степени [48].

Самым современным методом ЛТ при T1 на сегодняшний день является интраоперационное облучение молочной железы (ИОРТ). Это метод, при котором ЛТ проводится за 1 сеанс во время операции сразу же после лампэктомии или мастэктомии. Примерно в 90 % случаев РМЖ рецидив возникает на месте удаленной опухоли, поэтому считается целесообразным проводить немедленное прицельное и высокодозное облучение этой зоны. Преимуществами данного метода являются относительная безопасность и экономическая выгода [49]. С 2006 по 2013 г. среди 395 женщин проведено исследование, цель которого изучение ранних осложнений после ИОРТ в течение 1 года после операции. Осложнения были у 108 (27,3 %) пациентов. Осложнения III или IV степени были обнаружены у 5 % пациенток. Среди осложнений:

инфекция — у 43 (10,8 %) больных, серома — у 40 (10,1 %), раневое расхождение — у 32 (8,1 %), кровотечение и гематомы — у 11 (2,8 %). Все осложнения были устранены [50].

В ходе международного рандомизированного исследования была отмечена не меньшая эффективность ИОРТ по сравнению с облучением всей молочной железы. Также был отмечен превосходный эстетический результат на протяжении 5 лет после процедуры [51]. Долгосрочные наблюдения за ИОРТ в настоящее время отсутствуют, поскольку самое продолжительное — с медианой 5,8 года. На сегодняшний день не было проведено никаких конкретных исследований данного метода среди пожилого населения, однако считается, что этот метод особенно показан для больных старше 65 лет с низкоагрессивными опухолями.

Малоинвазивные методы

Радиочастотная абляция является новым малоинвазивным методом чрескожной абляции, при котором проводится местное нагревание тканей для гибели опухолевых клеток. Современные ультразвуковые аппараты позволяют с высокой точностью позиционировать иглу-электрод в опухоли. Предполагается, что данная методика позволяет добиться локальной деструкции опухолевого узла в молочной железе. Несмотря на немногочисленность наблюдений, полученные результаты говорят о безопасности и потенциальной эффективности этого метода. Имеются данные о неэффективности метода у пациентов, получавших неoadъювантную ХТ [52]. Отмечены высокие показатели 5-летней БРВ (88 %) и ОВ (93 %). При оценке остаточных поражений после радиочастотной абляции и последующего хирургического вмешательства отмечена полная абляция у пациентов с более крупными размерами и отсутствие остаточного усиления по данным МРТ после радиочастотной абляции [7].

По данным метаанализа, среди более 400 больных в 89 % случаев отмечена полная абляция и в 96 % случаев — хороший и отличный косметический результат. Ожог кожи отмечен в 4 % случаев [53].

Другие малоинвазивные методы: микроволновая, высокоинтенсивная ультразвуковая и лазерная абляция, а также криодеструкция. Анализ данных 45 исследований, включивших в общей сложности более 1000 пациенток с РМЖ, показал высокие результаты эффективности данных методов и весьма незначительные показатели осложнений [54]. Так, краткосрочные осложнения наиболее часто отмечались при микроволновой абляции — 14 %, а рецидивы чаще встречались при лазерной абляции — 10 % [55]. Эти перспективные методы рассматриваются как возможная альтернатива хирургическому лечению, поскольку наличие сопутствующих заболеваний у пожилых больных делает риск оперативного вмешательства неоправданно высоким.

Заключение

Пожилые пациенты — неоднородная группа, имеющая свои особенности и требующая дальнейшего изучения. Данные литературы продолжают демонстрировать явное преимущество послеоперационной ЛТ у пожилых пациенток с ранним РМЖ. Послеоперационная ЛТ улучшает местный контроль и ОВ. ЛТ должна быть рекомендована всем пожилым пациенткам, которые способны переносить лечение и не имеют сопутствующих заболеваний, связанных с непосредственной угрозой жизни. ГТ должна быть предложена всем пациенткам с рецептор-положительными опухолями как дополнение к хирургическому лечению или в монорежиме, а подбор ХТ должен быть тщательным и индивидуальным для каждой пациентки, с учетом всех сопутствующих заболеваний и оценкой возможных осложнений и рисков.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России 2015 (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
2. Senkus E., Kyriakides S., Ohno S. et al. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2015;26(5):8–30. DOI: 10.1093/annonc/mdv298. PMID: 26314782.
3. Maher M., Dreyfus H., Campana F. et al. Management of breast cancer in the elderly. *Eur J Cancer Care (Engl)* 1995;4(2):75–9. PMID: 7599875.
4. van de Water W., Kiderlen M., Bastiaannet E. et al. External validity of a trial comprised of elderly patients with hormone receptor — positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(4):dju051. DOI: 10.1093/jnci/dju051. PMID: 24647464.
5. Мудраковская Э.В., Горелик С.Г. Структура сопутствующей патологии у больных пожилого и старческого возраста с урологическими заболеваниями. *ВНМТ* 2013;(1):101–3.
6. Личиницер М.Р. Гормонотерапия РМЖ. Материалы V Российской онкол. конф., 27–29 ноября. М., 2001. С. 23–24.
7. Воронников В.В. Клинико-морфологические особенности и лечение оперебельного рака молочной железы у пожилых (>65 лет) женщин. Дис. ... канд. мед. наук. СПб., 2016. 110 с.
8. Freedman R.A., Vaz-Luis I., Barry W.T. et al. Patterns of chemotherapy, toxicity, and short-term outcomes for older wom-

- en receiving adjuvant trastuzumab-based therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145(2):491–501.
DOI: 10.1007/s10549-014-2968-9.
PMID: 24756187.
9. Vaz-Luis I., Keating N.L., Lin N.U. et al. Duration and toxicity of adjuvant trastuzumab in older patients with early-stage breast cancer: a population-based study. *J Clin Oncol* 2014;32(9):927–34.
DOI: 10.1200/JCO.2013.51.1261.
PMID: 24516021.
PMCID: PMC3948095.
 10. Freedman R.A., Hughes M.E., Ottesen R.A. et al. Use of adjuvant trastuzumab in women with human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) – positive breast cancer by race/ethnicity and education within the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer* 2013;119(4):839–46.
DOI: 10.1002/cncr.27831. PMID: 23011924.
PMCID: PMC3565006.
 11. Sávolt Á. et al. Eight-year follow up result of the OTOASOR Trial: The Optimal Treatment Of the Axilla – Surgery Or Radiotherapy after positive sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. A randomized, single centre, phase III, non-inferiority trial. *Eur J Surg Oncol* 2017;43(4):672–9.
DOI: 10.1016/j.ejso.2016.12.011.
PMID: 28139362.
 12. de Glas N.A., Kiderlen M., Bastiaannet E. et al. Postoperative complications and survival of elderly breast cancer patients: a FOCUS study analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138(2):561–9.
DOI: 10.1007/s10549-013-2462-9.
PMID: 23446810.
 13. Kiderlen M., de Glas N.A., Bastiaannet E. et al. Impact of comorbidity on outcome of older breast cancer patients: a FOCUS cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 2014;145(1):185–92.
DOI: 10.1007/s10549-014-2917-7.
PMID: 24676624.
 14. Christifano D.N., Fazzino T.L., Sullivan D.K., Befort C.A. Diet Quality of Breast Cancer Survivors after a Six-Month Weight Management Intervention: Improvements and Association with Weight Loss. *Nutr Cancer* 2016;68(8):1301–8.
DOI: 10.1080/01635581.2016.1224368.
PMID: 27635676.
PMCID: PMC5160017.
 15. Schairer C., Gadalla S.M., Pfeiffer R.M. et al. Diabetes, Abnormal Glucose, Dyslipidemia, Hypertension and Risk of Inflammatory and Other Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2017;26(6):862–8.
DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0647.
PMID: 28087608.
 16. Zhao X.-B., Ren G.-S. Diabetes mellitus and prognosis in women with breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Medicine(Baltimore)* 2016;95(49):e5602.
DOI: 10.1097/MD.0000000000005602.
PMID: 27930583. PMCID: PMC5266055.
 17. Srokowski T.P., Fang S., Hortobagyi G.N., Giordano S.H. Impact of diabetes mellitus on complications and outcomes of adjuvant chemotherapy in older patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(13):2170–6.
DOI: 10.1200/JCO.2008.17.5935.
PMID: 19307509.
PMCID: PMC2674004.
 18. Kiderlen M., de Glas N.A., Bastiaannet E. et al. Diabetes in relation to breast cancer relapse and all-cause mortality in elderly breast cancer patients: a FOCUS study analysis. *Ann Oncol* 2013;24(12):3011–6.
DOI: 10.1093/annonc/mdt367.
PMID: 24026538.
 19. Engels C.C., Kiderlen M., Bastiaannet E. et al. The clinical prognostic value of molecular intrinsic tumor subtypes in older breast cancer patients: A FOCUS study analysis. *Mol Oncol* 2016;10(4):594–600.
DOI: 10.1016/j.molonc.2015.11.002.
PMID: 26706834.
 20. Daly M.B., Pilarski R., Axilbund J.E. et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw* 2016;14(2):153–62. PMID: 26850485.
 21. Nichols E.M., Cohen R.J., Cheston S.B., Feigenberg S.J. Radiation Therapy in the Elderly with Early Stage Breast Cancer: Review and Role of New Technology. *J Nucl Med Radiat Ther* 2014;5:204.
DOI: 10.4172/2155-9619.1000204.
 22. Ryden L., Heibert Arnlind M., Vitols S. et al. Aromatase inhibitors alone or sequentially combined with tamoxifen in postmenopausal early breast cancer compared with tamoxifen or placebo – meta-analyses on efficacy and adverse events based on randomized clinical trials. *Breast* 2016;26:106–14.
DOI: 10.1016/j.breast.2016.01.006.
PMID: 27017249.
 23. Huang L., Xu A.-M. Short-term outcomes of neoadjuvant hormonal therapy versus neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Expert Rev Anticanc* 2017;17(4):327–34.
DOI: 10.1080/14737140.2017.1301208.
PMID: 28271747.
 24. Hassett M.J., Silver S.M., Hughes M.E. et al. Adoption of Gene Expression Profile Testing and Association With Use of Chemotherapy Among Women With Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2012;30(18):2218–26.
DOI: 10.1200/JCO.2011.38.5740.
PMID: 22585699.
PMCID: PMC3397718.
 25. Sawaki M., Mukai H., Tokudome N. et al. Safety of adjuvant trastuzumab for HER-2-overexpressing elderly breast cancer patients: a multicenter cohort study. *Breast Cancer* 2012;19(3):253–8.
DOI: 10.1007/s12282-011-0270-9.
PMID: 21526424.
 26. Slamon D., Eiermann W., Robert N. et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2011;365(14):1273–83.
DOI: 10.1056/NEJMoa0910383.
PMID: 21991949.
PMCID: PMC3268553.
 27. Lichtman S.M., Cirrincione C.T., Hurria A. et al. Effect of Pretreatment Renal Function on Treatment and Clinical Outcomes in the Adjuvant Treatment of Older Women With Breast Cancer: Alliance A171201, an Ancillary Study of CALGB/CTSU 49907. *J Clin Oncol* 2016;34(7):699–705.
DOI: 10.1200/JCO.2015.62.6341.
PMID: 26755510.
PMCID: PMC4872024.
 28. von Minckwitz G., Reimer T., Potenberg J. et al. The phase III ICE study: Adjuvant Ibandronate with or without capecitabine in elderly patients with moderate or high risk early breast cancer. *JOUR. Cancer Res* 2015;75(9 Suppl): 3–4. Abstr.
 29. Christman K., Muss H.B., Case L.D., Stanley V. Chemotherapy of metastatic breast cancer in the elderly. The Piedmont Oncology Association experience [see comment]. *JAMA* 1992;268(1):57–62.
PMID: 1608114.
 30. Biganzoli L., Wildiers H., Oakman C. et al. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology(SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). *Lancet Oncol* 2012;13(4):e148–60.
DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70383-7.
PMID: 22469125.
 31. Engels C.C., Kiderlen M., Bastiaannet E. et al. The clinical value of HER-2 overexpression and PIK3CA mutations in the older breast cancer population: a FOCUS study analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2016;156(2):361–70.
DOI: 10.1007/s10549-016-3734-y.
PMID: 26968397.
PMCID: PMC4819549.
 32. Chavez-MacGregor M., Niu J., Zhang N. et al. Cardiac Monitoring

- During Adjuvant Trastuzumab-Based Chemotherapy Among Older Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2015;33(19):2176–83.
DOI: 10.1200/JCO.2014.58.9465.
PMID: 25964256.
PMCID: PMC4979214.
33. Tolaney S.M., Barry W.T., Dang C.T. et al. Adjuvant Paclitaxel and Trastuzumab for Node-Negative, HER2-Positive Breast Cancer. *N Engl J Med* 2015;372(2):134–41.
DOI: 10.1056/NEJMoa1406281.
PMID: 25564897. PMCID: PMC4313867.
34. Muss H.B., Berry D.A., Cirincione C.T. et al. Adjuvant Chemotherapy in Older Women with Early-Stage Breast Cancer. *N Engl J Med* 2009;360(20):2055–65.
DOI: 10.1056/NEJMoa0810266.
PMID: 19439741.
PMCID: PMC3082436.
35. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 801 women in 17 randomised trials. *Lancet* 2011;378(9804):1707–16.
DOI: 10.1016/S0140-6736(11)61629-2.
PMID: 22019144.
PMCID: PMC3254252.
36. Kiderlen M., Bastiaannet E., Walsh P.M. et al. Surgical treatment of early stage breast cancer in elderly: an international comparison. *Breast Cancer Res Treat* 2012;132(2):675–82.
DOI: 10.1007/s10549-011-1892-5.
PMID: 22119939.
PMCID: PMC3303082.
37. Kiderlen M., Walsh P.M., Bastiaannet E. et al. Treatment strategies and survival of older breast cancer patients – an international comparison between the Netherlands and Ireland. *PLoS One* 2015;10(2):e0118074.
DOI: 10.1371/journal.pone.0118074.
PMID: 25646756.
PMCID: PMC4315587.
38. Cohen R.J., Li L., Citron W. et al. Improved survival with adjuvant radiation in elderly women with early-stage breast cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;84(Suppl):33–4.
39. Korah M.P., Sener S.F., Tripathy D. Implications of Omitting Radiation After Breast Conserving Surgery in Elderly Women With Low-risk Invasive Breast Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2017;3(84):34.
40. Kunkler I.H., Williams L.J., Jack W.J. et al. Breast-conserving surgery with or without irradiation in women aged 65 years or older with early breast cancer (PRIME II): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2017;16(3):266–73.
DOI: 10.1016/S1470–2045(14)71221–5.
PMID: 25637340.
41. Hughes K.S., Schnaper L.A., Bellon J.R. et al. Lumpectomy plus tamoxifen with or without irradiation in women age 70 years or older with early breast cancer: Long-Term Follow-Up of CALGB 9343. *J Clin Oncol* 2013;31(19):2382–7.
DOI: 10.1200/JCO.2012.45.2615.
PMID: 23690420. PMCID: PMC3691356.
42. Giuliano A.E., Hunt K.K., Ballman K.V. et al. Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2011;305(6):569–75.
DOI: 10.1001/jama.2011.90.
PMID: 21304082.
PMCID: PMC5389857.
43. Smith B.D., Bentzen S.M., Correa C.R. et al. Fractionation for whole breast irradiation: an American Society for Radiation Oncology (ASTRO) evidence-based guideline. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81(1):59–68.
DOI: 10.1016/j.ijrobp.2010.04.042.
PMID: 20638191.
44. Jagsi R., Griffith K.A., Boike T.P. et al. Differences in the Acute Toxic Effects of Breast Radiotherapy by Fractionation Schedule: Comparative Analysis of Physician-Assessed and Patient-Reported Outcomes in a Large Multicenter Cohort. *JAMA Oncol* 2015;1(7):918–30.
DOI: 10.1001/jamaoncol.2015.2590.
PMID: 26247417.
45. Coates A.S., Winer E.P., Goldhirsch A. et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol* 2015;26(8):1533–46.
DOI: 10.1093/annonc/mdv221.
PMID: 25939896. PMCID: PMC4511219.
46. Smith B.D., Arthur D.W., Buchholz T.A. et al. Accelerated partial breast irradiation consensus statement from the American Society for Radiation Oncology (ASTRO). *J Am Coll Surg* 2009;209(2):269–77.
DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2009.02.066.
PMID: 19632605.
47. Leonardi M.C., Maisonneuve P., Mastropasqua M.G. et al. How do the ASTRO consensus statement guidelines for the application of accelerated partial breast irradiation fit intraoperative radiotherapy? A retrospective analysis of patients treated at the European Institute of Oncology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83(3):806–13.
DOI: 10.1016/j.ijrobp.2011.08.014.
PMID: 22245196.
48. Olivetto I.A., Whelan T.J., Parpia S. et al. Interim cosmetic and toxicity results from RAPID: a randomized trial of accelerated partial breast irradiation using three-dimensional conformal external beam radiation therapy. *J Clin Oncol* 2013;32(31):4038–45.
DOI: 10.1200/JCO.2013.50.5511.
PMID: 23835717.
49. Najafipour F., Hamouzadeh P., Arabloo J. et al. Safety, effectiveness and economic evaluation of intra-operative radiation therapy: a systematic review. *Med J Islam Repub Iran* 2015;(29):258.
PMID: 26793649. PMCID: PMC4715414.
50. Zur M., Shai A., Leviov M. et al. Short-term complications of intra-operative radiotherapy for early breast cancer. *J Surg Oncol* 2016;113(4):370–3.
DOI: 10.1002/jso.24157.
PMID: 26751138.
51. Keshtgar M.R., Williams N.R., Bulsara M. et al. Objective assessment of cosmetic outcome after targeted intra-operative radiotherapy in breast cancer: results from a randomised controlled trial. *Breast Cancer Res Treat* 2013;140(3):519–25.
DOI: 10.1007/s10549-013-2641-8.
PMID: 23877341.
52. Fornage B.D., Sneige N., Ross M.I. et al. Small Small (≤ 2 -cm) breast cancer treated with US-guided radiofrequency ablation: feasibility study. *Radiology* 2004;231(1):215–24.
DOI: 10.1148/radiol.2311030651.
PMID: 14990810.
53. Chen J., Zhang C., Li F. et al. A meta-analysis of clinical trials assessing the effect of radiofrequency ablation for breast cancer. *Onco Targets Ther* 2016;9:1759–66.
DOI: 10.2147/OTT.S97828.
PMID: 27042126.
PMCID: PMC4809337.
54. Mauri G., Sconfienza L.M., Pescatori L.C. et al. Technical success, technique efficacy and complications of minimally-invasive imaging-guided percutaneous ablation procedures of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Eur Radiol* 2017;27(8):3199–210.
DOI: 10.1007/s00330-016-4668-9.
PMID: 28050693.
55. Peek M.C., Ahmed M., Napoli A. et al. Minimally invasive ablative techniques in the treatment of breast cancer: a systematic review. *Int J Hyperthermia* 2016;1–12 [Epub ahead of print].
DOI: 10.1080/02656736.2016.1230232.
PMID: 27575566.

ПРОИЗВОДНЫЕ ХИНАЗОЛИНОНА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕВЫХ, ПАРАЗИТАРНЫХ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Д.С. Хачатрян¹, В.А. Мисюрин², М.А. Барышникова^{1,2}, Н.В. Голубцова², А.В. Колотаев^{1,2}, К.Р. Матевосян³

¹Институт химических реактивов и особо чистых химических веществ (ФГУП ИРЕА);

Россия, 107076 Москва, Богородский Вал, 3;

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

³Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

Контакты: Дереник Саркисович Хачатрян derenik-s@yandex.ru

В обзоре охарактеризована биологическая активность ряда производных хиनाзолинона. В основном производные хиназолинона действуют таргетно, связываясь с некоторыми белками, важными для выживания, пролиферации и метастазирования опухолевой клетки. Имеются основания инициировать клинические испытания данных веществ для создания новых протоколов лечения широкого спектра онкологических, ряда паразитарных и некоторых нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: ингибирование сигнальных путей, блокирование репарации ДНК, производные хиназолинона

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-32-42

QUINAZOLINON DERIVATIVES FOR THE TREATMENT OF NEOPLASTIC, PARASITIC AND NEURODEGENERATIVE DISEASES

D.S. Khachatryan¹, V.A. Misyurin², M.A. Baryshnikova^{1,2}, N.V. Golubtsova², A.V. Kolotaev^{1,2}, K.R. Matevosyan³

¹Institute of Chemical Reagents and High Purity Chemical Substances (IREA); 3 Bogorodskii Val, Moscow 107076, Russia;

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

³Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, 9 Miusskaya ploshchad', Moscow, 125047, Russia

In this review we discuss some biological activities of quinazolinon derivatives. The derivatives of quinazolinon possess their activity by binding to some proteins important for the survival, proliferation and metastasis of tumor cells. There are grounds to initiate clinical trials of these substances to create new treatment protocols for a wide range of cancer diseases, several parasitic diseases, and certain neurodegenerative diseases.

Key words: inhibition of signaling pathways, blocking of DNA repair, quinazolinon derivatives

Введение

В настоящее время в практической медицине находят все больше подтверждений тому, что концепция «одна болезнь — одно лекарство» не всегда оправдывает себя. В человеческой популяции распространено множество генетических вариантов. Вследствие этого разнообразия лекарство, эффективность которого доказана на большой выборке больных, зачастую может не помочь отдельным индивидуумам. Отсюда возникает потребность в разработке множества отличных друг от друга препаратов, каждый из которых, тем не менее, подходит небольшой группе больных.

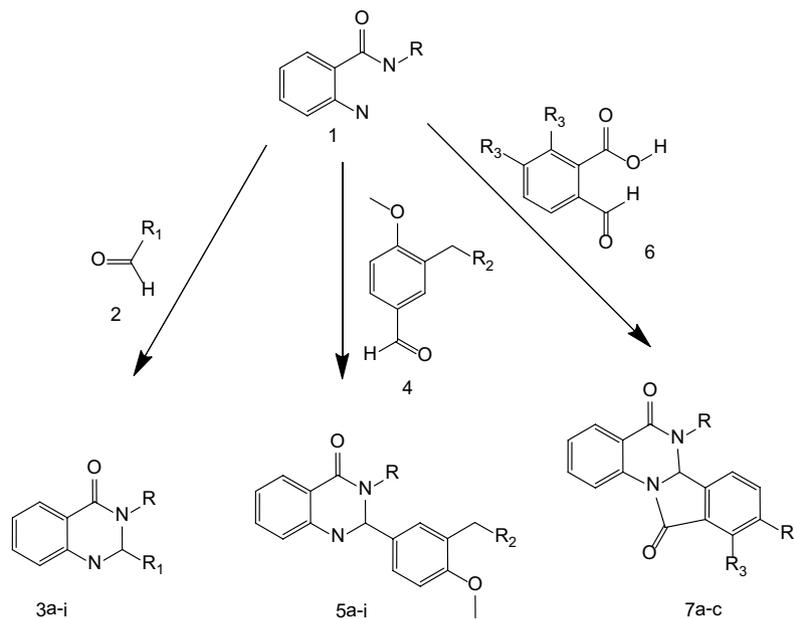
Одной из наиболее перспективных стратегий терапии онкологических, аутоиммунных и некоторых нейродегенеративных заболеваний является применение таргетных препаратов. Основа таргетной

терапии — наличие мишени в клеточном сигнальном пути, на которую можно воздействовать, применив вещество, обладающее высокой степенью сродства к этой мишени. Если данный сигнальный путь активен преимущественно в опухолевой клетке или в клетке, осуществляющей аутоиммунитет, прерывание этого пути может приводить к гибели клеточных популяций. Здоровые клетки останутся нетронутыми, и может наступить излечение.

Для расширения арсенала уже известных таргетных препаратов ежегодно в мире синтезируется и исследуется множество новых соединений. Среди них — хиназолинон и его производные. Известно, что производные хиназолинона обладают рядом значимых фармакологических эффектов. Исследователи рассматривают их как антибиотики [1], кардиостимуляторы [2], сосудорасширяющие соединения [3]

и анальгетики [4]. Кроме того, производные хиназолинона активно подавляют пролиферацию опухолевых клеток [5]. В ФГУП ИРЕА синтезировано 22 новых производных хиназолинона [6]. На рисунке представлены структурные формулы соединений, о которых будет идти речь в данном обзоре.

На интернет-ресурсе PubChem Project [7] приведены результаты исследований биологической активности производных хиназолинона. Активность представленных веществ была изучена методом HTS (High-throughput screening), или методом высокопроизводительного скрининга, который выполняется



3	a	b	c	d	e	f	g	h
R				n-Pr	n-Pr	3-Cl-Ph	4-Cl-Ph	Et ₂ N-(CH ₂) ₂
R1								
5	a	b	c	d	e	f	g	h
R	4-Cl-Ph			Bn	4-Me-Ph	4-Me-Ph		4-Me-Ph
R ²								

7	a	b	c	d	e	f
R	Ph	4-F-Ph	2-F-Ph	4-MeO-Ph	Bn	Ph
R ³	MeO	MeO	MeO	MeO	H	H

Схема синтеза и структурные формулы производных хиназолинона

на автоматизированной системе для тестирования различных эффектов. Современная автоматизированная система точно дозирует опытные вещества, осуществляет клеточные пассажи и проводит изменение скорости деления клеток, их морфологии, а также оценивает спектр секретируемых веществ. Метод HTS позволяет быстро обнаружить и подтвердить в независимых экспериментах основные эффекты, оказываемые тестируемым веществом на биохимические процессы в живых клетках [8]. Среди эффектов, встречающихся с наибольшей частотой, можно отметить такие, как изменение скорости роста клеток, а также увеличение доли погибших клеток в популяции. Метод позволяет выяснить, на какие сигнальные пути может быть оказано воздействие. Для этого используют клетки, рост которых зависит от 1 ключевого сигнального пути (например, NF-κB). В случае прекращения пролиферации или массовой гибели таких клеток под действием тестируемого вещества можно сделать вывод о том, что именно NF-κB-путь является мишенью для данного соединения. Для подтверждения эффекта вещество добавляется в культуральную среду с другими клетками, как зависимыми, так и не зависимыми от NF-κB-пути.

Кроме того, с помощью SAR-анализа (Structure-activity relationship) было проведено прогнозирование биологической активности производных хиназолинона, результаты которого имеются в открытом доступе на интернет-ресурсе PubChem Project [7]. SAR-анализ предназначен для выявления взаимосвязи химических и пространственных структур молекулы с ее биологической активностью. Анализ SAR позволяет определять химические группы, ответственные за различные биологические эффекты в организме [9]. Метод предусматривает модификацию молекулы путем введения в нее новых химических групп и сравнения эффектов, оказываемых новым веществом, с эффектами, характерными для исходного.

Представленные методы позволяют обнаружить потенциально полезные свойства новых молекул и определить возможные негативные последствия их использования в сфере лечения онкологических заболеваний. Согласно данным, представленным в PubChem Project [7], производные хиназолинона способны значимо воздействовать на множество молекулярных мишеней внутри клеток. На основе производных хиназолинона можно создавать новые лекарственные препараты, обладающие противоопухолевыми, противопаразитарными и иными свойствами.

В данном обзоре объединены результаты исследований производных хиназолинона (см. рисунок), проведенных с помощью методов HTS и SAR, выложенные в открытом доступе на интернет-ресурсе PubChem Project [7].

Противоопухолевые и возможные негативные эффекты

Соединение, представленное на рисунке под кодовым названием 7a, обладает способностью ингибировать ELG1-зависимую репарацию ДНК в клетке, что было показано на клетках линии эмбриональной почки человека HEK293T. Кроме того, данное вещество блокирует действие TDP1 (tyrosyl-DNA phosphodiesterase), ингибирует NF-κB-зависимый сигнальный путь, действие протеазы ATG4B, препятствует взаимодействию белков Mdm2 и MdmX, а также нарушает работу сигнальных молекул STAT1 и STAT3.

Как известно, белок ELG1 распознает поврежденные структуры ДНК во время S-фазы клеточного цикла [10]. TDP1 распознает и устраняет 1- и 2-цепочечные разрывы в ДНК [11], а присутствие соединения 7a внутри клетки может приводить к фрагментации генома. Ингибирование NF-κB-зависимого сигнального пути в случае доставки этого вещества в опухолевую клетку может приводить к снижению ее сопротивляемости индуцируемому апоптозу [12]. При подавлении протеазы ATG4B снижается способность опухолевой клетки к пролиферации и может запуститься процесс аутофагии, что облегчает течение заболевания [13]. Белки Mdm2 и MdmX, образуя друг с другом комплекс, препятствуют работе антионкогенного белка p53. Нарушив взаимодействие между Mdm2 и MdmX, можно восстановить функции p53 и стимулировать апоптотическую гибель трансформированной клетки [14]. STAT1 и STAT3 вместе с другими молекулами передают пролиферативный сигнал от тирозинкиназы Jak2. Оборвав сигнальный путь Jak2-STAT, можно воспрепятствовать делению клеток, зависящих от мутантной киназы Jak2. Это может быть полезным при терапии Jak2-V617F-положительных пациентов с острыми лейкозами и миелопролиферативными заболеваниями [15]. Была выявлена способность 7a ингибировать рост клеток рака легкого, однако механизм воздействия на клетки не описан.

Следует обратить внимание на возможные побочные эффекты применения 7a как лекарственного агента, в частности кардио- и нейротоксичность. Так, он повреждает клетки линии кардиомиоцитов HL-1. Кроме того, данное производное блокирует работу белка SLC5A7, который представляет собой мембранный переносчик молекул холина для синтеза ацетилхолина в нейронах. Дисфункция холинергической сигнализации нейронов может быть причиной различных расстройств, таких как депрессия, дефицит внимания, шизофрения [16]. Он может выступать в роли антагониста человеческого мускаринового рецептора CHRМ1, в результате чего могут наблюдаться такие же эффекты, как при блокировании SLC5A7 [17]. Наконец, соединение 7a взаимодействует с NPY-Y2,

рецептором нейропептида Y. Этому рецептору приписывается важное значение в процессах формирования памяти человека [18].

Соединение, представленное на рисунке под названием 7с, является ингибитором фактора NIF-1, ответственного за выживание клетки в условиях недостаточного снабжения кислородом, затрудняет работу TDP1, ингибирует транскрипционный фактор NIVEP3, внутриклеточные адаптерные белки NF-κB, STAT1 и STAT3 и ядерный рецептор LRH-1. Подобно соединению 7а, 7с нарушает взаимодействие белков Mdm2 и MdmX. Ингибируя TDP1, затрудняет возможности опухолевой клетки по репарации ДНК.

Фактор NIVEP3 управляет программой выживания клетки. В частности, NIVEP3 стимулирует активность NF-κB и его посредников [19]. Поскольку и NIVEP3, и NF-κB могут быть мишенью для соединения 7с, опухолевая клетка становится менее жизнеспособной. Эффекты, оказываемые им на Jak2-STAT-сигнальный путь, могут быть такими же, как и эффекты соединения 7а. О белке LRH-1 известно, что его ингибирование в линиях клеток колоректального рака замедляет их пролиферацию [20]. Таким образом, можно проверить эффективность терапевтического эффекта 7с при лечении колоректального рака. Кроме того, оно замедляет рост культуры клеток рака легкого H69AR и культуры клеток нейробластомы. Следует обратить внимание на его возможную нейротоксичность. Так, соединение 7с блокирует ацетилхолиновый рецептор M1, а также рецептор TAAR1, ответственный за нормальное функционирование клеток нервной системы [21].

Вещество 5g, структурная формула которого представлена на рисунке, также продемонстрировало различные биологические эффекты. Положительные эффекты при использовании данного вещества как лекарства могут быть достигнуты за счет того, что оно способствует гетеродимеризации опиоидных рецепторов OPRM1 и OPRD1, ингибирует действие TPD1, HSD17B4 и KDM4A и активирует ClpP. OPRM1 и OPRD1 – мембранные опиоидные рецепторы нервной системы, их функция заключается в регулировании болевых ощущений. При связывании опиоидных лигандов белки OPRM1 и OPRD1 гетеродимеризуются и проводят сигнал внутрь нервной клетки. В результате способность чувствовать боль снижается. Агонисты OPRM1 и OPRD1 разрабатываются как вспомогательные вещества при купировании болевого синдрома опиатами, позволяющие назначать существенно меньшие их дозы [22]. Не исключено, что вещество 5g можно будет применять подобным образом. Белок HSD17B4 участвует в окислении жирных кислот и в синтезе 3-кетоацил-CoA [23]. При условии активного метаболизма в опухолевых клетках соединение 5g вызовет их гибель. Белок KDM4A

деметирует гистоновые белки, за счет чего функционирует как активатор экспрессии генов, ответственных за дифференцировку клеток [24]. Он рассматривается как перспективная мишень для противоопухолевой таргетной терапии.

Ген *CLPP* кодирует белок, закрепленный в мембране митохондрии. Данный белок образует комплекс из 2 гептамерных колец с каналом, пронизывающим насквозь оба кольца [25]. Такая структура повышает проницаемость мембраны митохондрии и способствует выходу в цитоплазму цитохрома C. При гиперпродукции CLpP можно индуцировать начало апоптоза по митохондриальному пути, что существенно увеличит вероятность гибели клетки. Следует оценить отдельно чувствительность клеток различных типов к апоптозу, вызванному гиперэкспрессией CLpP. Соединение 5g активирует кальций-проницаемый канал TRPC4, работа которого усиливает процессы аутофагии, высвобождение нейротрансмиттеров и пролиферацию клеток [26]. Трудно предположить, будет ли полезной данная его способность при лечении онкологических заболеваний, возможны негативные эффекты при использовании соединения 5g. Так, данное вещество активирует работу TSHR, рецептора, стимулирующего рост клеток щитовидной железы [27]. При нарушении ферментативной активности липоксигеназы 15-hLO будет затруднен липидный обмен во всех клетках организма [28].

Вещество, представленное на рисунке как 3g, обладает широким спектром свойств, значимых при планировании новых протоколов для противоопухолевой терапии. Оно блокирует функции miR-21 и активирует экспрессию генов *BRCA1*, *CLPP*, *AHR*, *STAT1*, *SMARCA2*, *KLK7*. Согласно современным представлениям микроРНК miR-21 гиперэкспрессирована в опухолевых клетках многих гистологических типов, она снижает интенсивность реакций воспаления и помогает трансформированным клеткам пережить иммунный ответ [29]. Ген *BRCA1* функционирует как важный онкосупрессор. Белок BRCA1 вместе с другими белками формирует комплекс, проверяющий клеточный геном на наличие повреждений, и осуществляющий репарацию ДНК. Мутации кодирующего его гена связаны с развитием ~ 40 % спонтанных случаев рака молочной железы и ~ 80 % наследуемых случаев рака молочной железы и яичников [30]. В случае если в данном гене нет мутаций, реактивация его экспрессии позволит восстановить некоторые нормальные клеточные функции и может способствовать апоптотической гибели трансформированной клетки [31]. При активации экспрессии гена *AHR* в клетке нарабатывается одноименный белок. *AHR* – транскрипционный фактор, который связывается с молекулой ксенобиотика, в том числе лекарственного вещества, транспортируется в ядро

и запускает программу по обезвреживанию и метаболизму ксенобиотиков [32]. Данная система защищает клетку от отравления, но можно создать вещества-пролекарства, которые нейтральны по отношению к клеткам человека при введении, и становятся ядами при их активации во время метаболизма. Таким образом, вещество 3g может способствовать внутриклеточной активации дополнительного пролекарства.

В отличие от вещества 7с, которое ингибирует сигнальную молекулу *STAT1*, соединение 3g ее активирует. С одной стороны, можно ожидать усиления проведения сигнала от киназы *Jak2*, что является стимулом к выживанию клетки, особенно в случае онкогематологических заболеваний. С другой стороны, известно об онкосупрессорных свойствах *STAT1* при плоскоклеточном раке пищевода [33]. Вполне возможно, что 3g окажется эффективным терапевтическим средством при данном заболевании.

Ген *SMARCA2*, экспрессия которого повышается в присутствии 3g, управляет состоянием хроматина. Вместе с другими белками *SMARCA2* входит в состав комплекса *SWI/SNF*, который ослабляет связи между нуклеосомами и ДНК. Активность комплекса конвертирует неактивный гетерохроматин в активный эухроматин. Дефицит или отсутствие белка *SMARCA2* приводит к развитию палочковидной саркомы у детей [34]. Возможно, повышение уровня экспрессии гена *SMARCA2* при помощи 3g позволит предотвратить развитие данного заболевания. Показано также, что 3g блокирует функции транскрипционного фактора *DAX1*. Сам *DAX1* подавляет экспрессию других генов. При раке молочной железы активность этого фактора снижает чувствительность опухолевых клеток к эстрогену, что негативно сказывается на их росте [35]. Кроме того, гиперэкспрессия *DAX1* в клетках линии рака печени приводила к остановке их развития [36]. Таким образом, подавление *DAX1* может стимулировать рост опухолевых клеток. Применение 3g в качестве лекарства допустимо только в тех случаях, когда клетки опухоли нечувствительны к активности *DAX1*. Вместе с этим негативные последствия использования 3g могут проявиться за счет того, что данное соединение активирует экспрессию белка *KLK7*. Сериновая протеаза *KLK7* является биомаркером опухолевых клеток. Белок осуществляет протеолиз межклеточного матрикса, что способствует опухолевой инвазии и метастазированию [37]. Повышенный уровень экспрессии гена *KLK7* связан с неблагоприятным прогнозом при колоректальном раке и раке поджелудочной железы [38, 39], нужно учитывать эту особенность при планировании клинических исследований.

Подобно 3g, соединение 5a ингибирует *miR-21*, *DAX1*, активирует экспрессию белка *AHR* и белок *STAT1*.

Соединение 5a также ингибирует *KCNK9*, что может быть полезным при лечении онкологических заболеваний.

АТФ-зависимый калиевый канал *KCNK9* по неизвестным причинам гиперэкспрессирован при некоторых типах рака. При раке яичников его активность связана с повышенной выживаемостью опухолевых клеток [40]. Ингибирование проводимости этого канала снижает пролиферативную активность клеток рака яичников и стимулирует апоптоз. Одновременно с этим соединение 5a может проявлять нейротоксичность. Найдено блокирование функций рецептора *GALR3*, который связывается с нейропептидом галанином. Галанин модулирует разнообразные процессы, такие как память, обработка сенсорной информации, боль, секреция гормонов и пищевое поведение [41]. Кроме того, 5a блокирует работу дофаминовых рецепторов, что может привести к описанным выше эффектам.

Хиназолинон 3с ингибирует белок *L3MBTL1*, ДНК-полимеразу- β , эндонуклеазу *APE1*, фермент *HSD17B4* и митохондриальный канал *CLpP*.

Рецептор *L3MBTL1* активирует экспрессию генов, ответственных за осуществление митоза [42]. Блокировка его работы позволит снизить пролиферативный потенциал опухолевых клеток. Функции ДНК-полимеразы- β заключаются в репарации ДНК и, возможно, репликации и рекомбинации [43]. В условиях применения препаратов, повреждающих ДНК, опухолевая клетка не сможет провести репарацию, и вероятность ее апоптотической гибели увеличится. Фермент *APE1* – важная эндонуклеаза, которая активна практически во всех клетках человека. Она предназначена для распознавания и репарации поврежденных апуриновых/апириимидиновых сайтов ДНК, образованных в результате гидролиза нормальных оснований [44]. Такие сайты препятствуют репликации ДНК, что делает невозможным митотическое деление клетки.

Хиназолинон 3с является антагонистом дофаминового рецептора [3], что может стать причиной нейротоксичности препарата, разработанного на основе данного соединения. Он также активирует сериновую протеазу *KLK7* и может способствовать формированию локомоторного фенотипа опухолевых клеток.

Вещество 3e тоже обладает противоопухолевой активностью, так как ингибирует взаимодействие белков *Mdm2* и *MdmX*. Оно модулирует работу дофаминового рецептора 1, однако трудно предсказать последствия применения этого препарата при лечении больных. Кроме того, хиназолинон 3e повышает активность протеазы *KLK7*.

Соединение 5b ингибирует альдегиддегидрогеназу *ALDH1A1*, работу калиевого канала *KCNK9* и кальциевого канала *CACNA1G*, одновременно активирует *ClpP*.

Клетки, экспрессирующие ALDH1A1, обладают высокой онкогенностью из-за высокой химической активности как самих альдегидов, так и продуктов их метаболизма. Сайленсинг ALDH1A1 в ксенотрансплантатных меланомах приводил к снижению темпов роста опухоли и снижал количество метастазов. Предполагается, что ингибиторы ALDH1A1 будут замедлять рост опухолевой массы в первичном очаге меланомы человека и понижать риск развития рецидива [45]. Кальциевый канал SACNA1G гиперэкспрессирован при некоторых типах рака, в частности при раке яичников. Имеются данные, что блокирование SACNA1G подавляет пролиферацию опухолевых клеток и вводит их в состояние покоя [46]. Таким образом, можно рекомендовать провести клинические испытания эффективности лечения рака яичников при помощи соединения 5b. Предполагаемые побочные эффекты – нейротоксичность. Хиназолинон 5b может нарушать работу нервной системы, так как ингибирует функции нейропептида Y2. Кроме того, он функционирует как агонист опиоидных рецепторов OPRM1 и OPRD1, а также нейропептидного рецептора GPR7, который поддерживает стабильность работы нервной системы человека [47].

Вещество 3f ингибирует *miR-21*, что позволяет ожидать снижения выживаемости опухолевых клеток в условиях иммунного ответа. Оно также блокирует работу калиевых каналов KCNK9 и KCNK3. Подобно 5b хиназолинон 3f может быть эффективным при лечении рака яичников. Активирует ClpP, а также экспрессию гена *SMARCA4*. Фактор *SMARCA4*, подобно *SMARCA2*, входит в состав комплекса SWI/SNF, который предназначен для декомпактизации хроматина и активации экспрессии генов. Корректная работа SWI/SNF в целом и *SMARCA4* в частности важна для контроля стабильности ДНК и клеточной дифференцировки, а также ограничивает скорость деления клетки и активность некоторых онкогенов [48].

Вещество 5c ингибирует белок NF-κB и зависимый от него сигнальный путь, перекрывает кальциевый канал SACNA1G. Он, активируя *ClpP*, способен повышать проницаемость митохондриальной мембраны и облегчать инициацию внутреннего пути апоптоза. Вещество с такими характеристиками может обладать мощным противоопухолевым действием. При этом хиназолинон 5c является агонистом нейропептидного рецептора GPR7 и может оказать непредсказуемый эффект на нервную систему больного.

Из значимых противоопухолевых эффектов соединения 5d обнаружены ингибирование калиевых каналов KCNK9 и KCNK3 и активация митохондриального канала ClpP. Применяя 5d, можно добиться инициации апоптоза опухолевой клетки. Кроме того, соединение 5d блокирует нейропептидный рецептор NPSR1. Лиганд NPSR1 – нейропептид S. Данный

лиганд усиливает пролиферацию NPSR1-положительных опухолевых клеток нейроэндокринных опухолей [49]. Нарушив стимулирующее воздействие нейропептида S, можно остановить рост опухолевой массы при злокачественных глиомах.

Хиназолинон 5d может оказать губительное влияние на нервную систему, так как ограничивает функции нейропептида Y1 и нейропептидного рецептора GPR7.

Вещество 5e ингибирует *miR-21*, калиевый канал KCNK3 и активирует ClpP, что может понизить злокачественность опухолевых клеток, а также индуцировать в них апоптоз. Оно активирует нейронный рецептор MrgX1, стимуляция которого вызывает чувство боли [50]. Прогнозируемый побочный эффект – развитие острого болевого синдрома.

Хиназолинон 7b ингибирует образование комплекса Mdm2/MdmX, что стимулирует работу антионкогенного белка p53. Он также затрудняет процессы репарации ДНК, опосредованные фактором ELG1 и TDP1. Противоопухолевый эффект данного соединения был продемонстрирован в эксперименте по ограничению роста клеток рака легкого линии H69AR. Хиназолинон 7b потенциально нейротоксичен, так как воздействует на мускариновый рецептор 1, дофаминовый рецептор 2, нейропептид Y1 и рецептор TAAR1.

Вещество 5f ингибирует альдегиддегидрогеназу ALDH1A1, что может снизить скорость роста злокачественности опухолевых клеток. Соединение 5f способно блокировать калиевый канал KCNK3, что также снижает пролиферативную активность клеток опухоли. Наконец, оно стимулирует работу комплекса SWI/SNF, который замедляет процессы деления и препятствует работе онкобелков. Возможна нейротоксичность 5f за счет ингибирования нейропептида Y2.

Вещество 3h при инкубировании с клетками карциномы печени линии Huh7 вызывает их гибель по неизвестному пока механизму. Выяснилось также, что 3h блокирует проводимость кальциевых каналов TRPC4 и TRPC6. Блокирование их существенно замедляет клеточную пролиферацию, а гиперэкспрессия этих белков прямо коррелирует со скоростью роста опухолевых клеток линии [51]. Он ингибирует фермент LYPLA2, расщепляющий фосфолипиды и ремоделирующий клеточные мембраны, и сериновую протеазу KLK7, которая способствует опухолевой инвазии и метастазированию [52]. Последствия бывают различными, и предсказать их трудно.

Вещество 5h способно стимулировать начало внутреннего пути апоптоза, так как активирует ClpP. Оно также способствует усилению работы комплекса SWI/SNF, обладающего противоопухолевым потенциалом. Однако 5h активирует STAT1 и тем самым

может увеличить автономность опухолевой клетки и придать ей независимость от внешних сигналов к выживанию. Кроме того, данное соединение ингибирует противоопухолевый фактор DAX1, и это может ограничить спектр его применения DAX1-негативными злокачественными новообразованиями.

Хиназолинон 3a затрудняет репарацию ДНК во всех быстроделющихся клетках посредством ингибирования TDP1, осуществляющего контроль стабильности генома. Может стимулировать апоптотическую гибель клетки, так как повышает проницаемость митохондриального канала ClpP. Возможное негативное последствие применения хиназолинона 3a – вызванная им индукция инвазии и метастазирования опухоли, так как обнаружена способность данного соединения активировать протеазу KLK7.

Вещество 3d ингибирует серин-треониновую киназу PLK1-PDB. Эта киназа экспрессируется на высоком уровне при многих онкологических заболеваниях. Инактивация этого белка в опухолевых клеточных линиях значительно замедляла пролиферацию и стимулировала апоптотическую гибель [53]. Под действием соединения 3d снижается активность фактора ERAC2, который участвует в процессах клеточной пролиферации, транспорта микровезикул и ядерного транспорта [54]. Снижение скорости метаболизма опухолевой клетки и скорости ее деления при применении вещества 3d может оказать позитивное влияние на прогноз онкологического заболевания. Соединение 3d усиливает воздействие гормона TRH на щитовидную железу. Кроме того, TRH может оказать более выраженный эффект на иммунную систему, в частности усилить воспалительные процессы. Повышение активности этого гормона связывают с улучшением качества жизни и нормализацией сна [55].

Вещество 3b ингибирует HSD17B4 и может снизить скорость метаболизма в опухолевой клетке. Однако этот полезный эффект уравновешивается способностью вещества активировать протеазу KLK7, из-за чего опухоль может сформировать метастазы в организме больного.

Производное 7d повреждает клетки-кардиомиоциты линии HL-1. Других значимых эффектов обнаружено не было.

Производное под номером 7f блокирует белки TDP1 и ELG1, и это увеличивает геномную нестабильность в опухолевой клетке, что может привести к ее гибели из-за фатальных нарушений транскрипции генов. Кроме того, тетрацикл 7f может понижать интенсивность пролиферации опухолевых клеток посредством подавления функций протеазы ATG4B. Смесь тетрацикла 7f со своим стереоизомером токсична для кардиомиоцитов.

Соединение 7e способно ингибировать сигнальную протеинкиназу MEK5. Эта протеинкиназа

передает активирующий сигнал к киназе MAPK-14, гиперактивность которой, в свою очередь, приводит к трансформации нормальной клетки в опухолевую [56]. Блокирование работы MEK5 облегчает инициацию апоптоза в опухолевой клетке.

Таким образом, описанные хиназолиноны обладают противоопухолевой активностью, так как ингибируют действие систем репарации ДНК и пролиферативную активность. Данные вещества можно применять при лечении широкого спектра онкологических и онкогематологических заболеваний. Чтобы установить точнее, какие типы данных заболеваний окажутся наиболее чувствительными, требуется провести клинические испытания. Необходимо учитывать токсичность представленных соединений для здоровых клеток и провести оптимизацию доз препаратов.

Возможность применения при неопухолевых заболеваниях и борьбе с паразитами

Некоторые из представленных веществ обладают и другим действием, которое может стать полезным в терапии неопухолевых заболеваний.

Соединения 3g, 3f, 5a, 5f, 5h стимулируют экспрессию гена *Rab9*. Ген *Rab9* кодирует белок, отвечающий за везикулярный транспорт от эндосом в аппарат Гольджи [57]. Можно предположить, что активность этого белка увеличивает скорость распространения низкомолекулярных веществ, в том числе и лекарств, внутри клетки. Это способно повысить чувствительность опухолевых клеток к терапии. Хиназолиноны 3g, 5a, 5f и 5h повышают уровень экспрессии гена *NPC1*, который закреплен в мембранах эндосом и экзосом, и опосредует внутриклеточный транспорт холестерина и липопротеинов. Дефекты в этом гене способствуют развитию нейродегенеративных заболеваний – болезни Ниманна–Пика и, возможно, Альцгеймера [58]. Данное заболевание плохо поддается терапии из-за недоступности нервных клеток, защищенных гематоэнцефалическим барьером. Низкомолекулярные соединения имеют шанс преодолеть барьер, купировать последствия недостаточной активности белка NPC1 и остановить гибель клеток.

Хиназолиноны 3g, 5f и 5h формируют различные варианты сплайсинга мРНК гена *SMN2*. Ген *SMN2* кодирует белок, важный для стабильности моторных нейронов. Нарушения сплайсинга его мРНК приводят к синтезу нефункционального белка [59]. В результате развивается мышечная атрофия, что фатально заканчивается для больного. Коррекция процессов сплайсинга может восстановить нормальные функции моторных нейронов. Тетрацикл 7f разрушает белок TDP-43. Известно, что этот белок образует агрегаты в цитоплазме нейронов и является одной

из причин развития бокового амитрофического склероза — неизлечимого нейродегенеративного заболевания [60]. При устранении его агрегатов возможно замедление нейродегенеративных процессов и улучшение состояния больного.

Соединение 7e активирует белок-транспортер холина СНТ. Потенциально это может стимулировать работу нервной системы [61].

Некоторые из синтезированных нами соединений (3g, 5a, 3e, 5b, 3f, 5e, 5f, 5h) блокируют *Shiga toxin*. Группа этих токсинов продуцируется патогеном *Shigella dysenteriae*, вызывающим дизентерию [62]. Сами токсины связываются с рибосомами и останавливают синтез белка. Представленные соединения инактивируют токсины и могут облегчать течение дизентерии.

Соединения 7a, 7c, 5g, 3e, 5b, 5d, 5e, 3h, 5h, 3a и 3d инактивируют органоид *Apicoplast*, который жизненно важен для малярийного плазмодия, нарушения в его функциях могут привести к гибели плазмодия.

Вещества 5a, 5d и 3h токсичны для *Leishmania major*, вызывающего лейшманиозы. Механизм токсичности не был описан.

Соединения 3a, 3g, 3c, 3e, 3f, 3h, 5h и 3b ядовиты по отношению к *Mycobacterium tuberculosis*, так как ингибируют фермент FBA, или альдолазу. Альдолаза отвечает за превращение фруктозо-1,6-дифосфата в дигидроксиацетонфосфат и глицеральдегид-3-фосфат в процессе гликолиза [63].

Заключение

Согласно Е.Б. Владимирской, каждая клетка человека непрерывно получает сигналы, стимулирующие как инициацию апоптотической гибели, так и сопротивление развитию апоптоза [64, 65]. В норме влияние инактивирующих апоптоз сигналов обычно сильнее, и клетка не погибает. В случае если здоровую клетку требуется устранить, она получает усиленный сигнал, активирующий апоптоз. Это иллюстрируется примером созревания В-лимфоцитов, распознающих антиген [66]. Изначально противостояние апоптозу поддерживается во всех В-лимфоцитах как клетками микроокружения, так и внутриклеточными факторами MCL1 и BCL-2. В момент контакта с антигеном белок BCL-2 перестает экспрессироваться, а В-клетка получает про-апоптотический сигнал от FAS-лиганда, находящегося на поверхности фолликулярных дендритных клеток [67]. В-лимфоцит выживает только в случае эффективного распознавания антигена, когда одновременно с сигналом от FAS-лиганда получает сигнал противодействия апоптозу от собственной мембранной молекулы иммуноглобулина. В этом случае FAS-лиганд не способен активировать апоптоз [68]. Если распознавание антигена произошло неэффек-

тивно, В-лимфоцит не получает сигналов противодействия апоптозу и погибает, так как апоптоз стимулирован FAS-лигандом.

Распределение силы сигналов, регулирующих апоптоз, необходимо для своевременного устранения трансформированных клеток. Отклонения в работе систем контроля клеточной гибели могут привести к развитию опухолевых заболеваний, так же как в случае с В-клетками неконтролируемая экспрессия BCL-2 становится причиной развития злокачественных лимфом [66, 69].

Во многих случаях производные хиназолинона действуют как фактор, облегчающий начало апоптоза в опухолевой клетке. Особенно часто эти производные ингибируют антиапоптотический NF-κB-зависимый сигнальный путь, препятствуют образованию комплексов Mdm2/MdmX, инактивирующих белок p53, повышают уровень экспрессии белка CLpP, который увеличивает вероятность инициации внутреннего пути апоптоза.

Кроме того, производные хиназолинов воздействуют на белки, ответственные за репарацию ДНК, или изменяют проницаемость внешней мембраны для ионов, или блокируют некоторые сигнальные молекулы. Непосредственно с развитием апоптоза это не связано, однако снижает способность опухолевой клетки к инвазии и пролиферации.

Особенно важно то, что производные хиназолинона действуют таргетно на отдельно взятые белки или другие важные молекулы, и эффекты применения производных можно предсказать заранее. При использовании производных хиназолинона можно выбрать опухолевые заболевания, в патогенезе которых оказываются значимыми ферменты или сигнальные молекулы, сами являющиеся удобной мишенью для 7a и других соединений.

Действие доксорубина, например, приводит к образованию свободных радикалов, которые разрушают структуры не только опухолевых, но и всех клеток без исключения, а также являются мутагенами [70]. Напротив, производные хиназолинона не формируют свободные радикалы.

Кроме противоопухолевых эффектов, ряд соединений обладают способностью замедлить или даже полностью обратить развитие нейродегенеративных заболеваний, а также отличаются противопаразитарным эффектом. Необходимо проводить клинические исследования их эффективности при лечении таких заболеваний, как болезнь Неманна—Пика, Альцгеймера, а также мышечная атрофия, малярия, туберкулез, лейшманиоз и дизентерия.

Благодаря возможностям высокопроизводительного скрининга выяснены основные молекулярные мишени, на которые действуют различные производные хиназолинона. Остались неизвестными константы

связывания производных с белками-мишенями, но это относительно нетрудно сделать в бесклеточных системах. Кроме того, следует провести определение летальных доз для каждого из соединений. Дополни-

тельные исследования в таком формате в случае нахождения безопасной дозы для человека, но фармакологически эффективной, необходимы для инициации полноценных клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Alaimo R.J., Russell H.E. Antibacterial 2,3-dihydro-2-(5-nitro-2-thienyl) – quinazolin-4(1H) – ones. *J Med Chem* 1972;15(3):335–6. PMID: 4621761.
- Bonola G., Da Re P., Magistretti M.J. et al. 1-aminoacyl-2,3-dihydro-4(1H) – quinazolinone derivatives with choleric and antifibrillatory activity. *J Med Chem* 1968;11(6):1136–9. PMID: 5680025.
- Levin J.I., Chan P.S., Bailey T. et al. The synthesis of 2,3-dihydro-4(1H) – quinazolinone angiotensin II receptor antagonists *Bioorg. Med Chem Lett* 1994;4:1141–6.
- Okumura K., Oine T., Yamada Y. et al. 4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolines. I. Syntheses and pharmacological properties of 2-methyl-3-aryl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroquinazolines and their 1-acyl derivatives. *J Med Chem* 1968;11(2):348–52. PMID: 4385706.
- Neil G.L., Li L.H., Buskirk H.N., Moxley T.E. Antitumor effects of the antispermatogenic agent, 2,3-dihydro-2-(1-naphthyl) – 4(1H) – quinazolinone(NSC-145669). *Cancer Chemother Rep* 1972;56(2):163–73. PMID: 5043224.
- Хачатрян Д.С., Белусь С.К., Мисюрин В.А. Синтез и свойства 1,2-дигидро-4(3H)-хиназолинонов. *Известия РАН. Серия химическая* 2017;6:1044.
- PubChem Project <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Alexandrov V., Brunner D., Hanania T., Leahy E. High-throughput analysis of behavior for drug discovery. *Eur J Pharmacol* 2015;750:82–9. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.11.047. PMID: 25592319.
- Baker J.R., Gamberger D., Mihelcic J.R., Sabljic A. Evaluation of artificial intelligence based models for chemical biodegradability prediction. *Molecules* 2004;9(12):989–1004. PMID: 18007499.
- Sikdar N., Banerjee S., Lee K.Y. et al. DNA damage responses by human ELG1 in S phase are important to maintain genomic integrity. *Cell Cycle* 2009;8(19):3199–207. DOI: 10.4161/cc.8.19.9752. PMID: 19755857.
- Heo J., Li J., Summerlin M. et al. TDP1 promotes assembly of non-homologous end joining protein complexes on DNA. *DNA Repair(Amst)*2015;30:28–37. DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.03.003. PMID: 25841101.
- Клаан Н.К., Пронина Т.А., Акиншина Л.П., Решетникова В.В. Ядерный фактор каппа В (NF-κB) в качестве мишени для действия природных противоопухолевых соединений. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):3–8.
- Liu P.F., Leung C.M., Chang Y.H. et al. ATG4B promotes colorectal cancer growth independent of autophagic flux. *Autophagy* 2014;10(8):1454–65. DOI: 10.4161/auto.29556. PMID: 24991826.
- Qin L., Yang F., Zhou C. et al. Efficient reactivation of p53 in cancer cells by a dual MdmX/Mdm2 inhibitor. *J Am Chem Soc* 2014;136(52):18023–33. DOI: 10.1021/ja509223m. PMID: 25453499.
- Мисюрин А.В. Молекулярный патогенез миелопролиферативных заболеваний. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2009;2(3):211.
- Barwick K.E., Wright J., Al-Turki S. et al. Defective presynaptic choline transport underlies hereditary motor neuropathy. *Am J Hum Genet* 2012;91(6):1103–7. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.09.019. PMID: 23141292.
- Abdul-Ridha A., Lane J.R., Mistry S.N. et al. Mechanistic insights into allosteric structure-function relationships at the M1 muscarinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 2014;289(48):33701–11. DOI: 10.1074/jbc.M114.604967. PMID: 25326383.
- Arning L., Stock A.K., Kloster E. et al. NPY2-receptor variation modulates iconic memory processes. *Eur Neuropsychopharmacol* 2014;24(8):1298–302. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2014.03.003. PMID: 24709141.
- Rustgi A.K., Van't Veer L.J., Bernards R. Two genes encode factors with NF-κappa B- and H2TF1-like DNA-binding properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(22):8707–10. PMID: 2247438.
- Bayrer J.R., Mukkamala S., Sablin E.P. et al. Silencing LRH-1 in colon cancer cell lines impairs proliferation and alters gene expression programs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(8):2467–72. DOI: 10.1073/pnas.1500978112. PMID: 25675535.
- Cichero E., Espinoza S., Gainetdinov R.R. et al. Insights into the structure and pharmacology of the human trace amine-associated receptor 1(hTAAR1): homology modelling and docking studies. *Chem Biol Drug Des* 2013;81(4):509–16. DOI: 10.1111/cbdd.12018. PMID: 22883051.
- Gelernter J., Gueorguieva R., Kranzler H.R. et al. Opioid receptor gene(OPRM1, OPRK1, and OPRD1) variants and response to naltrexone treatment for alcohol dependence: results from the VA Cooperative Study. *Alcohol Clin Exp Res* 2007;31(4):555–63. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2007.00339.x. PMID: 17374034.
- McMillan H. J., Worthylake T., Schwartzentruber J. et al. Specific combination of compound heterozygous mutations in 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 4(HSD17B4) defines a new subtype of D-bifunctional protein deficiency. *Orphanet J Rare Dis* 2012;7:90. DOI: 10.1186/1750-1172-7-90. PMID: 23181892.
- Guerra-Calderas L., González-Barrios R., Herrera LA. et al. The role of the histone demethylase KDM4A in cancer. *Cancer Genet* 2015;208(5):215–24. DOI: 10.1016/j.cancergen.2014.11.001. PMID: 25633974.
- Kang S.G., Maurizi M.R., Thompson M. et al. Crystallography and mutagenesis point to an essential role for the N-terminus of human mitochondrial ClpP. *J Struct Biol* 2004;148(3):338–52. DOI: 10.1016/j.jsb.2004.07.004. PMID: 15522782.
- Zhang L., Dai F., Cui L. et al. Novel role for TRPC4 in regulation of macroautophagy by a small molecule in vascular endothelial cells. *Biochim*

- Biophys Acta 2015;1853(2):377–87. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2014.10.030. PMID: 25476892.
27. Aliyev A., Soundararajan S., Bucak E. et al. The utility of peripheral thyrotropin receptor mRNA in the management of differentiated thyroid cancer. *Surgery* 2015;158(4):1089–93; discussion 1093–4. DOI: 10.1016/j.surg.2015.06.023. PMID: 26212344.
 28. Horn T., Ivanov I., Di Venere A. et al. Molecular basis for the catalytic inactivity of a naturally occurring near-null variant of human ALOX15. *Biochim Biophys Acta* 2013;1831(12):1702–13. DOI: 10.1016/j.bbali.2013.08.004. PMID: 23958500.
 29. Sheedy F.J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Front Immunol.* 2015;6:19. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00019. eCollection 2015. PMID: 25688245.
 30. Jiang Q., Greenberg R.A. Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network. *J Biol Chem* 2015;290(29):17724–32. DOI: 10.1074/jbc.R115.667931. PMID: 26048987.
 31. Thangaraju M., Kaufmann S.H., Couch F.J. BRCA1 facilitates stress-induced apoptosis in breast and ovarian cancer cell lines. *J Biol Chem* 2000;275(43):33487–96. DOI: 10.1074/jbc.M005824200. PMID: 10938285.
 32. Esser C., Rannug A. The aryl hydrocarbon receptor in barrier organ physiology, immunology, and toxicology. *Pharmacol Rev* 2015;67(2):259–79. DOI: 10.1124/pr.114.009001. PMID: 25657351.
 33. Zhang Y., Molavi O., Su M., Lai R. The clinical and biological significance of STAT1 in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2014;14:791. DOI: 10.1186/1471-2407-14-791. PMID: 25355139.
 34. Kahali B., Yu J., Marquez S.B. et al. The silencing of the SWI/SNF subunit and anticancer gene BRM in Rhabdoid tumors. *Oncotarget* 2014;5(10):3316–32. DOI: 10.18632/oncotarget.1945. PMID: 24913006.
 35. Lanzino M., Maris P., Sirianni R. et al. *DAX-1*, as an androgen-target gene, inhibits aromatase expression: a novel mechanism blocking estrogen-dependent breast cancer cell proliferation. *Cell Death Dis* 2013;4: e724. DOI: 10.1038/cddis.2013.235. PMID: 23846226.
 36. Jiang H.L., Xu D., Yu H. et al. *DAX-1* inhibits hepatocellular carcinoma proliferation by inhibiting β -catenin transcriptional activity. *Cell Physiol Biochem* 2014;34(3):734–42. DOI: 10.1159/000363038. PMID: 25171651.
 37. Yu Y., Prassas I., Dimitromanolakis A., Diamandis E.P. Novel Biological Substrates of Human Kallikrein 7 Identified through Degradomics. *J Biol Chem* 2015;290(29):17762–75. DOI: 10.1074/jbc.M115.643551. PMID: 26032414.
 38. Walker F., Nicole P., Jallane A. et al. Kallikrein-related peptidase 7 (KLK7) is a proliferative factor that is aberrantly expressed in human colon cancer. *Biol Chem* 2014;395(9):1075–86. DOI: 10.1515/hsz-2014-0142. PMID: 25153388.
 39. Iakovlev V., Siegel E.R., Tsao M.S., Haun R.S. Expression of kallikrein-related peptidase 7 predicts poor prognosis in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21(7):1135–42. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-11-1079. PMID: 22573795.
 40. Innamaa A., Jackson L., Asher V. et al. Expression and prognostic significance of the oncogenic K2P potassium channel KCNK9 (TASK-3) in ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 2013;33(4):1401–8. PMID: 23564779.
 41. Juhasz G., Hullam G., Eszlari N. et al. Brain galanin system genes interact with life stresses in depression-related phenotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014;111(16):E1666–73. DOI: 10.1073/pnas.1403649111. PMID: 24706871.
 42. Bench A.J., Li J., Huntly B.J. et al. Characterization of the imprinted polycomb gene *L3MBTL*, a candidate 20q tumour suppressor gene, in patients with myeloid malignancies. *Br J Haematol* 2004;127(5):509–18. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2004.05278.x. PMID: 15566354.
 43. Nowak R., Woszczyński M., Siedlecki J.A. Changes in the DNA polymerase beta gene expression during development of lung, brain, and testis suggest an involvement of the enzyme in DNA recombination. *Exp Cell Res* 1990;191(1):51–6. PMID: 2226650.
 44. Hinz J.M. Impact of abasic site orientation within nucleosomes on human APE1 endonuclease activity. *Mutat Res* 2014;766–767:19–24. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.008. PMID: 25083139.
 45. Yue L., Huang Z.M., Fong S. et al. Targeting ALDH1 to decrease tumorigenicity, growth and metastasis of human melanoma. *Melanoma Res* 2015;25(2):138–48. DOI: 10.1097/CMR.000000000000144. PMID: 25643237.
 46. Li W., Zhang S.L., Wang N. et al. Blockade of T-type Ca(2+) channels inhibits human ovarian cancer cell proliferation. *Cancer Invest* 2011;29(5):339–46. DOI: 10.3109/07357907.2011.568565. PMID: 21438841.
 47. Fujii R., Yoshida H., Fukusumi S. et al. Identification of a neuropeptide modified with bromine as an endogenous ligand for GPR7. *J Biol Chem* 2002;277(37):34010–6. DOI: 10.1074/jbc.M205883200. PMID: 12118011.
 48. Medina P.P., Romero O.A., Kohno T. et al. Frequent BRG1/SMARCA4-inactivating mutations in human lung cancer cell lines. *Hum Mutat* 2008;29(5):617–22. DOI: 10.1002/humu.20730. PMID: 18386774.
 49. Pulkkinen V., Ezer S., Sundman L. et al. Neuropeptide S receptor 1 (NPSR1) activates cancer-related pathways and is widely expressed in neuroendocrine tumors. *Virchows Arch* 2014;465(2):173–83. DOI: 10.1007/s00428-014-1602-x. PMID: 24915894.
 50. Solinski H.J., Zierler S., Gudermann T., Breit A. Human sensory neuron-specific Mas-related G protein-coupled receptors-X1 sensitize and directly activate transient receptor potential cation channel V1 via distinct signaling pathways. *J Biol Chem* 2012;287(49):40956–71. DOI: 10.1074/jbc.M112.408617. PMID: 23074220.
 51. Zeng B., Yuan C., Yang X. et al. TRPC channels and their splice variants are essential for promoting human ovarian cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets* 2013;13(1):103–16. PMID: 22920441.
 52. Manna J.D., Wepy J.A., Hsu K.L. et al. Identification of the major prostaglandin glycerol ester hydrolase in human cancer cells. *J Biol Chem* 2014;289(49):33741–53. DOI: 10.1074/jbc.M114.582353. PMID: 25301951.
 53. Spartà A.M., Bressanin D., Chiarini F. et al. Therapeutic targeting of Polo-like kinase-1 and Aurora kinases in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cell Cycle* 2014;13(14):2237–47. DOI: 10.4161/cc.29267. PMID: 24874015.
 54. Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science, 2002. 877 p.
 55. Kamath J. Cancer-related fatigue, inflammation and thyrotropin-releasing hormone. *Curr Aging Sci* 2012;5(3):195–202. PMID: 23387883.
 56. Jia M., Souchelnytskyi N., Hellman U. et al. Proteome profiling of immortalization-to-senescence transition

- of human breast epithelial cells identified MAP2K3 as a senescence-promoting protein which is downregulated in human breast cancer. *Proteomics Clin Appl* 2010;4(10–11):816–28. DOI: 10.1002/prca.201000006. PMID: 21137025.
57. Barbero P., Bittova L., Pfeffer S.R. Visualization of Rab9-mediated vesicle transport from endosomes to the trans-Golgi in living cells. *J Cell Biol* 2002;156(3):511–8. DOI: 10.1083/jcb.200109030. PMID: 11827983.
58. Yu X.H., Jiang N., Yao P.B. et al. NPC1, intracellular cholesterol trafficking and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2014;429:69–75. DOI: 10.1016/j.cca.2013.11.026. PMID: 24296264.
59. Cho S., Moon H., Loh T.J. et al. 3' Splice site sequences of spinal muscular atrophy related SMN2 pre-mRNA include enhancers for nearby exons. *Sci World J* 2014;2014:617842. PMID: 24616638.
60. Mitchell J.C., Constable R., So E. et al. Wild type human TDP-43 potentiates ALS-linked mutant TDP-43 driven progressive motor and cortical neuron degeneration with pathological features of ALS. *Acta Neuropathol Commun* 2015;3:36. DOI: 10.1186/s40478-015-0212-4. PMID: 26108367.
61. Michel V., Bakovic M. The ubiquitous choline transporter SLC44A1. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 2012;12(2):70–81. PMID: 22483272.
62. Beutin L. Emerging enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006;53(7):299–305. DOI: 10.1111/j.1439-0450.2006.00968.x. PMID: 16930272.
63. Zgiby S.M., Thomson G.J., Qamar S., Berry A. Exploring substrate binding and discrimination in fructose 1, 6-bisphosphate and tagatose 1,6-bisphosphate aldolases. *Eur J Biochem* 2000;267(6):1858–68. PMID: 10712619.
64. Владимирская Е.Б. Апоптоз и его роль в регуляции клеточного равновесия. *Клиническая лабораторная диагностика* 2002;11:25–32.
65. Владимирская Е.Б. Апоптоз в регуляции клеточного равновесия и формировании опухолевого роста. *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2003;2(1):5.
66. Мисюрин В.А., Мисюрин В.А., Барях Е.А. и др. Роль экспрессии генов с-МЫС, BCL2 и BCL6 в патогенезе диффузной В-крупноклеточной лимфомы. *Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика* 2014;7(4):511–20.
67. Verbeke C.S., Wenthe U., Zentgraf H. Fas ligand expression in the germinal centre. *J Pathol* 1999;189(2):155–60. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199910)189:2<155::AID-PATH442>3.0.CO;2-9. PMID: 10547568.
68. Мисюрин В.А. Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза. *Российский биотерапевтический журнал* 2015;14(2):23–30.
69. Agarova L.S., Ivanov A.V., Sablina A.A. et al. P53-dependent effects of RAS oncogene on chromosome stability and cell cycle checkpoints. *Oncogene* 1999;18(20):3135–42.
70. Keizer H.G., Pinedo H.M., Schuurhuis G.J., Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 1990;47(2):219–31. PMID: 2203071.

ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ С МЕЛАНОМОЙ КОЖИ И ПЕРВИЧНО-МНОЖЕСТВЕННЫМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ОПУХОЛЯМИ: КЛИНИЧЕСКИЕ НАБЛЮДЕНИЯ

Д.А. Понкратова, И.В. Цыганова, А.С. Вихрова, А.А. Лушникова

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

Контакты: Анна Александровна Лушникова LAN21@yandex.ru

Введение. Важным фактором риска меланомы кожи (МК) являются первично-множественные злокачественные опухоли (ПМЗО) – 2 и более новообразований, независимо возникающих у пациентов в течение жизни. Частота ПМЗО в России составляет от 2 до 20 %, при этом наблюдается неуклонный рост заболеваемости. Тенденция к повышению частоты ПМЗО связана в основном с ростом продолжительности жизни онкологических больных, применением потенциально канцерогенных методов лечения, воздействием неблагоприятных факторов среды и наследственной предрасположенностью.

Цель исследования – клиничко-генетическая характеристика больных МК в составе ПМЗО.

Материалы и методы. У 8 мужчин и 7 женщин с диагнозом «метастатическая МК в составе ПМЗО» проанализированы истории болезни, структура ПМЗО и мутационный статус опухоли (полимеразная цепная реакция с прямым секвенированием ампликонов).

Результаты. Предварительный анализ данных 15 больных с МК в составе ПМЗО выявил некоторые гендерные особенности. У больных МК женщин ПМЗО чаще представлены опухолями молочных желез, яичников, почек. Избыточная масса тела или ожирение у пациенток с ПМЗО (5/7) встречались несколько чаще, чем у мужчин с ПМЗО (4/8). Частота мутаций онкогенов BRAF и NRAS в МК у больных с ПМЗО женского пола оказалась в 2 раза выше, чем у пациентов мужского пола. У мужчин преобладали комбинации МК с раком кишечника, из 7 случаев в 5 МК диагностирована последней из опухолей в составе ПМЗО, в 1 случае – первой, за исключением пациента с первично-множественными меланомами; у 3 из 8 больных выявлена семейная онкологическая отягощенность. Также у 3 из 8 пациентов в МК были идентифицированы соматические мутации – 2 в гене BRAF и 1 – в гене PDGFR. Из 7 пациенток у 4 МК была первой из опухолей в составе ПМЗО, у 1 – последней. Семейная онкологическая отягощенность обнаружена только у 1 пациентки. У 5 пациенток с ПМЗО в МК выявлены соматические мутации генов BRAF или NRAS (BRAF V600E или NRAS G61C), а также 2 одновременные соматические мутации: в гене EGFR (рак легкого) и в гене KRAS (метастаз МК).

Заключение. Охарактеризованы различные комбинации опухолей в составе ПМЗО у пациентов мужского и женского пола. У женщин с ПМЗО преобладали различные комбинации МК с раком молочной железы, в 3 из 7 случаев МК была первой из опухолей в составе ПМЗО, в 1 – последней. У 3 из 7 пациентов с ПМЗО МК диагностирована последней из опухолей, у 1 – первой, не считая пациента с множественными МК. Выявлена тенденция к более частому семейному отягощению у пациентов по сравнению с пациентками. У всех больных с ПМЗО рецидивы МК наблюдались вскоре после удаления первичной меланомы.

Ключевые слова: первично-множественные злокачественные опухоли, меланома кожи, мутации онкогенов, прогноз

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-43-51

CHARACTERISTICS OF THE PATIENTS WITH CUTANEOUS MELANOMA AND MULTIPLE PRIMARY MALIGNANT TUMORS: CLINICAL OBSERVATIONS

D.A. Ponkratova, I.V. Tsyganova, A.S. Vikhrova, A.A. Lushnikova

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

Background. Multiple primary malignant tumors (MPMT) – 2 or more tumors, arising during patient life – are an important risk factor of cutaneous melanoma (CM). The frequency of MPMT in Russia ranges from 2 to 20 % with the incidence increasing. This tendency is linked mainly with the increasing life expectancy of the patients, with use of a potentially carcinogenic treatment methods, with the influence of adverse environmental factors and genetic predisposition. In 15 patients with MPMT, including CM, has revealed a trend towards more frequent family history in male patients. In female patients MPMT included breast, ovarian and renal malignant tumors. CM relapses were observed shortly after surgical removal of the primary tumors.

Objective. Clinical and genetic characteristics of patients with MK in MPMT structure.

Materials and methods. Disease histories, MPMT structure and CM mutational status (PCR followed by direct sequencing of amplicons) were analyzed in 8 male and 7 female patients with MPMT included metastatic CM.

Results. A preliminary analysis of 15 patients with metastatic CM in MPMT structure has revealed some gender features. In female patients MPMT more often included breast, ovaries or kidney tumors. Excess body weight or obesity was detected in female patients (5/7) more often than in male patients (4/8). There is a tendency to more frequent family cancer histories in male patients compared to female ones – 3/8 vs. 1/7 in 3/8 male patients somatic mutations in BRAF gene (2) and PDGF gene (1) were identified in CM. The frequency of mutations of BRAF and NRAS genes in CM of female patients was 2 times higher than that of male patients. The combination of CM with bowel cancer was prevalent in male patients. In 2/7 male patients CM was the last tumor in MPMT structure, in 5/7 – the first, with the exception of the patient with primary multiple melanomas, while CM as the first tumor was revealed in 4/7 female patients and last CM – in 1/7 ones.

Conclusions. Various combinations of tumors in MPMT structure were characterized in male and female patients. In female patients MPMT included breast, ovarian and renal malignant tumors/were the most frequent, while the combination CM with bowel tumors were prevalent in male ones. In male patients CM was diagnosed as the first tumor more frequently than the last one. The frequency of mutations in BRAF and NRAS genes in MK tumors in female patients with MPMT was 2 times higher than that in male patients. In 15 patients with MPMT, including CM, a trend towards more frequent family cancer history in male patients was revealed. CM relapses were observed shortly after surgical removal of the primary tumor.

Key words: multiple primary malignant tumors, cutaneous melanoma, oncogene mutations, prognosis

Введение

Меланома кожи (МК) – одна из наиболее агрессивных опухолей кожи с высокой смертностью вследствие поздней диагностики заболевания. В России в 2015 г. было выявлено 39 195 случаев первично-множественных злокачественных опухолей (ПМЗО; 26,8 на 100 000 населения), что составляло 6,7 % всех впервые выявленных злокачественных новообразований. В конце 2015 г. в России состояли на учете 150 408 больных ПМЗО, т. е. 4,3 % от общего числа зарегистрированных онкологических больных. В течение 5 лет (2011–2015 гг.) число больных с ПМЗО на 100 тыс. населения в России увеличилось на 9,5 тыс. [1]. В структуре ПМЗО преобладает сочетание двух опухолей. При этом могут быть затронуты как органы различной локализации, так и парные органы, например молочные железы, легкие, почки, или наблюдается мультицентрическое поражение одного и того же органа. Тройные опухоли встречаются значительно реже. Оценка ожидаемой и фактической частоты ПМЗО в больших выборках показывает, что риск развития вторых и последующих опухолей у пациентов с выявленными ранее другими новообразованиями примерно в 1,3 раза выше по сравнению с пациентами, у которых выявлен 1 тип рака. Причем вероятность возникновения других неоплазий растет по мере увеличения числа уже выявленных новообразований [2].

По времени развития ПМЗО подразделяют на синхронные, возникающие с интервалом не более 6 мес, и метакронные, диагностируемые с интервалом более полугод. Синхронно-метакронный и метакронно-синхронный типы ПМЗО наблюдаются в случае 3 и более неоплазий. Установлено, что метакронные опухоли любой локализации преобладают над синхронными. ПМЗО чаще относятся к солидным опухолям, поражающим кожу, желудок, молочные желе-

зы, матку, яичники и толстую кишку. В зависимости от локализации первого новообразования повышается риск развития последующих неоплазий в определенных органах и тканях. Вероятность выявления вторых и последующих опухолей у пролеченных пациентов в 1,3–5,0 раза выше, чем у первичных пациентов. Сочетание 2 опухолей обнаруживается в 75–80 % случаев, 3 – в 10–15 %, 4 – в 5 %, 5 и более – в 2–3 % случаев ПМЗО [3]. Риск возникновения ПМЗО зависит как от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды, так и от факторов наследственной предрасположенности к раку. Для опухолей легких, пищевода, желудка ведущая роль отводится канцерогенам, при раке молочных желез (РМЖ), яичников, мозга – генотипу пациента [4]. Кроме экзогенных факторов риска, важно учитывать мутационный статус генов и генные полиморфизмы, влияющие на эффективность противоопухолевого иммунитета, баланс между клеточной пролиферацией, дифференцировкой и на механизмы репарации ДНК. Установлено, что в развитии опухоли принимает участие несколько независимо возникших мутаций [5].

Наличие нескольких опухолей – довольно типичный признак наследственного рака. Молекулярно-генетические исследования пациентов с ПМЗО позволили прояснить механизмы предрасположенности к развитию наследственного рака, связанные с мутациями генов *BRCA1* (17q21), *BRCA2* (13q12.3), а также *Tp53* (17p13.1) и *ATM* (11q22.3). Изучение закономерностей наследования предрасположенности к онкологическим заболеваниям и синдромам, идентификация генов предрасположенности, отвечающих за их развитие, привело к разработке молекулярно-генетических тестов. Медико-генетическое консультирование дало возможность дискриминировать наследственные и спорадические случаи рака, выявить здоровых носителей мутантных генов

и осуществить пренатальную диагностику мутаций или патогенетических полиморфизмов, ассоциированных с онкологическими заболеваниями. В отягощенных МК семьях риск ее развития у носителей мутации *CDKN2A/p16* составляет 58 % в Англии, 76 % в США, 91 % в Австралии и около 38 % в России. Редкие мутации гена *CDK4* описаны для наследственной МК, их риск не оценен. Однако при медико-генетическом консультировании важно сообщить родителям о рисках развития заболевания для его профилактики, о необходимости регулярно посещения дерматолога, контроля за избыточным ультрафиолетовым облучением и т. д. Пренатальная диагностика мутаций в указанных генах проводится в отдельных случаях по желанию родителей, если МК была диагностирована у одного из них и/или близких родственников ребенка и при наличии других онкопатологий в семье [6].

Цель работы – клиничко-генетическая характеристика больных МК в составе ПМЗО, отобранных из ранее изученной выборки больных распространенной МК ($n = 137$).

Материалы и методы

Исследовали биопсийный материал от 15 пациентов, отобранных из выборки больных МК ($n = 137$), которые обращались в отделение биотерапии опухолей НИИ КО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 2010 по 2016 г. Включены 8 мужчин в возрасте от 57 до 84 лет и 7 женщин в возрасте от 58 до 73 лет. Критерием включения в выборку был диагноз «метастазы МК в составе ПМЗО». Анамнестические данные получены из историй болезни и гистологических описаний, представленных в базе данных ГИС. Индекс массы тела (ИМТ, кг/м²) определяли во время первого визита пациента по поводу МК в НМИЦ онкологии. Гистологическое исследование и верификация опухолевых биопсий выполнены в отделе патологической анатомии НМИЦ онкологии.

Геномную ДНК выделяли из срезов свежемороженой биопсийной ткани или со срезов архивного материала МК, заключенного в парафин и верифицированного патологоанатомом. Материалы получены от 8 пациентов и 7 пациенток с МК в составе ПМЗО. Использовали комплекты реактивов для выделения ДНК из биологического материала Ампли-Прайм®ДНК-сорб-В («ИнтерЛабСервис», Россия) по инструкции производителя.

Для анализа мутаций методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли набор реактивов ООО «Сиб-Энзим» (Россия). На матрице геномной ДНК с помощью ПЦР амплифицировали последовательности онкогенов *BRAF*, *NRAS*, *KRAS*, *PDGFRA*. Праймеры к исследованным экзонам этих генов приведены в табл. 1.

Параметры температурного цикла ПЦР: начальная денатурация 4 мин при 94 °С; 35 циклов – денатурация ПЦР-продукта, 30 с при 94 °С, отжиг праймеров в течение 30 с при температуре согласно табл. 2, элонгация 30 с при 72 °С; терминальная элонгация при 72 °С в течение 10 мин. Реакция проводилась в тонкостенных пробирках для ПЦР на амплификаторе «Терцик 1» (НПФ «ДНК-Технология», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали бидистиллированную воду. ПЦР-продукты предварительно анализировали в 2 % агарозном геле с бромистым этидием. Концентрацию ДНК определяли по интенсивности ультрафиолетового свечения по сравнению с маркером молекулярной массы ДНК (DNA Ladder до 1 тыс. п. н. с шагом 100 п. н.; ООО «Сиб-Энзим», Россия). Затем ПЦР-продукты секвенировали в ЦКП «Геном» на автоматическом секвенаторе ABI PRISM®BigDye™ Terminator v. 3.1.

Результаты

Примеры ПМЗО, включающих МК, у мужчин

Пример 1. ПМЗО представлены 4 разными очагами МК (множественная МК).

Таблица 1. Праймеры для амплификации последовательностей генов *BRAF*, *NRAS* и *PDGFRA*

№	Пары праймеров	Последовательности (5'– 3')	Температура отжига, °С
1	BRAF_ Ex15_For BRAF_ Ex15_Rev	ACCTAAACTCTTCATAATGCT ACAACCTGTTCAAACCTGATGG	56 56
2	NRAS_ Ex2_For NRAS_ Ex2_Rev	TTGCTGGTGTGAAATGACTGA CCGACAAGTGAGACAGGAT	64 60
3	NRAS_ Ex3_For NRAS_ Ex3_Rev	AATTGAACTTCCCTCCCTCCCT TGTCCTCATGTATTGGTCTCTC	68 64
4	PDGFRA_ Ex18_For PDGFRA_ Ex18_Rev	TTCCTTTCCATGCAGTGTGTCC GAAGCAACACCTGACTTTAGAGA	68 68
5	KRAS Ex 2_For KRAS Ex 2_Rev	ATGACTGAATATAAACTTGTGG TGCATATTAACAAGATTACC	58 58

Пациент Г., 1979 г. р. В 2002 г., в возрасте 23 лет, самостоятельно обнаружил рост врожденного пигментного образования на коже спины. После хирургического удаления и гистологической верификации МК местно назначена лучевая терапия, заключение утрачено. В 2007 г. выполнено повторное иссечение пигментного образования на коже спины, гистологическое заключение: МК. Профилактического лечения пациент не получал. В 2011 г. выполнено иссечение 2 пигментных образований, локализованных на коже поясничной области и на коже брюшной стенки, гистологически верифицированных как МК, стадия Пв. Кроме того, были выявлены метастазы МК в паховых и шейных лимфатических узлах (ЛУ). В течение 2011–2012 гг. пациент прошел 6 курсов полихимиотерапии цисплатином, блеомицином и винбластином. Однако наблюдалось прогрессирование — метастазы в печени и в паховых ЛУ, T4bN0M0, ПС. Была назначена иммунотерапия дакарбазином и интерфероном альфа, летальный исход наступил в 2012 г. в возрасте 33 лет — через 10 лет после выявления первичной МК. Семейного отягощения онкологическими заболеваниями в анамнезе этого пациента с первично-множественной метакронной МК не выявлено. Герминальной мутации в гене *CDK2/p16*, описанной у 50 % больных с аналогичным диагнозом и неотягощенным семейным анамнезом, в данном случае не обнаружено.

Пример 2. ПМЗО представлены 3 различными неоплазиями: рак толстой кишки + рак почки + МК.

У пациента Б., 1955 г. р., при первичном осмотре отмечена избыточная масса тела (I степень ожирения, ИМТ 33). В 2009 г., в возрасте 54 лет, проведено 6 курсов полихимиотерапии по поводу рака толстой кишки, затем обнаружен липоматоз в слизистой оболочке кишечника. В 2010 г. выполнено хирургическое удаление злокачественного образования в правой почке, гистологически верифицирован светлоклеточный рак почки. В 2011 г. по месту жительства было выполнено иссечение предположительно базалиомы грудной стенки. В 2012 г. хирургически удалена веретенклеточная беспигментная с изъязвлением МК передней грудной стенки с последующим метастазированием в подмышечные ЛУ слева, T4bN0M0, ПС, рекомендовано динамическое наблюдение. В МК выявлена мутация BRAF V600E. Пациент умер в 2012 г., через 3 года после обнаружения первой опухоли и через 1,5 года после выявления МК, в возрасте 56 лет.

Пример 3. ПМЗО представлены тремя различными неоплазиями: рак гортани + рак толстой кишки + МК.

Пациент Ф., 1935 г. р. При первичном осмотре отмечено ожирение I степени (ИМТ 31,9). В анамнезе — семейная отягощенность: рак желудка у отца (умер в возрасте 50 лет) и у бабушки по отцовской

линии, умершей в возрасте 80 лет. В 2002 г., в возрасте 67 лет, пациенту проведено хирургическое лечение по поводу рака гортани с последующей лучевой терапией. В 2004 г. — хирургическое лечение по поводу рака толстой кишки. В 2007 г. отмечено пигментное образование на коже передней грудной стенки, которое увеличивалось в размерах в течение 3 лет. В 2010 г. проведено иссечение МК на фоне невуса, локализованного на передней грудной стенке. Гистологическое описание соответствует пигментосодержащей невоклеточной и эпителиоидно-клеточной с микроизъязвлением МК с уровнем инвазии 3, толщиной 3 мм, стадия T3bN0M0, Пв. В МК выявлена мутация PDGFRA S847L. Уже в 2011 г. у пациента обнаружены метастазы МК в подмышечных ЛУ слева, после хирургического лечения — метастазы в подмышечных ЛУ справа; выполнена правосторонняя лимфодиссекция, отмечена полная регрессия и рекомендовано динамическое наблюдение. В 2013 г. обнаружен рецидив МК на фоне химиотерапии с метастазами в головном мозге и кровоизлиянием в мозг с летальным исходом в возрасте 82 лет — через 11 лет после выявления первой опухоли в составе ПМЗО и через 5 лет после обнаружения первичной МК. Мутаций BRAF/NRAS в МК не выявлено.

Примеры 4 и 5. ПМЗО представлены 2 различными неоплазиями кожи: МК + базально-клеточный рак.

Пациент М., 1956 г. р. В 2012 г., в возрасте 56 лет, самостоятельно обнаружил изменение формы и размера ранее существовавшего пигментного пятна на левом плече. Кроме того, имелось новообразование на коже передней брюшной стенки. После хирургического иссечения опухолей гистологически верифицированы пигментная веретенклеточная МК левого плеча, T4bN0M0, ПС, и базально-клеточный рак передней брюшной стенки. Назначена адъювантная иммунотерапия препаратами интерферона альфа по месту жительства. В том же году отмечено прогрессирование заболевания — метастазы в подмышечных ЛУ слева, выполнена лимфаденэктомия. У близких родственников пациента по отцовской линии — рак легкого и рак желудка. В МК обнаружена мутация BRAF V600E.

Пациент В., 1947 г. р. В 2011 г., в возрасте 64 лет, больному рекомендовали хирургическое удаление опухоли кожи лобной области, однако пациент от операции отказался. В 2014 г. пациент обратился по поводу пигментного невуса грудной клетки; после иссечения верифицирована пигментная МК грудной клетки, T3N0M0, Пв. В том же году отмечен рецидив МК в послеоперационном рубце толщиной 3–5 мм с уровнем инвазии по Кларку 3, T3N0M0, Пв, а также базально-клеточный рак кожи лобной области, стадия T1N0M0, Ib. В анамнезе имеется семейная отягощенность раком легких и раком кишечника

у близких родственников пациента. Мутаций BRAF/NRAS/KIT в МК не выявлено.

Пример 6. ПМЗО представлены 2 различными неоплазиями: МК + лейкоз.

У **пациента Б.**, 1930 г. р., при первичном осмотре отмечена избыточная масса тела (ИМТ 26,8). В 2004 г., в возрасте 74 лет, самостоятельно обнаружил растущее пигментное образование на коже правой щеки. В 2012 г. выявлен хронический лимфолейкоз и назначена полихимиотерапия по схеме FC (флюдарабин + циклофосфан), наступила ремиссия. В 2013 г. проведено хирургическое удаление МК правой щеки, метастатических ЛУ в правой околоушной жевательной области и в подчелюстной области толщиной 4 мм с уровнем инвазии 3, стадия T2N0M0. В 2014 г. обнаружено узловое образование в околоушной жевательной области слева и проведена субтотальная резекция правой околоушной слюнной железы с метастазами МК. Мутаций BRAF/NRAS в МК не выявлено.

Примеры 7 и 8. ПМЗО представлены 2 различными неоплазиями: рак восходящей ободочной кишки + МК.

Пациент Ш., 1948 г. р. При первичном осмотре отмечена избыточная масса (ИМТ 27). В 2008 г., в возрасте 60 лет, проведено хирургическое лечение рака восходящей ободочной кишки, стадия T3N0M0, ПА. В 2014 г. выполнено иссечение метастазов беспигментной эпителиоидно-клеточной МК без выявления первичного очага в подмышечных ЛУ справа. В том же году отмечены рецидивы: увеличение ЛУ в подмышечной области справа. Назначена адъювантная иммунотерапия интерфероном альфа-2b, динамическое наблюдение по месту жительства. Мутаций BRAF/NRAS/KIT в МК не обнаружено.

Пациент Е., 1943 г. р. В 2009 г., в возрасте 65 лет, проведено хирургическое лечение рака восходящей ободочной кишки, стадия T2N1M0, ПА. В 2014 г. по месту жительства проведено иссечение беспигментной эпителиоидно-клеточной узловой МК толщиной 2 мм с уровнем инвазии 3. Опухоль локализована на передней грудной стенке. Дополнительного лечения не получал. Через полгода самостоятельно обнаружил метастаз в левом подмышечном ЛУ. Проведена подмышечная лимфаденэктомия слева, гистологически верифицирован метастаз беспигментной МК, T2bN0M0, ПА. Мутаций BRAF/NRAS в МК не выявлено.

Примеры ПМЗО, включающих МК, у женщин

Пример 1. ПМЗО представлены 3 различными неоплазиями: МК + рак легкого + РМЖ.

Пациентка Ш., 1938 г. р. В 2010 г., в возрасте 72 лет, по месту жительства хирургически удалена ногтевая пластинка III пальца правой кисти по поводу подногтевой гематомы, рана не заживала в течение 8 мес. В 2011 г. проведена резекция ногтевой

фаланги III пальца правой кисти по поводу хронического остеомиелита, гистологическое исследование выявило беспигментную эпителиоидно-клеточную МК с очагами некроза, pTxNxMx. В том же году пациентка сама обнаружила уплотнение в области правого плеча, терапия не проводилась. В 2011 г. при диспансерном обследовании выявлена опухоль в правой молочной железе. После мастэктомии и резекции опухоли на плече гистологически верифицированы 2 новообразования – метастаз МК вследствие продолженного роста меланомы кожи дистальной фаланги III пальца правой кисти, pTxNxMx, и внутрипротоковый РМЖ, pT2aNxM1a. Проведено 5 курсов адъювантной химиотерапии дакарбазином, иммунотерапия интерфероном альфа.

При контрольном обследовании выявлено новообразование в нижней доле левого легкого с метастазами в париетальную и висцеральную плевру. Выполнены торакоскопия, биопсия плевры, и верифицирован периферический рак нижней доли правого легкого. В опухоли легкого обнаружена делеция в экзоне гена *EGFR*, назначена длительная таргетная терапия гефитинибом (иресса).

В 2012 г. выполнено иссечение метастаза МК в мягких тканях правого плеча, назначена лучевая терапия МК, терапия РМЖ тамоксифеном отменена. Через 3 мес обнаружены подкожный метастаз МК по ходу операционного рубца на внутренней поверхности правого плеча и конгломерат 3,3 × 1,2 см в толще мягких тканей. В метастазе МК выявлена мутация *KRAS G13D*. Пациентка умерла в возрасте 73 лет, через 1,5 года после обнаружения первой опухоли.

Пример 2. ПМЗО представлены 3 различными неоплазиями: рак прямой кишки + РМЖ + МК.

У **пациентки Б.**, 1951 г. р., при первичном осмотре отмечена избыточная масса (ИМТ 27,7). В 2002 г., в возрасте 50 лет, выявлен рак прямой кишки, стадия T4N0M0, ПВ. В онкодиспансере проведена лучевая терапия с последующей брюшно-анальной резекцией прямой кишки, колостомой и реконструктивной операцией в объеме низведения сигмовидной кишки в анальный канал. В 2005 г. там же выявлен рак правой молочной железы, проведено комбинированное лечение – радикальная мастэктомия с последующей лучевой терапией, состояние после терапии – T1N0M0, ПВ.

В 2010 г. проведено иссечение опухоли кожи правого бедра, верифицирована МК и назначена профилактическая иммунотерапия интерфероном альфа-2b, реафероном. В 2014 г. обнаружены метастазы МК в паховых ЛУ справа, выполнена операция Дюкена, в метастазах выявлена мутация *BRAF V600E*.

Через полгода отмечено прогрессирование МК в забрюшинные ЛУ и мягкие ткани лобковой области, выполнена лимфаденэктомия. Через 4 мес – рецидив МК в паховой области справа, выполнено

хирургическое иссечение. Выявлена семейная отягощенность: родная сестра больной умерла в возрасте 54 лет от рака сигмовидной кишки с метастазами в печени.

Пример 3. ПМЗО представлены 3 различными неоплазиями: фибросаркома яичника + МК + РМЖ.

Пациентка М., 1950 г. р. Отмечена избыточная масса тела (I степень ожирения, ИМТ 34), менопауза с 42 лет. В 2008 г., в возрасте 58 лет, больная перенесла экстирпацию матки с придатками и удаление большого сальника по поводу фибросаркомы левого яичника. При плановом осмотре в 2015 г. обнаружен опухолевый узел в левой подмышечной области, при осмотре кожных покровов на спине выявлено новообразование и гистологически верифицирована МК, стадия T2N1M1, IIВ. В хирургически удаленных узлах обнаружены метастазы мало пигментной эпителиоидно-клеточной МК и метастазы РМЖ, стадия T2NxM1, IB. Проведено 2 курса адьювантной полихимиотерапии: адриабластин + эндоксан, рекомендовано наблюдение онкологом по месту жительства. Мутаций BRAF/NRAS в МК не выявлено.

Пример 4. ПМЗО представлены 2 различными неоплазиями: МК + РМЖ.

У пациентки И., 1951 г. р., при первичном осмотре отмечена избыточная масса тела (ИМТ 29,9). В 1990 г., в возрасте 39 лет, удален неоднократно травмированный невус на коже правого бедра, дополнительное лечение не проводилось. В 2000 г. у пациентки был выявлен рак правой молочной железы. После радикальной мастэктомии проведено 4 курса полихимиотерапии по схеме FAC, затем в течение 3 лет пациентка получала тамоксифен, без признаков прогрессирования. В 2011 г. в мягких тканях правого бедра выше старого послеоперационного рубца обнаружен метастатический узел МК, стадия TхMхNх. Выполнена операция Дюкена. В метастазе МК обнаружена мутация BRAF V600E. Наблюдалось продолженное метастазирование МК в мягких тканях правого бедра, в легких и печени. Назначена полихимиотерапия по схеме CVD 1, лечение было осложнено нейтропенией IV степени. Второй цикл лечения – с поддержкой колониестимулирующими факторами (КСФ) из-за высокого риска нейтропении. Наблюдалась отрицательная динамика с метастазированием МК в печени и легких. Вследствие прогрессирования назначена химиотерапия таксолом и карбоплатином. Отмечена нейтропения IV степени на фоне профилактики КСФ; летальный исход – в возрасте 63 лет, через 14 лет после выявления первой опухоли и через 13 лет после обнаружения первичной МК.

Пример 5. ПМЗО представлены 2 различными неоплазиями: комбинация РМЖ + МК.

Пациентка К., 1953 г. р. При первичном осмотре отмечена избыточная масса тела (ИМТ 26). В 2000 г.,

в возрасте 47 лет, диагностированы рак левой молочной железы (стадия T1N0M0) и синхронная МК левой голени. В 2001 г. после радикальной мастэктомии и резекции МК без последующей терапии обнаружены метастазы РМЖ в костях скелета, назначены лучевая терапия и тамоксифен. С 2002 г. пациентка принимала препараты фемара и золадекс, по мере прогрессирования – ингибиторы ароматазы, с 2006 г. принимала зомету. В 2010 г. обнаружен остеомиелит верхней челюсти; зомету, а затем аримидекс отменили. Дальнейшего лечения по поводу РМЖ пациентка не получала. В 2014 г. выявлены метастазы МК в мягких тканях левой голени и в брюшной стенке, которые удалены хирургически, стадия T1N0M0. В 2015 г. отмечен рецидив МК в послеоперационном рубце на левой голени. В метастазе МК обнаружена мутация BRAF V600E.

Примеры 6 и 7. ПМЗО представлены 2 различными неоплазиями: МК + рак почки.

У пациентки В., 1977 г. р., с врожденным пигментным невусом на коже спины, неоднократно травмировавшимся, при первичном осмотре отмечена избыточная масса тела (ИМТ 28). В 2009 г., в возрасте 32 лет, выполнена лазерная деструкция невуса как папилломы, гистологическое исследование не проводилось. В 2013 г., в возрасте 35 лет, отмечено уплотнение в правой лопаточной области, в 2014 г. это новообразование удалено хирургически с подозрением на липому. Гистологически верифицирована МК, TхNхM0. В 2014 г. выявлены метастазы МК в подмышечных ЛУ справа и в мягких тканях спины, выполнены иссечение метастатических узловых образований в мягких тканях спины и лимфаденэктомия. В метастазах МК выявлена мутация BRAF V600E.

В 2014 г. у пациентки обнаружено объемное образование в правой почке. Проведена тотальная резекция почки и рекомендовано динамическое наблюдение по месту жительства.

Пациентка М., 1953 г. р. В 2009 г., в возрасте 56 лет, диагностирован светлоклеточный рак почки, стадия TхNхM0, IA, проведена резекция почки с окружающей тканью и надпочечником. В 2015 г. хирургически удалена пигментная поверхностно-распространяющаяся с изъязвлением МК бедра толщиной 2 мм, с уровнем инвазии 2, стадия T1N0M0. В биопсийном материале МК выявлена мутация NRAS G61C.

Обсуждение

В изученной выборке ПМЗО у мужчин преобладали комбинации МК + рак кишечника. Из 8 пациентов у 4 выявлены избыточная масса тела или ожирение. У 3 пациентов в МК обнаружены соматические мутации. У 3 больных отмечена семейная онкологическая отягощенность, 5 пациентов имели МК на фоне невуса.

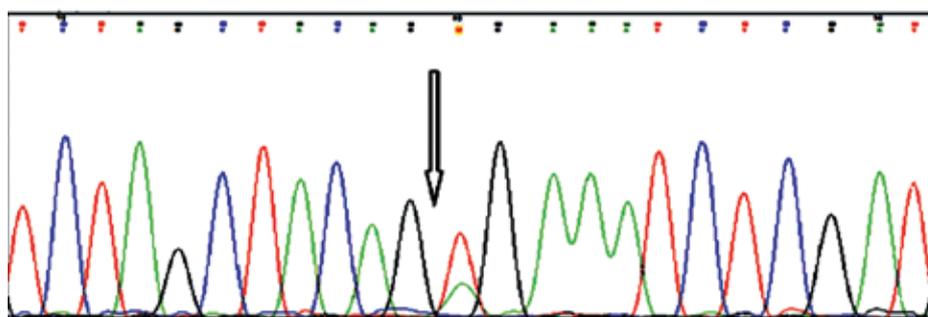
У пациенток с ПМЗО преобладали различные комбинации МК с РМЖ. Из 7 больных 5 имели избыточную массу тела. У 4 МК развивалась раньше других неоплазий в составе ПМЗО и быстро прогрессировала с образованием отдаленных метастазов. У 6 из 7 пациенток в МК обнаружены соматические мутации генов *BRAF* или *NRAS* (*BRAF* V600E или *NRAS* G61C), а также 2 одновременные мутации: в гене *EGFR* (рак легкого) и в гене *KRAS* (метастаз МК). У 1 пациентки в семье выявлены случаи онкологического заболевания, у 1 больной МК возникла на фоне невуса.

Однонуклеотидная замена с. 1799T>A в экзоне 15 гена *BRAF* приводит к замене валина на глутаминовую кислоту V600E, постоянной активации серинтреониновой киназы *BRAF* и митогенного сигнального пути *MAPK/ERK*. Эта мутация выявлена в меланоме кожи у 6 пациенток и 3 пациентов с МК в составе ПМЗО (см. рисунок, табл. 2).

Случай крайне редкой множественной МК, возникшей у пациента в возрасте 23 лет, вероятно, обусловлен генетически и требует дальнейшего изучения. Для множественной МК характерно развитие опухолевых очагов на нескольких участках кожи, обычно на туловище и симметрично на конечностях – в 70 % случаев. Частота появления меланомы множественного типа составляет от 1 до 5 % всех случаев появления опухолей и от 0,5 до 4 % всех типов МК. В 3 раза чаще болезнь поражает мужчин в молодом возрасте. При семейной меланоме частота ПМЗО достигает 1 % [6].

Большинство авторов считают прогноз множественных МК неблагоприятным, что подтверждается и в нашем случае. Однако при исследовании 40 больных первично-множественной МК, наблюдавшихся в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в период с 1970 по 1984 г., оказалось, что общая 3- и 5-летняя выживаемость таких пациентов статистически превышает выживаемость больных первичной МК: медиана выживаемости у пациентов с первично-множественной МК составила $96,5 \pm 30,4$ мес. Авторы объясняют этот парадокс более высокой частотой поверхностно-распространенной МК в группе с ПМЗО, когда уровень инвазии не достигает 3 и толщина опухоли менее 1,5 см. Выживаемость при первично-множественных МК была выше у женщин и у пациентов с метакронными опухолями [7]. По этим данным, в 77,5 % случаев множественной МК встречалось по 2 опухолевых очага, локализованных на туловище (44,6 %) и нижних конечностях (31,5 %). При этом у мужчин преобладали синхронные МК (72,2 %), у женщин – метакронные (68,2 %, $p < 0,01$). Синхронные МК, как правило, возникали на неповрежденной коже, а метакронные – на фоне невусов. Существует мнение, что первично-множественные МК не ухудшают прогноз заболевания [7, 8].

Анализ изученных нами данных пациентов с МК в составе ПМЗО показывает, что избыточная масса тела встречается у больных женщин несколько чаще, чем у мужчин. Кроме того, выявлена тенденция к более частому семейному отягощению пациентов по сравнению



Фрагмент последовательности экзона 15 гена *BRAF*, амплифицированной на матрице опухолевой ДНК пациентки с МК в составе ПМЗО; стрелкой отмечена однонуклеотидная замена с. 1799T>A, соответствующая мутации V600E в тирозинкиназном домене белка *BRAF*

Таблица 2. Распределение больных МК в составе ПМЗО по некоторым параметрам

Пол	Число больных с превышением индекса массы тела		Семейная отягощенность	Выявленные в МК мутации			
	Избыточная масса тела	Ожирение		<i>BRAF</i> V600E	<i>PDGFRA</i> S847L	<i>KRAS</i> G13D	<i>NRAS</i> G61C
Мужчины (n = 8)	2	2	3	2	1	–	–
Женщины (n = 7)	4	1	1	4	–	1	1

с пациентками. Частота мутаций онкогенов *BRAF* и *NRAS* в меланоме у больных женского пола оказалась в 2 раза выше. У больных МК женщин ПМЗО чаще представлены гормонозависимыми опухолями, затрагивающими молочные железы, яичники, почки. Однако для подтверждения этих наблюдений необходимо исследование больших групп пациентов с МК в составе ПМЗО.

Бартон и соавт. провели ретроспективный анализ прогноза у пациентов с МК в возрасте от 18 до 70 лет, наблюдавшихся в различных клиниках с 1996 по 2003 г. В исследование включили 1056 женщин, 299 (28,3 %) из которых были в возрасте не более 40 лет, 757 (71,7 %) – старше 40 лет. Было показано, что регрессия опухолей у молодых пациенток менее вероятна, чем в группе пациенток старшего возраста (6,4 % против 11,5 %). Толщина меланомы по Бреслоу, изъязвление опухоли и наличие пораженных сторожевых ЛУ были ассоциированы с худшей безрецидивной выживаемостью в обеих группах пациенток. Однако локализация МК на туловище коррелировала с худшим прогнозом только в группе более молодых пациенток. В целом прогноз МК у женщин был лучше, чем у пациентов с МК. Однако у пациенток с МК, локализованной на туловище, в возрасте моложе 40 лет риск рецидивов и метастазирования оказался выше, чем при другой локализации опухоли [9]. В изученных группах летальный исход наблюдали у 2 из 7 пациенток старше 40 лет, причем все пациентки в этой возрастной группе достигли 5-летней выживаемости.

Пол больных МК принято считать независимым прогностическим фактором рецидивирования и продолжительности жизни [10]. В исследованной нами группе эта закономерность не прослежена ввиду малой выборки.

В литературе отмечены различия в преимущественной локализации МК у пациентов разного пола. У женщин опухоль чаще всего обнаруживается на груди и нижних конечностях, у мужчин – на спине, передней брюшной стенке и верхних конечностях [11]. Такие особенности могут быть связаны с распределением подкожной жировой ткани и с активностью гормонов [12].

В обеих группах больных ПМЗО метастазирование МК наблюдалось достаточно быстро после хирургического удаления первичного очага. Это объясняется подавлением иммунитета, возникновением очага хронического воспаления, активацией цитокинов и *TNF- α* , а также иными причинами. В то же время своевременная адъювантная иммунотерапия может ингибировать или отсрочить метастазирование первичной МК.

Заключение

В последнее время отмечено повышение частоты ПМЗО среди российских пациентов, что требует оптимальной тактики лечения, которое основано на результатах клинико-генетического исследования. Предварительный анализ 15 пациентов с МК в составе ПМЗО выявил некоторые отличительные черты в зависимости от пола больных. У мужчин преобладали комбинации МК с раком кишечника, из 7 случаев в 5 МК диагностирована последней из опухолей в составе ПМЗО, в 1 случае – последней (за исключением пациента с первично-множественными меланомами). Из 8 пациентов у 4 выявлена избыточная масса тела. У 3 – отмечена семейная онкологическая отягощенность. В 3 случаях в МК были выявлены соматические мутации – 2 в гене *BRAF* и 1 – в гене *PDGFR*.

У больных с ПМЗО женщин преобладали различные комбинации МК с РМЖ, из 7 в 3 случаях МК была первой из опухолей в составе ПМЗО, в 1 – последней. Избыточная масса тела была выявлена у 5 из 7 пациенток, что сопоставимо с группой больных с ПМЗО мужчин. При ПМЗО мутации в опухолях у женщин обнаруживались вдвое чаще: у 6 из 7 пациенток в МК выявлены соматические мутации генов *BRAF* либо *NRAS* (*BRAF* V600E или *NRAS* G61C), а также 2 одновременные соматические мутации: в гене *EGFR* (рак легкого) и в гене *KRAS* (метастаз МК). Соматическая мутация *BRAF* V600E выявлена в меланоме кожи у 4 из 7 пациенток. Семейная отягощенность при ПМЗО встречалась у пациенток в 3 раза реже: случай онкологического заболевания в семье был обнаружен только у 1 из 7. Дальнейшее исследование позволит уточнить выявленные гендерные особенности и их прогностическое значение.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
2. Дмитриев Ф.Б., Мойсак Г.И., Чернов С.В. и др. Проблемы лечения новообразований головного мозга у больных с первично-множественными опухолями. Российский онкологический журнал 2015;6:4–8.
3. Кит О.И., Колесников Е.Н., Владимирова Л.Ю. и др. Случай успешного хирургического лечения синхронно-метахронного рака поджелудоч-

- ной железы у пациента с тремя локализациями злокачественной полинеоплазии. *PMЖ* 2015;13:796–9.
4. Testori A., Cioffi U., De Simone M. et al. Multiply primary synchronous malignant tumors. *BMC Research Notes* 2015;8:730-738. DOI: 10.1186/s13104-015-1724-5. PMID: 26613933. PMCID: PMC4662827.
 5. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В., Лушникова А.А. и др. Спектр мутаций различается в субтипах меланомы кожи. *Молекулярная биология* 2015;49(6):1022–9.
 6. Frank C., Sundquist J., Hemminki A., Hemminki K. Risk of other cancers in families with melanoma: novel familial links. *Sci Rep* 2017;15(7):426–301.
 7. Трапезников Н.Н., Хасанов Ш.Р. Первично-множественные меланомы кожи. *Вестник НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина РАМН* 1991;2(1):3–6.
 8. Сивков А.В., Одинцов С.В., Блакитная М.А. Первично-множественные злокачественные опухоли. *Consilium Medicum* 2004;7:529–32.
 9. Burton A.L., Egger M.E., Quillo A.R. et al. Prognostic factors in young women with cutaneous melanoma. *Am J Surg* 2014;207(1):102–8.
 10. Voinea S., Bidaru A., Panaitescu E. et al. Impact of gender and primary location on outcome of patients with cutaneous melanoma. *J Med Life* 2016;9(4):444–8.
 11. Mandala M., Massii D. Tissue prognostic biomarkers in primary cutaneous melanoma. *Virchows Arch* 2014;464(3):265–81.
 12. Лушникова А.А., Балбуцкий А.В., Понкратова Д.А., Казубская Т.П. Особенности экспрессии лептина и его рецептора при метастатической меланоме кожи. *Успехи молекулярной онкологии* 2015;2(2):63–7. DOI: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.63–67.

ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ мРНК MDM2 И NFkB1 В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДВУХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ

А. В. Пономарев, В. А. Мисюрин, А. А. Рудакова, О. С. Бутова, А. В. Мисюрин, М. А. Барышникова
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Александр Васильевич Пономарев kl8546@yandex.ru

Введение. Проблема резистентности к противоопухолевым препаратам является серьезным препятствием для успешной химиотерапии опухолей. В ряде работ показано, что липосомальные формы противоопухолевых препаратов способны преодолеть множественную лекарственную устойчивость, но механизм, с помощью которого это происходит, до сих пор не известен. Одним из химиопрепаратов, применяемых для лечения меланомы, является араноза из класса нитрозомочевины – метилирующий ДНК агент.

Цель исследования – изучить воздействие лекарственных форм аранозы (липосомальной и «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио)), а также пустых липосом на экспрессию мРНК p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88 в опухолевых клетках.

Материалы и методы. Исследование проводили на 10 клеточных линиях метастатической меланомы человека, 4 из которых несли мутацию BRAF. Клеточные линии инкубировали 24 ч с лекарственными формами аранозы – аранозой-лио и липосомальной, а также с пустыми липосомами. В количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени исследовали уровень экспрессии генов p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88.

Результаты. Араноза-лио повышает экспрессию мРНК p53 незначительно и только на BRAF-положительных клетках, при этом статистически значимо ($p = 0,0013$) повышает экспрессию мРНК MDM2 – фактора резистентности опухоли к химиотерапии. Экспрессия мРНК белков NFkB2, MyD88 не отличалась при воздействии разных лекарственных форм аранозы и слабо отличалась от контроля. Липосомальная араноза повышает экспрессию мРНК NFkB1 – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК метилированием.

Выводы. Две лекарственные формы аранозы – липосомальная и араноза-лио – оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии посредством повышения экспрессии мРНК MDM2. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК NFkB1 – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК метилированием.

Ключевые слова: араноза, меланома, p53, MDM2, NFkB1

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-52-58

THE INFLUENCE OF DRUG FORMULATIONS ON THE EXPRESSION OF MDM2 AND NFkB1 mRNA IN THE MELANOMA CELL LINES

A. V. Ponomarev, V. A. Misyurin, A. A. Rudakova, O. S. Burova, A. V. Misyurin, M. A. Baryshnikova

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

Introduction. Chemotherapy is an extremely ineffective and unsatisfactory means of treating malignant melanoma due to drug resistance, which is characteristic of this disease. A number of studies have shown that liposomal forms of anticancer drugs are able to overcome the multidrug resistance, but the mechanism by which this occurs is still remained to be elucidated. Aranoza (DNA-alkylating agent, a derivative of nitrosourea) has been approved for the treatment of patients with metastatic melanoma.

Objective: to examine the influence of liposomal aranoza as well as the empty liposomes and “liophilisate for the preparation of solution for injections” (aranoza-lío) on the expression of mRNA of p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88.

Materials and methods. The study was performed with 10 melanoma cell lines, 4 of which carried the BRAF mutation. The level of p53, MDM2, NFkB1, NFkB2, MyD88 mRNA was investigated by quantitative polymerase chain reaction in real time.

Results. Aranoza-lío increased slightly the expression of p53 mRNA in BRAF-mutated cells. We have observed also the increased expression of MDM2 mRNA ($p = 0.0013$). The expression of NFkB2, MyD88 mRNA did not change significantly as compared to control. Liposomal aranoza increased the expression of NFkB1 mRNA.

Conclusion. Based on the data obtained we conclude that the liposomal aranoza triggers the mechanisms that contribute to sensitivity of cells toward anticancer drugs while aranoza-lío favored the enhancing of the expression of MDM2 mRNA and increase the resistance to chemotherapy.

Key words: aranoza, melanoma, p53, MDM2, NFkB1

Введение

Химиотерапия — признанный метод лечения онкологических заболеваний, однако к противоопухолевым препаратам часто развивается лекарственная устойчивость, которая приводит к снижению терапевтического эффекта. Поиск способов преодоления лекарственной резистентности является актуальной задачей.

Известно, что липосомальные формы противоопухолевых препаратов способны преодолевать множественную лекарственную устойчивость [1, 2]. Однако механизм, с помощью которого это происходит, до сих пор не изучен. Возможно, липосомы вызывают гибель опухолевых клеток за счет воздействия на сигнальные пути, обеспечивающие защиту этих клеток, в частности на те, в которые вовлечены сигнальные белки p53 и NF-κB (nuclear factor-κB).

NF-κB является индуцибельным транскрипционным фактором, который регулирует экспрессию многих генов, участвующих в регуляции иммунного ответа, апоптоза, ангиогенеза и инвазии опухолевых клеток. Все эти функции указывают на важную роль NF-κB в развитии опухоли.

Механистически NF-κB способствует онкогенезу, вызывая экспрессию различных генов, ответственных за выживание клеток, пролиферацию, миграцию, инвазию. Однако в ряде исследований показано, что высокая экспрессия субъединицы NFκB1, наоборот, может быть связана с противоопухолевыми эффектами [3]. Экспрессия мРНК NFκB1 при многих гематологических заболеваниях примерно в 2 раза ниже по сравнению с образцами здоровых доноров. Клетки, в которых экспрессия NFκB1 низкая, накапливают больше мутаций, индуцированных алкилированием, а у мышей с мутацией гена *NFκB1* лимфомы развиваются чаще, чем у животных с диким типом [4]. Кроме того, у мышей с мутацией гена *NFκB1* наблюдали склонность к хроническим воспалительным заболеваниям и повышенную восприимчивость к бактериальным инфекциям [5].

В исследовании [6] показано, что NFκB1 является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Таким образом, высокая экспрессия NFκB1 необходима для осуществления гибели клеток при повреждениях ДНК.

MyD88 (myeloid differentiation primary response gene (88)) — цитозольный адаптерный белок, участвующий в передаче сигнала от толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR) [7]. TLR2, TLR3 и TLR4 присутствуют на клетках меланомы человека и могут активировать белок MyD88 в ответ на воспалительные стимулы. Активация TLR на клетках меланомы человека индуцируется воспалительными факторами. Экспрессия мРНК MyD88 при этом повышается примерно в 8 раз [8].

p53, «страж генома», является фактором транскрипции, который может связываться с промоторными участками сотен генов, где он либо активирует, либо подавляет экспрессию генов [9]. Таким образом, p53 служит опухолевым супрессором, вызывая остановку клеточного цикла, апоптоз, старение и репарацию ДНК [10]. В нормальных клетках p53 часто не обнаруживается из-за быстрого убиквитинирования MDM2 и последующей протеасомной деградации [11]. Однако при повреждении ДНК и некоторых других стрессах, включая онкогенный стресс, количество p53 увеличивается из-за нарушения его деградации [12]. Примечательно, что инактивация p53 является одной из характеристик рака. Действительно, p53 обладает широким спектром типов мутаций, и примерно в половине всех опухолей p53 обнаруживается мутированным [13]. Еще одним механизмом ухудшения реакции p53 на онкогенный стресс может быть сверхэкспрессия MDM2 [14, 15]. Хотя мутация гена-супрессора опухоли p53 является общей чертой многих типов рака [16], мутационная инактивация p53 при меланоме встречается редко, а p53 дикого типа часто показывает высокие уровни экспрессии [17–19]. Кроме того, увеличение экспрессии p53 не является достаточным фактором для хорошего ответа на лечение меланомы [20]. Таким образом, можно предположить, что p53 дикого типа в меланоме не функционирует в качестве опухолевого супрессора [21].

К числу химиопрепаратов, применяемых для лечения метастатической меланомы, относятся и производные нитрозомочевины, в том числе араноза. Для лечения меланомы кожи зарегистрирована лекарственная форма аранозы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио). В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина создана новая лекарственная форма аранозы — липосомальная [22, 23]. В исследованиях было показано, что липосомальная араноза *in vitro* оказывает воздействие на клеточные линии, устойчивые к аранозе-лио [24]. Было обнаружено, что лекарственные формы аранозы по-разному воздействуют на клетки меланомы [25, 26].

Целью исследования было изучение воздействия лекарственных форм (липосомальной и аранозы-лио) препарата из класса нитрозомочевины аранозы на изменение экспрессии мРНК ключевых сигнальных белков опухолевых клеток.

Материалы и методы

Клеточные линии. Исследования проводили на 10 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии

опухолей НИИ ЭДнТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [27]. Клеточные линии различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций BRAF [28–30]. Клеточные линии mel Hn, mel 1br, mel II, mel Is несут мутацию BRAF; mel Cher, mel H, mel Gus, mel Bgf, mel Me, mel Mtp – имеют BRAF дикого типа. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ HEPES, 2 мМ 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. В исследовании использованы две лекарственных формы аранозы:

- «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 500 мг» (араноза-лио) производства филиала «Наукопрофи» НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина;
- липосомальная араноза, предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Кроме того, исследовали воздействие на клетки пустых липосом тех же состава и концентрации, которые использовались для липосомальной аранозы.

Клетки инкубировали с лекарственными формами аранозы в концентрации полумаксимального ингибирования (ИК₅₀) и пустыми липосомами 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 М NaCl, 1 М трис-НСl рН 8,0, 1 мМ этилендиаминтетраацетата) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов проводили по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [31]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоцианатного буфера (4 М тиоцианата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 % N-лаурилсаркозината натрия и 0,1 М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (рН 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (рН 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 с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропаноле проводили 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 кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг матричной РНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига применяли 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 (ПЦР) в реальном времени. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ β-меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нМ прямого, 250 нМ обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *p53*, *MDM2*, *NFkB1*, *NFkB2*, *MuD88*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

В каждом образце был исследован уровень экспрессии анализируемых генов. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DTLite («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 Hex. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [32]. Измерения уровня экспрессии проводили в 3 независимых повторах,

после чего для анализа было рассчитано среднее значение. В качестве положительного контроля использовали векторы рЕТ-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Статистический анализ данных. Для сравнения базового уровня экспрессии p53, MDM2, MyD88, NFkB1, NFkB2 между разными группами клеток линий меланомы, различающихся по наличию мутаций гена *BRAF*, применяли однофакторный дисперсионный анализ ANOVA. Для сравнения эффектов, оказываемых различными формами аранозы на уровень экспрессии p53, MDM2, MyD88, NFkB1, NFkB2, был использован критерий Уилкоксона для связанных выборок. Анализ был проведен в программе Statistica v. 7. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Изменение уровня экспрессии мРНК p53 и MDM2.

Перед изучением уровня экспрессии мРНК клеточные линии метастатической меланомы инкубировали 24 ч с исследуемыми препаратами: аранозой-лио (ИК₅₀), липосомальной аранозой (ИК₅₀), пустыми липосомами (<ИК₁₀), в качестве контроля использовали необработанные клетки.

Араноза-лио вызвала 2-кратное повышение экспрессии мРНК p53 по сравнению с необработанными клетками (рис. 1). Липосомальная араноза и пустые липосомы в данной точке измерения не оказали влияния на экспрессию мРНК p53. Однако когда клетки разделили по наличию или отсутствию мутации *BRAF*, оказалось, что данная тенденция свойственна для *BRAF*-положительных клеток (рис. 2, а). В клеточных линиях с *BRAF* дикого типа экспрессия p53 при воздействии аранозы практически не менялась (рис. 2, б).

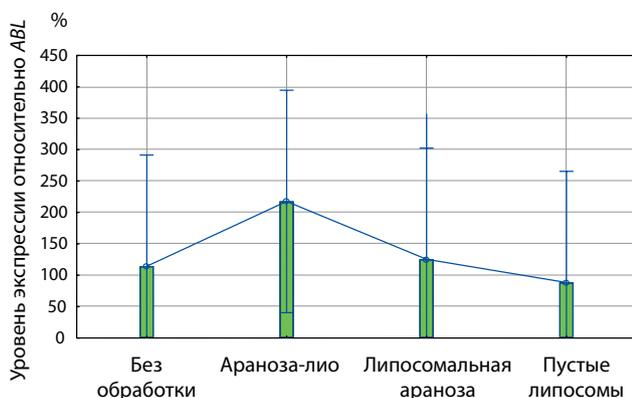


Рис. 1. Изменение уровня экспрессии мРНК p53 после воздействия исследуемыми препаратами

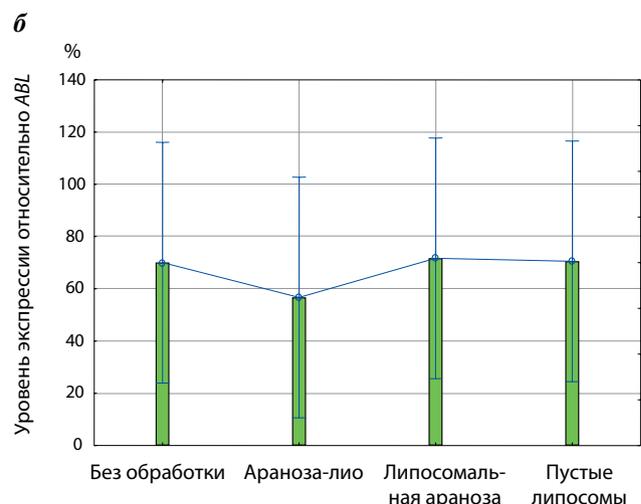
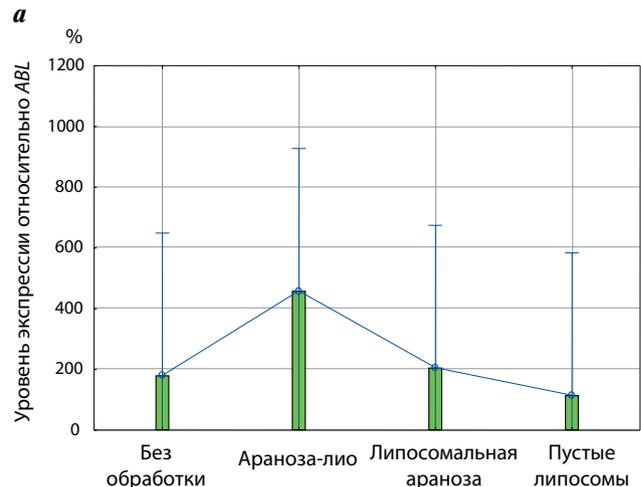


Рис. 2. Изменения уровня экспрессии мРНК p53 после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*: а – клеточные линии с мутацией *BRAF*; б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа

Изучили изменение уровня экспрессии мРНК MDM2, который обычно повышается вслед за p53. Мы увидели, что уровень экспрессии MDM2 повысился после инкубации со всеми исследуемыми лекарственными формами, а также с пустыми липосомами, но статистически значимо было только повышение после воздействия аранозы-лио ($p = 0,0013$) (рис. 3). Возможно, это говорит о том, что p53 уже повышался в клетках, обработанных липосомальной аранозой или пустыми липосомами, а к моменту, когда были сняты данные результаты, снизился.

При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* оказалось, что, в отличие от результатов по p53, в группе клеток с *BRAF* дикого типа уровень экспрессии мРНК MDM2 статистически значимо ($p = 0,0304$) повышался так же, как и в группе с *BRAF*-мутациями (рис. 4).

Существует много мнений по поводу причин повышенной экспрессии MDM2 в опухолевых

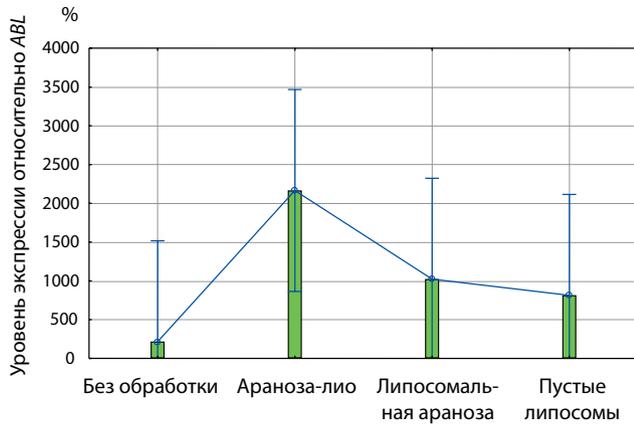


Рис. 3. Изменение уровня экспрессии мРНК MDM2 после воздействия исследуемыми препаратами

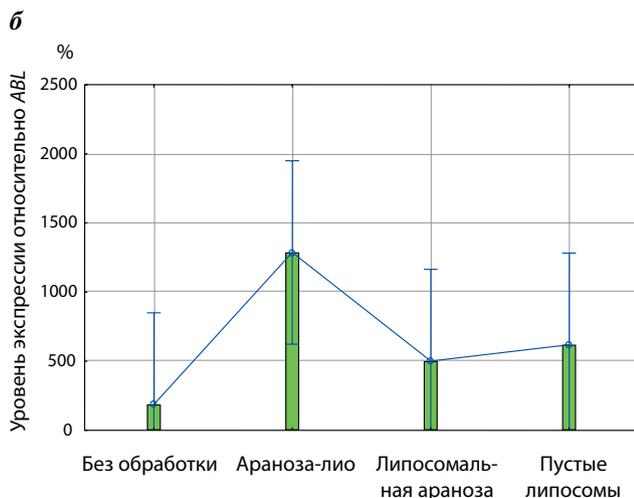
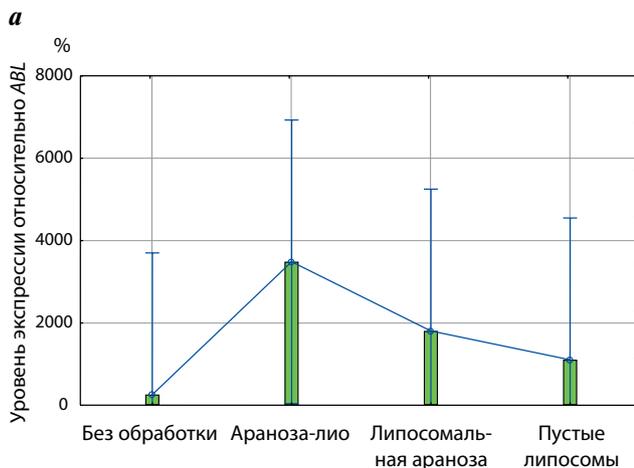


Рис. 4. Изменения уровня экспрессии мРНК MDM2 после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации BRAF: а – клеточные линии с мутацией BRAF; б – клеточные линии с BRAF дикого типа

клетках. Но в данном случае можно предположить, что p53 позитивно регулирует экспрессию MDM2.

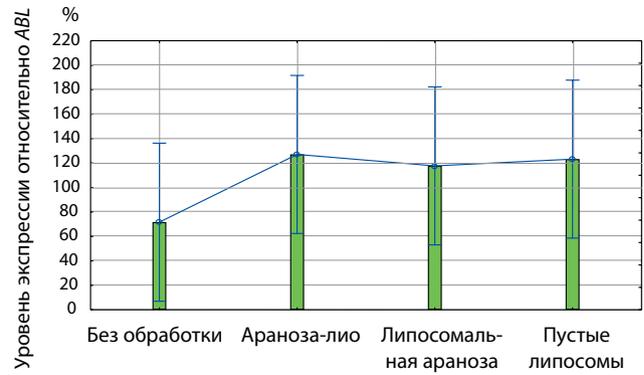


Рис. 5. Изменение уровня экспрессии мРНК MyD88 после воздействия исследуемыми препаратами

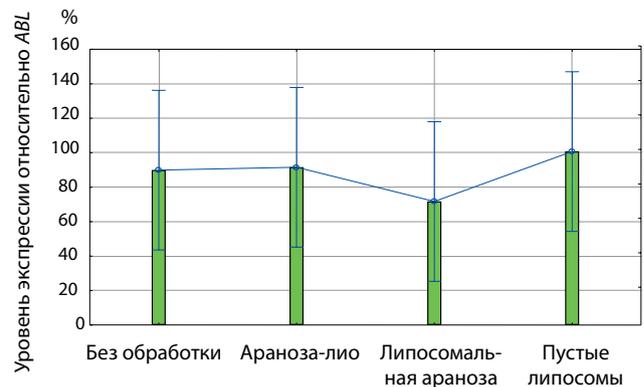


Рис. 6. Изменение уровня экспрессии мРНК NFkB2 после воздействия исследуемыми препаратами

Стоит отметить, что повышение MDM2 может способствовать резистентности к химиотерапии [33, 34].

Изменение уровня экспрессии мРНК MyD88, NFkB2 и NFkB1. На рис. 5 показано, что после воздействия лекарственных форм аранозы происходит небольшое повышение уровня экспрессии мРНК MyD88, которое говорит о том, что TLR задействованы слабо. Возможно, на них влияют компоненты умерших клеток.

Уровень экспрессии мРНК NFkB2 не сильно изменялся: снижался на 20 % после инкубации с липосомальной аранозой и повышался при воздействии пустых липосом (рис. 6).

Интересные данные получены при изучении изменения экспрессии мРНК NFkB1. Из рис. 7 видно, что липосомальная араноза вызывала многократное повышение уровня экспрессии NFkB1. В ряде исследований показано, что опухолевые клетки отличаются от нормальных пониженной экспрессией NFkB1, что помогает им в выживании [4]. В исследовании [6] было показано, что NFkB1 является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Известно, что действие аранозы как производного нитрозомочевины

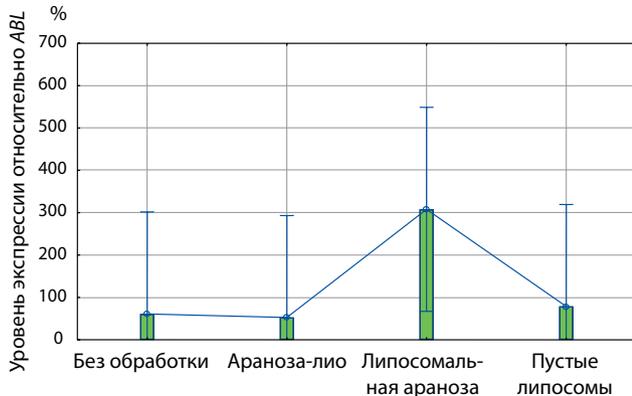


Рис. 7. Изменение уровня экспрессии мРНК NFκB1 после воздействия исследуемыми препаратами

реализуется через метилирование ДНК. В ответ на метилирование ДНК NFκB1 вызывает ингибирование экспрессии антиапоптотических генов, находящихся под контролем NFκB. Интересно, что мы наблюдаем эффект повышения экспрессии NFκB1 от липосомальной формы аранозы, а не от свободной

аранозы-лио. Возможно, этот аспект следует оценить в динамике. Можно предположить, что липосомальная форма позволяет доставить большее количество аранозы непосредственно в ядро клетки, где реализуется наблюдаемый нами эффект, тогда как араноза в свободной форме частично взаимодействует с белками цитоплазмы и в меньшем количестве доходит до ядра.

Заключение

Таким образом, из полученных результатов можно видеть, что 2 лекарственных формы аранозы — липосомальная и араноза-лио — оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии через повышение экспрессии мРНК MDM2. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК NFκB1 — фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(1):41–53.
- Шоуа И.Б., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. и др. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный Pgp170. *Российский биотерапевтический журнал* 2004;3(1):20–3.
- Cartwright T., Perkins N.D., L Wilson C. NFκB1: a suppressor of inflammation, ageing and cancer. *FEBS J* 2016;283(10):1812–22. DOI: 10.1111/febs.13627. PMID: 26663363.
- Voce D.J., Schmitt A.M., Uppal A. et al. Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor. *Oncogene* 2015;34(21):2807–13. DOI: 10.1038/onc.2014.211. PMID: 25043302.
- Ishikawa H., Claudio E., Dambach D. et al. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p) 105 precursor (NF-κappaB1) but expressing p50. *J Exp Med* 1998;187(7):985–96. PMID: 9529315.
- Schmitt A.M., Crawley C.D., Kang S. et al. p50 (NF-κB1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage. *Mol Cell* 2011;44(5):785–96. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.09.026. PMID: 22152481.
- Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42(2):145–51. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.006. PMID: 18304834.
- Goto Y., Arigami T., Kitago M. et al. Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. *Mol Cancer Ther* 2008;7(11):3642–53. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0582. PMID: 19001446.
- Копнин Б.П., Копнин П.Б., Хромова Н.В. и др. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухолевосупрессирующих и онкогенных активностей. *Клиническая онкогематология* 2008;1(1):2–9.
- Green D.R., Chipuk J.E. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell* 2006;126(1):30–2. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.032. PMID: 16839873.
- Blagosklonny M.V. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene* 1997;15(16):1889–93. DOI: 10.1038/sj.onc.1201374. PMID: 9365234.
- Lavin M.F., Gueven N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ* 2006;13(6):941–50. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401925. PMID: 16601750.
- Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biol Chem* 1999;380(7–8):879–87. DOI: 10.1515/BC.1999.108. PMID: 10494837.
- Houben R., Hesbacher S., Schmid C.P. et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PLoS One* 2011;6(7):e22096. DOI: 10.1371/journal.pone.0022096. PMID: 21760960.
- Michael D., Oren M. The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12(7):53–9. PMID: 11790555.
- Soussi T., Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):233–40. DOI: 10.1038/35106009. PMID: 11902578.
- Gwosdz C., Scheckenbach K., Lieven O. et al. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas. *Int J Cancer*

- 2006;118(3):577–82.
DOI: 10.1002/ijc.21366.
PMID: 16094622.
18. Sparrow L.E., Soong R., Dawkins H.J. et al. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas. *Melanoma Res* 1995;5(2):93–100. PMID: 7620345.
 19. Soto J.L., Cabrera C.M., Serrano S., López-Nevot M.A. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: *TP53*, *CDKN1A*, *CDKN2A*, and *CDKN2B*. *BMC Cancer* 2005;5:36.
DOI: 10.1186/1471-2407-5-36.
PMID: 15819981.
 20. Li W., Sanki A., Karim R.Z. et al. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma. *Pathology* 2006;38(4):287–301.
DOI: 10.1080/00313020600817951.
PMID: 16916716.
 21. Avery-Kiejda K.A., Bowden N.A., Croft A.J. et al. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. *BMC Cancer* 2011;11:203.
DOI: 10.1186/1471-2407-11-203.
PMID: 21615965.
 22. Козеев Г.С. Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата аранозы. Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М., 2013.
 23. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова С.А., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной липосомальной формы аранозы. Российский биотерапевтический журнал 2012;11(2):24.
 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.
 25. 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.
 26. Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Хоченкова Ю.А. и др. Липосомальная араноза не индуцирует аутофагию. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(1):15–8.
 27. 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.
 28. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена *B-RAF* на способность клеток меланомы к аутофагии. *Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи* 2013;3:68–72.
 29. Emelyanova M., Ghukasyan L., Abramov I. et al. Detection of BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 and MAP2K1/2 mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis. *Oncotarget* 2017;8:52304–20.
DOI: 10.18632/oncotarget.17014.
PMID: 28455977.
 30. 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.
 31. 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.
 32. 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.
 33. Hientz K., Mohr A., Bhakta-Guha D. et al. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy. *Oncotarget* 2017;8(5):8921–46.
DOI: 10.18632/oncotarget.13475.
PMID: 27888811.
 34. Buolamwini J.K., Addo J., Kamath S. et al. Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5(1):57–68.
DOI: 10.2174/1568009053332672.
PMID: 15720190.

ОБНАРУЖЕНИЕ ОНКОГЕНА E7 ВИРУСА ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА 16-ГО ТИПА В ОПЕРАЦИОННОМ МАТЕРИАЛЕ ОТ РОССИЙСКИХ БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Г.М. Волгарева*, В.Д. Ермилова*, А.В. Хачатурян, В.В. Татарский, Л.С. Павлова

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

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

Введение. Высокие показатели заболеваемости раком предстательной железы (РПЖ) и смертности от него, а также быстрое темпы роста этих показателей свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ и поиска способов его профилактики. Вопрос о возможной ассоциации РПЖ с онкогенными вирусами папилломы человека (ВПЧ) остается открытым.

Цель работы – изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в этих тканях онкогена E7 ВПЧ 16-го типа (ВПЧ16), основного типа ВПЧ, ответственного за возникновение рака шейки матки.

Материалы и методы. Протестированы методом полимеразной цепной реакции удаленные при радикальной простатэктомии ткани предстательной железы 17 больных РПЖ. Для лучшей сохранности ДНК использованы криоконсервированные (не подвергавшиеся обработке формалином и парафином) образцы опухолей. Свойственный РПЖ мультифокальный характер роста учли, применив метод микродиссекций для накопления однородных клеток (рака, дисплазии, нормального эпителия железы).

Результаты. ДНК онкогена E7 ВПЧ16 была обнаружена в материалах от 7 больных РПЖ из 17 обследованных, в том числе во всех 5 случаях, когда ДНК была выделена из гомогенных областей РПЖ.

Заключение. Полученные результаты позволяют предполагать, что ВПЧ16 нередко присутствует в предстательных железах российских больных РПЖ.

Ключевые слова: предстательная железа, рак, вирусы папилломы человека, профилактика

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-59-62

DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 ONCOGENE E7 IN SURGICAL MATERIALS FROM RUSSIAN PROSTATE CANCER PATIENTS

G.M. Volgareva, V.D. Ermilova, A.V. Khachaturyan, V.V. Tatarskiy, L.S. Pavlova

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

Introduction. High indices of prostate cancer (PC) incidence and mortality as well as high speed of growth of these figures testify to urgency of research into PC origin as well as means of its prophylaxis. The problem of possible PC association with oncogenic human papillomaviruses (HPV) is still being disputable.

Objective: to test whether surgical materials from PC patients in Russia harbour E7 oncogene of HPV type 16 (HPV16), the main HPV type responsible for cervical cancer.

Materials and methods. Prostate tissues excised in the course of radical prostatectomy from 17 PC patients were tested by polymerase chain reaction. For better DNA preservation cryopreserved tumor specimens not treated with either formalin or paraffin were used. The PC typical multifocal type of growth was taken into account by microdissecting of cryostate cuts to accumulate homogeneous cells (cancerous, dysplastic or normal).

Results. HPV16 E7 was registered in prostate tissues of 7 patients out of 17 examined including all those 5 cases for which DNA had been isolated from homogeneous sites of cancer cells.

Conclusion. The result obtained enables one to admit that HPV16 may be harbored in prostates of Russian PC patients not infrequently.

Key words: prostate, cancer, human papillomaviruses, prophylaxis

* Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) в мире занимает 2-е место среди злокачественных опухолей у мужчин [1]. Полного понимания причин возникновения РПЖ пока нет. Высокие показатели заболеваемости и смертности, а также быстрые темпы роста этих показателей свидетельствуют о важности изучения природы РПЖ и поиска способов его профилактики.

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

Что касается РШМ, то для этой формы рака известно, что злокачественное превращение эпителиальной клетки осуществляется после длительной вирусной инфекции под воздействием белковых продуктов 2 генов онкогенных ВПЧ: *E6* и *E7*. Основным среди онкогенных ВПЧ, иначе именуемых ВПЧ типов высокого онкогенного риска, ответственным за возникновение более чем 50 % случаев РШМ, является ВПЧ 16-го типа (ВПЧ16) [2, 3].

Цель работы – изучить хирургически удаленные у больных РПЖ ткани предстательной железы на предмет присутствия в этих тканях онкогена *E7* ВПЧ16, основного типа ВПЧ, ответственного за возникновение РШМ.

Материалы и методы

Работу провели на предстательных железах, удаленных при радикальной простатэктомии у 17 больных РПЖ, проходивших лечение в урологическом отделении НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Для лучшей сохранности нуклеиновых кислот образцы тканей удаленных желез после вырезки криоконсервировали (не подвергали обработке формалином и парафином). Учитывая характерный для РПЖ мультицентрический рост опухоли, патологически измененные области железы морфолог на 1-м этапе выделял при вырезке макроскопически; в дальнейшем на криостатных срезах был использован метод микродиссекций с параллельным микроскопическим анализом материала, из которого выделяли ДНК. Возраст больных, уровень простатспецифического антигена в сыворотке крови, индекс Глисона (по результатам предварительной биопсии опухоли), а также стадия опухоли по системе TNM представлены в таблице.

Патологически измененные участки железы вырезали не позднее 1–2 ч после операции, затем фрагмент ткани с макроскопически видимой патологией,

предназначенный для детекции ВПЧ, помещали в морозильную камеру (-70°C). Микродиссекцию криостатных срезов и выделение ДНК проводили с помощью протеиназы К в соответствии с процедурой, описанной Z. Guo и соавт. [4]. Из фрагмента ткани предстательной железы, отобранного морфологом, с помощью криостата готовили 2 серийных среза толщиной 5 мкм. Один из них окрашивали гематоксилином и эозином и использовали в дальнейшем для микроскопического распознавания участков дисплазий, РПЖ и нормального эпителия. Соответствующие обозначения наносили непосредственно на покровные стекла этих препаратов. Второй препарат не окрашивали, его использовали для проведения микродиссекции, которую выполняли под лупой, каждый раз меняя скальпель во избежание контаминации. В подавляющем большинстве случаев провели микродиссекцию 1 участка с препарата, исключение составил больной № 1, для которого представилось возможным выделить ДНК из 2 областей, соответствующих слабой и тяжелой простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) – ПИН I и ПИН III соответственно. Собранные клетки инкубировали в буферном растворе (0,01 М трис-НСl pH 8,0; 0,001 М этилендиаминтетраацетат; 0,5 % Tween 20), содержащем 500 мкг/мл протеиназы К, при 55°C в течение ночи, после чего фермент инактивировали, нагревая смесь 10 мин при 95°C .

Успешность выделения ДНК контролировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к гену «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Использовали следующие праймеры: прямой ($5'$ -ACCACAGTCCATGCCATCAC- $3'$) и обратный ($5'$ -TCCACCACCTGTGGCTGTA- $3'$). Длина ПЦР-продукта составляла 450 пар оснований (п. о.). Режим реакции был следующим: 94°C – 5 мин, 94°C – 30 с (28 циклов), 58°C – 30 с, 72°C – 60 с, заключительная элонгация при 72°C – 2 мин. Детекцию ВПЧ16 проводили в ПЦР с типоспецифическими праймерами к онкогену *E7* вируса: прямым ($5'$ -CGGACAGAGCCCATTACAAT- $3'$) и обратным ($5'$ -GAACAGATGGGGCACACAAT- $3'$). Длина ПЦР-продукта составляла 144 п. о. Режим реакции был следующим: 94°C – 4 мин, 94°C – 30 с (35 циклов), 58°C – 30 с, 72°C – 90 с, заключительная элонгация при 72°C – 6 мин.

При постановке ПЦР положительным контролем служил вариант, содержащий ДНК, выделенную из клинического образца ВПЧ16-положительного РШМ; отрицательным контролем служила реакционная смесь для ПЦР, не содержащая ДНК. Результаты учитывали только в случае получения адекватных данных в положительном и отрицательном контролях.

Разделение ДНК проводили в горизонтальном агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии бромистого этидия. Продукты амплификации *GAPDH*

Данные о больных РПЖ и результаты детекции онкогена E7 ВПЧ16 в тканях удаленных у них предстательных желез

№	Возраст, лет	Стадия TNM	Уровень простат-специфического антигена в сыворотке крови	Индекс Глисона в материале предоперационной биопсии	Гистологическое заключение об операционном материале	Гистологическое заключение о криостатном препарате, с которого выделяли ДНК	Результат детекции онкогена E7 ВПЧ16
1	52	T2N0M0	5,9	7	Мелкоацинарный рак	ПИН I	+
						ПИН III	+
2	60	T2N0M0	8,1	7	Умеренно-дифференцированная аденокарцинома	ПИН III	–
3	56	T2N0M0	9,3	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	–
4	64	T2N0M0	5,2	7	Мелкоацинарный рак	ПИН III	–
5	52	T2N0M0	42,0	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	–
6	63	T2N0M0	4,7	6	Мелкоацинарный рак	Рак	+
7	63	T2N0M0	6,0	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	–
8	66	T2N0M0	12,6	6	Мелкоацинарный рак	Рак	+
9	63	T3N0M0	4,9	6	Мелкоацинарный рак	ПИН III	–
10	68	T2N0M0	42,0	7	Мелкоацинарный рак	Рак	+
11	69	T2N0M0	32,8	7	Мелкоацинарный рак	Рак	+
12	67	T2N0M0	8,4	6	Мелкоацинарный рак	Нормальная ткань	–
13	58	T2NxM0	22,8	8	Мелкоацинарный рак	Аденоз	+
14	55	T3N0M0	34,0	7	Элементов опухоли не обнаружено; лечебный патоморфоз рака	Нормальная ткань	–
15	68	T2N0M0	5,5	7	Мелкоацинарный рак	Доброкачественная гиперплазия	–
16	63	T2N0M0	8,4	8	Мелкоацинарный рак	Доброкачественная гиперплазия	–
17	65	T2N0M0	4,6	7	Мелкоацинарный рак	Рак	+

разделяли в 1,5 % агарозном геле, продукты амплификации E7 ВПЧ16 в 2 % агарозном геле. Бромистый этидий вносили в раствор агарозы при 50 °С до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Для определения размеров продуктов использовали ДНК-маркер с шагом 100 п. о.

При проведении микродиссекций использовали протеиназу К «Хеликон» (Россия). Праймеры были синтезированы в компании «Литех» (Россия). При постановке ПЦР использовали смесь нуклеотидов и DreamTaq™ буфер Fermentas (Латвия), а также Taq ДНК-полимеразу и готовую смесь для ПЦР Screen-Mix (оба реагента производства «Евроген», Россия). Для выявления продуктов амплификации в электрофорезе использовали агарозу, трис-ацетатный буфер и бромид этидия «ПанЭко» (Россия), а также маркер длин фрагментов ДНК (100+ bp DNA Ladder) «Евроген» (Россия). ПЦР проводили на приборе «Терцик» («ДНК-технологии», Россия), результаты электро-

фореза ПЦР-продуктов анализировали и фотографировали на аппарате Image Quant Las 4000 (GE Healthcare, США).

Результаты и обсуждение

При гистологическом исследовании операционного материала наличие раковой опухоли в предстательной железе было подтверждено для 16 из 17 больных (см. таблицу). Во всех этих случаях, кроме одного, был выявлен мелкоацинарный рак, а у 1 пациента (№ 2) – умеренно-дифференцированная аденокарцинома. В ткани предстательной железы больного № 14 элементов опухоли обнаружено не было; здесь имелись обширные поля фиброза, скудные лимфоидные инфильтраты, единичные атрофичные протоки, – картина соответствовала полному лечебному патоморфозу рака.

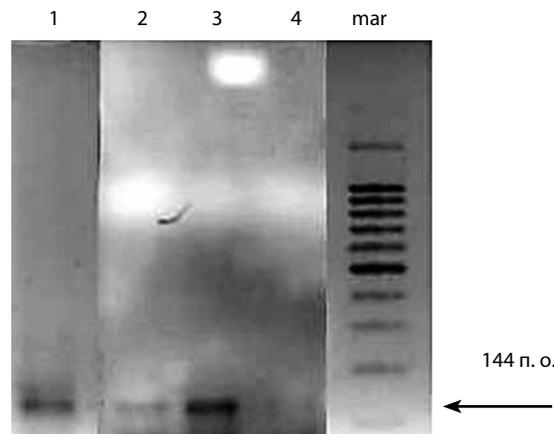
Результаты гистологического анализа препаратов, служивших ориентиром для последующих

микродиссекций, представлены в таблице. Гомогенные участки раковой ткани присутствовали на криостатных срезах в 5 случаях (пациенты №№ 6, 8, 10, 11 и 17). На 7 препаратах (от больных №№ 1–5, 7 и 9) была отмечена ПИН, причем в материале от больного № 1 присутствовали и слабая (ПИН I), и тяжелая (ПИН III) неоплазии. В остальных случаях микродиссекции провели на участках нормальной ткани (больные №№ 12 и 14), доброкачественной гиперплазии (больные №№ 15 и 16) и аденоза (больной № 13).

Тестирование в ПЦР позволило обнаружить присутствие ДНК E7 ВПЧ16 в лизатах, полученных с препаратов от 7 из 17 обследованных больных (см. таблицу). Положительным оказался результат при тестировании всех 5 случаев рака, а также обеих ПИН, присутствовавших на препарате от больного № 1 (см. рисунок).

В связи с результатами, полученными в настоящей работе, уместно упомянуть данные V. Smelov и соавт.: при скрининге выборки здоровых российских мужчин в ПЦР на присутствие в их мочеполовой системе ВПЧ эти авторы обнаружили, что 42 % из обследованных были позитивными по ВПЧ типов высокого онкогенного риска [5].

Длительное время предметом исследований и дискуссий остаются вопросы о возможной роли онкогенных ВПЧ при таких распространенных формах рака, как рак легкого [6] и рак молочной железы [7]. Впервые на группе российских больных РПЖ нами получены результаты, которые свидетельствуют о возможном вовлечении ВПЧ16 в генез и этой очень распространенной формы злокачественных новообразований. В работе впервые использованы криоконсервированные, не подвергавшиеся обработке формалином и парафином образцы опухолей, что способствовало лучшей сохранности ДНК. Для выяснения возможной ассоциации РПЖ с ВПЧ нами впервые был применен метод микродиссекций,



Анализ продуктов амплификации с использованием E7 ВПЧ16-специфичных праймеров: электрофореграмма после окрашивания бромидом этидия. Цифры над электрофореграммой соответствуют номерам образцов: 1 – ВПЧ16-положительный РШМ (положительный контроль); 2 – ПИН I больного № 1; 3 – ПИН III больного № 1; 4 – отрицательный контроль

что позволило выделить ДНК из однородных клеточных популяций. Представленные данные важны для выяснения этиологии и разработки мер профилактики РПЖ.

Заключение

Онкоген E7 ВПЧ16 обнаружен в тканях удаленных у больных РПЖ предстательных желез в 7 случаях из 17, в том числе во всех 5 случаях, когда ДНК-матрицу для ПЦР выделили из однородных областей, представленных раковыми клетками. Полученные результаты позволяют предполагать, что ВПЧ16, основной тип вируса, ответственный за развитие РШМ, нередко присутствует в предстательных железах российских больных РПЖ. Возможное участие онкогенных ВПЧ в генезе РПЖ заслуживает 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. PMID: 26667886.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):342–50. DOI: 10.1038/nrc798. PMID: 12044010.
- zur Hausen H. Papillomaviruses – to vaccination and beyond. *Biochemistry (Mosc)* 2008;73(5):498–503. PMID: 18605974.
- Guo Z., Wu F., Asplund A. et al. Analysis of intratumoral heterogeneity of chromosome 3p deletions and genetic evidence of polyclonal origin of cervical squamous carcinoma. *Mod Pathol* 2001;14(2):54–61. DOI: 10.1038/modpathol.3880256. PMID: 11235906.
- 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):e66630. DOI: 10/1371/journal.pone.0066630. PMID: 23799125.
- Ragin C., Obikoya-Malomo M., Kim S. et al. HPV-associated lung cancers: an international pooled analysis. *Carcinogenesis* 2014;35(6):1267–75. DOI: 10.1093/carcin/bgu038. PMID: 24523449.
- de Villiers E.M., Sandstrom R.E., zur Hausen H., Buck C.E. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R1–11. DOI: 10.1186/bcr940. PMID: 15642157.

СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ГАСТРИНА

Л.П. Сушинина, А.П. Смирнова, С.В. Устинкина, Л.И. Смирнова, Т.А. Сидорова, М.П. Киселева, Л.М. Борисова, З.С. Шпрах

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

Контакты: Людмила Ивановна Смирнова chemlab@ronc.ru

Введение. Работа посвящена поиску новых соединений с высокой избирательностью противоопухолевого действия на опухоли желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) в ряду аналогов пептидного гормона гастрин.

Цель исследования – синтез 2 аналогов гастрин, 1 из которых содержит цитотоксическую группу; изучение их цитотоксической и противоопухолевой активности.

Материалы и методы. Синтез пептидов осуществляли классическими методами пептидной химии. Цитотоксическую активность изучали на культуре клеток линии HCT116. Противоопухолевую активность аналогов гастрин оценивали на моделях перевиваемых опухолей мышей: аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ.

Результаты. Синтезированы 2 аналога гастрин (октапептиды), 1 из которых содержит цитотоксическую группу. Обнаружена цитотоксическая активность аналога гастрин, в химической структуре которого присутствует цитотоксическая группа. Изучена противоопухолевая активность 2 аналогов гастрин на перевиваемых опухолях ЖКТ мышей: АКАТОЛ и АКАТОН. Установлена противоопухолевая активность цитотоксического и нецитотоксического аналогов гастрин на аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН: 74 и 84 % торможения роста опухоли соответственно. На аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ исследованные аналоги гастрин противоопухолевого действия не показали.

Выводы. Терапевтический эффект 2 аналогов гастрин на аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН, вероятно, связан с экспрессией рецепторов гастрин CCK2 в этой опухоли.

Ключевые слова: аналоги гастрин, синтетические пептиды, цитотоксическая активность, противоопухолевая активность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-63-68

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF MODIFIED GASTRIN FRAGMENTS

L.P. Sushinina, A.P. Smirnova, S.V. Ustinkina, L.I. Smirnova, T.A. Sidorova, M.P. Kiseleva, L.M. Borisova, Z.S. Shprakh

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

Background. The purpose of this investigation is the search of new compounds with high selectivity of antitumor action on the tumor of the gastrointestinal tract (GIT) in the series of analogues of the peptide hormone gastrin.

Objective: synthesis of 2 analogues of gastrin, 1 of which contains the cytotoxic group, the study of their cytotoxic and antitumor activity.

Materials and methods. Synthesis of peptides was carried out by classical methods of peptide chemistry. Cytotoxic activity was studied on the cell culture HCT116. Antitumor activity of analogues of gastrin were studied on transplanted tumors of the GIT of mice AKATOL and AKATON.

Results. Two analogues of gastrin (octapeptide) were synthesized, 1 of which contains a cytotoxic group. Analogue containing cytotoxic group revealed the cytotoxic activity. Antitumor activity of two analogues of gastrin were studied on transplanted tumors of the GIT of mice AKATOL and AKATON. The cytotoxic and non-cytotoxic analogues of gastrin showed antitumor activity only on AKATON. Inhibition of tumor growth is 74 and 84 %, respectively.

Conclusions. The therapeutic effect of two analogues of gastrin on adenocarcinoma AKATON, probably, is associated with the expression of gastrin receptors CCK2 in this tumor.

Key words: gastrin analogues, synthetic peptides, cytotoxic activity, antitumor activity

Введение

Работа направлена на поиск новых соединений в ряду аналогов пептидного гормона гастрин с высокой избирательностью противоопухолевого дей-

ствия на опухоли желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Актуальность поиска определяется отсутствием в клинической практике препаратов с избирательным

действием на опухоли ЖКТ, плохо поддающиеся лекарственной терапии. Открытие рецепторов гастринина в опухолях ЖКТ также оправдывает направление поиска.

Биологические эффекты гастринина реализуются через 2 типа рецепторов, принадлежащих к семейству холецистокининовых рецепторов: ССК1 и ССК2, которые идентифицированы и клонированы [1, 2]. Рецептор ССК2 взаимодействует с фрагментами гастринина, чем и обусловлен биологический эффект С-концевых коротких фрагментов гастринина [3].

Данные о том, что гастрин и его аналоги стимулируют рост нормальных и опухолевых клеток, привели к исследованию его роли в развитии опухолей [4, 5]. Были синтезированы модифицированные С-концевые аналоги гастринина, способные подавлять индуцированную нативным гастринином секрецию соляной кислоты и проявлять свойства антагонистов гастринина [6, 7]. Некоторые антагонисты гастринина были использованы при лечении рака желудка [7]. Этот эффект также реализовывался через рецепторы ССК2.

Возможно, что высокие избирательность и сродство, характеризующие взаимодействие полипептидного гормона с его рецептором, могут быть использованы при разработке противоопухолевых лекарств при условии, что опухоли-мишени содержат рецепторы этого гормона. При этом цитотоксические агенты могут конъюгироваться с пептидом. Этот подход был использован для получения цитотоксических аналогов пептидных гормонов люлиберина и соматостатина [8].

Адресная доставка цитотоксических агентов к опухолям и метастазам при помощи различных носителей позволяет увеличивать их дозу, снижать токсичность и улучшать результаты лечения [9].

Нативный гастринин имеет в своем составе 17 аминокислот:

1 2 3 4 5 6–10 11 12 13 14 15 16 17
 Pyl-Gly-Pro-Trp-Met-(Glu)5-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Наименьшим фрагментом, сохраняющим специфическую активность молекулы гастринина, является С-концевой тетрапептид с последовательностью 14–17. Сродство к рецепторам аналогов гастринина увеличивается по мере удлинения аминокислотной последовательности. Мы остановили свой выбор на последовательности гастринина 10–17 с целью ее модификации и дальнейшего использования в качестве носителя цитотоксической группы.

Нативные фрагменты С-концевого гастринина модифицировали следующим образом: Met15 заменили на Leu15 для предотвращения окисления, а Gly13 на Pro13 для стабилизации конформации, которая предпочтительна для рецепторов ССК2, так как ра-

нее продемонстрировано, что такое замещение увеличивает биологическую активность [10, 11]. С-концевой фенилаланин оставили без замены, так как показана необходимость его наличия в структуре лиганда для связывания с рецепторами ССК2 человека [12].

В качестве цитотоксического агента использовали п-ди (2-хлорэтил) аминифенилуксусную кислоту (ClPhe). Цитотоксическая группа алкилирующего типа п-ди (2-хлорэтиламин) была использована при создании высокоактивных противоопухолевых препаратов сарколизин и цифелин [13, 14].

Цитотоксические агенты в силу их гидролитической неустойчивости включали на последней стадии синтеза на N-конце, где они не предотвращают взаимодействие пептидного носителя с рецептором мишени.

Синтезированные аналоги гастринина, 1 из которых содержит цитотоксическую группу, исследованы на цитотоксическую и противоопухолевую активности.

Материалы и методы

Синтез. Синтез пептидов осуществляли классическими методами пептидной химии в условиях, сводящих возможность рацемизации отдельных аминокислот к минимуму. Ключевые стадии стыковки фрагментов осуществляли азидным методом. При синтезе фрагментов использовали метод смешанных ангидридов и метод активированных эфиров.

Выбор защитных групп определялся требованием сведения к минимуму нежелательных побочных реакций при удалении N^α-защитных группировок на промежуточных стадиях синтеза.

Для защиты α-аминогрупп на всех стадиях синтеза применяли трет-бутилоксикарбонильную группу (Boc). Карбоксильные группы С-концевых аминокислотных остатков фрагментов (11–13) защищали этерификацией (метилловые эфиры). Для защиты реакционноспособных групп в боковых цепях трифункциональных аминокислот использовали бензильную защиту (Bzl) гидроксильной группы в остатке Tyr12 и b-карбоксила в остатке Asp16.

Для удаления бензильных защитных групп боковых цепей тирозина и аспарагиновой кислоты использовали метод каталитического гидрогенолиза в присутствии палладиевой черни. Трет-бутилоксикарбонильную группу удаляли ацидолизом [14].

Для очистки и выделения защищенных пептидов использовали колоночную хроматографию на силикагеле.

Для тонкослойной хроматографии пептидов применяли пластинки с тонким слоем силикагеля, используя следующие системы растворителей: хлороформ–метанол (5:2); n-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1).

Температуру плавления определяли на анализаторе температуры плавления с цифровым термометром (Sanyo Gallenkamp, Япония).

Удельное вращение измеряли на поляриметре Unipol L (Schmidt + Haensch, Германия).

Чистоту полученных соединений и содержание примесей определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографе Shimadzu. Колонка: Reprosil-Pur Basic C18, 5 мкм, 250 × 4,6 мм. Условия: линейный градиент АВ – 5 % В (0 мин) – 100 % В (20 мин). А – 0,01 % трифторуксусная кислота в воде, В – 0,01 % трифторуксусная кислота в ацетонитриле.

Цитотоксическая активность. Вещества растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) (100 %), концентрация веществ в исходных растворах была 5×10^{-33} М.

Для тестирования цитотоксической активности использовали культуру клеток аденокарциномы кишечника человека линии НСТ116, в которых, согласно данным литературы, экспрессируются рецепторы гастринина. Для определения цитотоксической активности исследуемых веществ использовали МТТ-тест. В качестве количественного критерия цитотоксичности тестируемых препаратов был использован индекс IC_{50} – концентрация соединений, вызывающая гибель 50 % клеток в течение 72–96 ч инкубации. За 100 % принимали выживаемость клеток, инкубированных без препаратов (контроль).

Противоопухолевая активность. Исследование противоопухолевой активности аналогов гастринина проводили на мышах-самках линии BALB/c массой 18–20 г, полученных из разведения экспериментально-биологической лаборатории (вивария) НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Все животные были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества о состоянии здоровья.

Мышей содержали в специальных просторных клетках по 5 особей при температуре воздуха 20–23 °С и относительной влажности 60–65 % в условиях естественного освещения и принудительной вентиляции на подстилке из древесных стружек, стерилизованных в сухожаровом шкафу. Для кормления животных использовали стандартный промышленный и сертифицированный брикетированный корм для грызунов с установленным сроком годности. Кормление проводили в одно и то же время. Сырую питьевую воду, помещенную в закрытые поилки, мыши получали в неограниченном количестве. Для питья использовали поилки на 250 мл с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре.

Перед лечением мышей распределяли по группам. Число животных в контрольной группе составляло 10, в опытных группах было по 8 мышей. Наблюдение за животными проводили до их гибели.

Оценку противоопухолевой активности синтезированных аналогов гастринина проводили на моделях перевиваемых опухолей мышей: аденокарциноме тонкой кишки АКАТОН и аденокарциноме толстой кишки АКАТОЛ. Опухоль АКАТОЛ выбрана в качестве модели сравнения, так как предполагается, что в этой опухоли рецепторы гастринина ССК2, через которые работают аналоги гастринина, недостаточно или они отсутствуют. Известно, что рецепторы к гастрину имеют в тонкой кишке и поджелудочной железе [15].

АКАТОЛ и АКАТОН трансплантировали животным подкожно по стандартной методике. При перевивке опухолевую ткань измельчали ножницами до гомогенной консистенции, добавляли среду 199 до соотношения 1:10 и 0,5 мл полученной суспензии (около 50 мг опухолевых клеток) вводили подкожно в область правой подмышечной впадины. Лечение начинали через 48 ч после трансплантации опухоли [16, 17].

ПГ-132 и ПГ-131 растворяли в ДМСО и разводили физиологическим раствором до 10 % концентрации ДМСО.

Синтезированные аналоги гастринина изучали при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней. Аналог ПГ-132, содержащий цитотоксическую группу (хлорфенацил), исследовали в дозах 5, 10 и 20 мг/кг. Нецитотоксический аналог ПГ-131 вводили в дозах 3,9; 7,9 и 15,8 мг/кг, эквивалентных дозам ПГ-132 по содержанию аминокислот.

Противоопухолевый эффект во всех исследованиях оценивали по следующим критериям: торможение роста опухоли (ТРО, %) и увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) леченых животных по сравнению с контрольными.

ТРО вычисляли по формуле

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

где V_k и V_o – средний объем опухолей (мм³) в контрольной и опытной группах соответственно.

УПЖ вычисляли по формуле

$$УПЖ = (СПЖ_o - СПЖ_k) / СПЖ_k \times 100 \%,$$

где СПЖ_к и СПЖ_о – средняя продолжительность жизни животных (дни) в контрольной и опытной группах соответственно.

Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 % [16, 17].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием доверительных интервалов средних сравниваемых величин по стандартному методу Стьюдента. Для оценки достоверности различий определяли t-критерий, значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Синтез пептидов осуществляли классическими методами пептидной химии по схеме, представленной на рисунке.

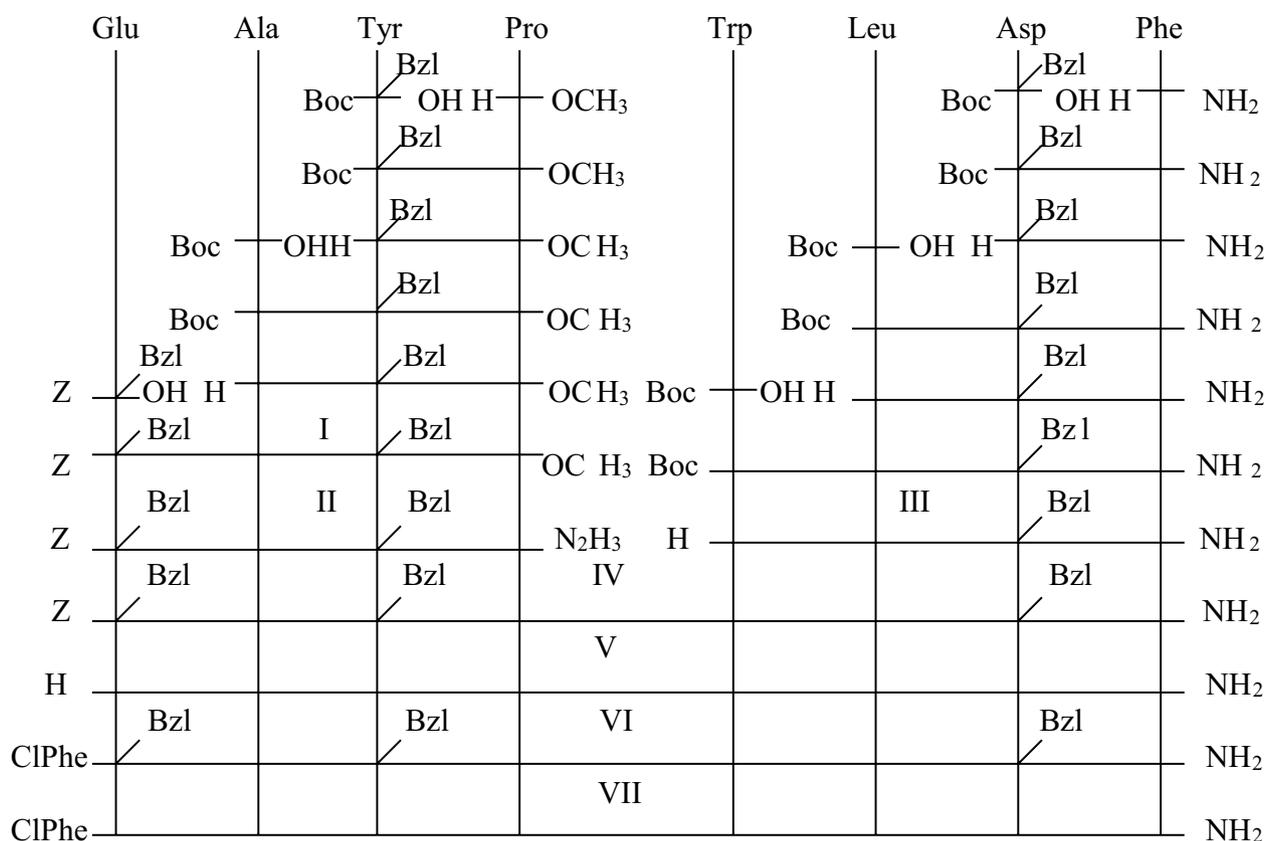
При синтезе фрагментов (10–13) и (14–17) использовали метод ступенчатого наращивания пептидной цепи на 1 аминокислотный остаток методом смешанных ангидридов. При синтезе фрагмента (10–13) исходными веществами являлись метиловый эфир пролина, *p*-нитрофениловый эфир N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-*O*-бензил-тирозина и N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-аланин. Полученный защищенный тетрапептидгидразид (II) далее превращали в защищенный тетрапептид (III).

При синтезе фрагмента (14–17) исходными веществами были амид фенилаланина, N^{α} -трет-бутилоксикарбонил- β -бензил-аспарагиновая кислота, N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-лейцин и N^{α} -трет-бутилоксикарбонил-триптофан. Путем постепенного наращивания пептидной цепи, начиная с амида фенилаланина, методом смешанных ангидридов получили тетрапептид (III).

В результате азидной конденсации защищенных тетрапептидов (II и III) получили защищенный октапептид (IV). Очистку пептида проводили с использованием колоночной хроматографии на силикагеле. Выделенный после очистки октапептид подвергали удалению защитных групп каталитическим гидрированием.

Присутствие остатка триптофана в положении 14 в пептидах также наложило определенные ограничения на условия удаления защитных групп каталитическим гидрированием. В результате исследований подобраны условия для удаления бензильных групп тирозина и аспарагиновой кислоты. Защищенный пептид (IV) подвергали каталитическому гидрированию в присутствии палладиевой черни в растворе диметилформамида (ДМФА) в течение 4 ч. Выделение синтезированных пептидов после гидрирования проводили концентрированием растворов в вакууме.

В результате получили октапептид со свободными функциональными группами (V) – амид глутамилаланилтирозилпролилтриптофиллейциласпартилфенилаланина



10 11 12 13 14 15 16 17

(V) H-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-131)

(VII) ClPhe*-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-132)

Схема синтеза аналогов гастрина. ClPhe – хлорфенил ($(ClCH_2-CH_2)_2-N-C_6H_4-CH_2-CO-$)

H-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-131),

R_f 0,2 (хлороформ–метанол (5:2)); R_f 0,75 (бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1)); [α]_D – 32° (C = 1, ДМФА); содержание основного вещества 97,0 % (ВЭЖХ).

Цитотоксический аналог гастринина получили по аналогичной схеме.

В результате азидной конденсации защищенного тетрапептида CIPhe-Glu(Bzl)-Ala-Tyr(Bzl)-Pro-N₂H₃ и ранее синтезированного тетрапептида (III) был получен защищенный октапептид с цитотоксической группой на N-конце (VI).

Пептид (VI) подвергали каталитическому гидрированию в присутствии палладиевой черни в растворе ДМФА в течение 4 ч. Полученный пептид подвергали очистке на колонке с силикагелем в градиенте хлороформ–метанол. В результате получен цитотоксический аналог гастринина со свободными функциональными группами (VII) – амид п-ди(2-хлорэтил)аминофенилацетилглутамилаланилтирозилпролилтриптофиллейциласпартилфенилаланила

CIPhe-Glu-Ala-Tyr-Pro-Trp-Leu-Asp-Phe-NH₂ (ПГ-132),

C₆₄H₇₉C₁₂N₁₁O₁₄; вычислено, %: Cl 5,47; найдено, %: Cl 6,1; R_f 0,12 (хлороформ–метанол (5:2)); R_f 0,65 (бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:1)); содержание основного вещества 96,0 % (ВЭЖХ).

Цитотоксическая активность. В предварительных экспериментах была выбрана величина исходной плотности посева клеток аденокарциномы человека линии НСТ116, позволяющая культивировать их в течение 72–96 ч в 96-луночных планшетах. Такому критерию соответствовала плотность посева 3×10^3 клеток/100 мкл среды/луночку. При исследовании цитотоксической активности веществ ПГ-131 и ПГ-132 было выявлено, что пролиферативная активность клеток аденокарциномы человека линии НСТ116 изменяется при их длительной инкубации (96 ч) с аналогами гастринина. При этом активность аналога, содержащего цитотоксическую группу (ПГ-132), была выше. При максимально возможной в экспериментах *in vitro* концентрации веществ (5×10^{-5} М) из-за их умеренной растворимости в среде жизнеспособность клеток в присутствии ПГ-132 снижалась на 40 %, в этих же условиях в присутствии ПГ-131 рост клеток замедлялся лишь на 15 %. Снижение концентрации сыворотки в среде инкубации до 1 % не повлияло на цитотоксическую активность исследуемых веществ.

Таким образом, исследование цитотоксической активности аналогов гастринина ПГ-131 и ПГ-132 на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека линии НСТ116 показало, что аналог, в химиче-

ской структуре которого присутствует цитотоксическая группа, оказался активным.

Противоопухолевая активность. Сравнительную оценку противоопухолевой активности синтезированных аналогов гастринина проводили на перевиваемых опухолях ЖКТ мышей АКАТОЛ и АКАТОН, обладающих разным рецепторным статусом к аналогам гастринина.

Данные, представленные в табл. 1, показывают, что оба аналога гастринина оказались неэффективными на аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ, что связано с недостаточным количеством рецепторов гастринина ССК2 в этой опухоли.

Изучение действия аналогов гастринина было продолжено на аденокарциноме тонкой кишки мышей АКАТОН, экспрессирующей рецепторы к гастрину. Как видно из табл. 2, оба аналога гастринина (ПГ-132

Таблица 1. Противоопухолевая активность аналогов гастринина на аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ

Аналог гастринина	Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %, после окончания лечения			
			1-й день	7-й день	10-й день	16-й день
ПГ-132	5	2–6	3	8	7	7
	10	2–6	12	22	4	+7
	20	2–6	+27**	10	4	+11
ПГ-131	3,9*	2–6	+13	14	0	8
	7,9	2–6	31	6	+4	+11
	15,8	2–6	+14	21	14	12

*Доза 3,9 мг/кг эквивалентна дозе 5 мг/кг по содержанию аминокислот;

**знак «+» означает стимуляцию роста опухоли.

Таблица 2. Противоопухолевая активность аналогов гастринина на аденокарциноме тонкой кишки мышей АКАТОН

Аналог гастринина	Доза, мг/кг	Дни введения	ТРО, %, после окончания лечения			УПЖ, %
			1-й день	7-й день	11-й день	
ПГ-132	5	2–6	74*	27	3	13
	10	2–6	60*	18	5	18
	20	2–6	70*	23	3	13
ПГ-131	3,9*	2–6	84*	39	12	22
	7,9	2–6	34	26	7	8
	15,8	2–6	69*	18	12	14

* $p < 0,05$ по отношению к контролю.

и ПГ-131) проявили максимальный противоопухолевый эффект сразу после окончания лечения в наименьших дозах — 5 и 3,9 мг/кг соответственно. При этом для ПГ-132 ТРО составило 74 %, а для ПГ-131 — 84 %. Зависимости противоопухолевого эффекта от величины введенной дозы не отмечалось.

При наблюдении за мышами во всех опытных группах в указанные сроки гибели животных не отмечалось.

Заключение

Классическими методами пептидной химии синтезированы 2 модифицированных аналога гастрин (октапептиды), 1 из которых содержит цитотоксическую группу, представленную хлорфенацилом.

Показана цитотоксическая активность аналога гастрин ПГ-132, в химической структуре которого присутствует цитотоксическая группа, на культуре клеток аденокарциномы кишечника человека линии НСТ116.

Установлена противоопухолевая активность цитотоксического (ПГ-132) и нецитотоксического (ПГ-131) аналогов гастрин на опухоли АКАТОН в дозах 5 и 3,9 мг/кг соответственно при ежедневном подкожном введении в течение 5 дней. ТРО непосредственно после окончания лечения составляло 74 и 84 % соответственно.

Аналоги гастрин ПГ-132 и ПГ-131 не обнаружили противоопухолевого действия на аденокарциноме толстой кишки мышей АКАТОЛ при аналогичных дозах, режиме и способе введения.

Вывод

Противоопухолевая активность представленных аналогов гастрин ПГ-132 и ПГ-131 определяется, вероятно, их действием на рецепторы гастрин ССК2, которые экспрессированы только в опухолевых клетках аденокарциномы тонкой кишки мышей АКАТОН, и не зависит от наличия или отсутствия в химической структуре цитотоксической группы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee Y.M., Beinborn M., McBride E.W. et al. The human brain cholecystokinin-B/gastrin receptor. Cloning and characterization. *J Biol Chem* 1993;268(11):8164–9. PMID: 7681836.
- Wank S.A., Harkins R., Jensen R.T. et al. Purification, molecular cloning and functional expression of the cholecystokinin receptor from rat pat pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(7):3125–9. PMID: 1313582.
- Ahmed S., Budai B., Herédi-Szabó K. et al. High and low affinity receptors mediate growth effects of gastrin and gastrin-Gly on DLD-1 human colonic carcinoma cells. *FEBS Lett* 2004; 556(1–3):199–203. PMID: 14706850.
- Rehfeld J. Gastrin and colorectal cancer: a never-ending dispute? *Gastroenterology* 1995;108(4):1307–10. PMID: 7698599.
- Watson S., Durrant L., Morris D. Gastrin: growth enhancing effects on human gastric and colonic tumour cells. *Br J Cancer* 1989;59(4):554–8. PMID: 2713241.
- Methods in Molecular Biology. Vol. 35: Peptide Synthesis Protocols. Ed. by M.W. Dunn. Totowa, N.J.: Humana Press Inc., 1994. Pp. 1–73.
- Martinez J., Rodriguez M., Bali J., Laur J. Phenylethylamide derivatives of the C-terminal tetrapeptide of gastrin. *J Med Chem* 1986;29(11):220–7. PMID: 3818170.
- Schally A.V., Nagy A. Cancer chemotherapy based on targeting of cytotoxic peptide conjugates to their receptors on tumors. *Eur J Endocrinol* 1999;141(1):1–14. PMID: 10407215.
- Magrath I.T. Targeted approaches to cancer therapy. *Int J Cancer* 1994;56(2):163–6. PMID: 7906250.
- Morley J.S. Inhibitory effects of some amino acid. *Proc R Soc Lond B* 1968;170:97.
- Wunsch E., Moroder L., Göhring W. et al. Synthesis of human des-tryptophan-1, norleucine-12-minigastrin-II and its biological activities. *FEBS Lett* 1986;206(2):203–7. PMID: 3758347.
- Ahmed S.I., Wibowo F., Gembitsky D.S. et al. Importance of the C-terminal phenylalanine of gastrin for binding to the human CCK (2) receptor. *J Pept Res* 2001;58(4):332–7. PMID: 11606218.
- Оборотова Н.А., Смирнова Л.И., Круглова Г.В. и др. Средство для лечения миеломной болезни. Патент РФ № 2066183. 1996.
- Хайдуков Е.Я., Оборотова Н.А., Смирнова Л.И. и др. Способ получения сарколизина для внутривенных инъекций. Патент РФ № 2060031. 1996.
- Немцов Л.М. Патофизиологическое и клинико-диагностическое значение холецистокинина при билиарной патологии. *Обзор. Вестник ВГМУ* 2014;13(4):11–20.
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–57.
- Софьяна З.П., Сыркин А.Б., Голдин А., Кляйн А. Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. М.: Медицина, 1980. С. 71–112.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОКИСЛИТЕЛЬНО- ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ДЕНДРИМЕРОВ

Е.Ю. Григорьева¹, Ю.В. Стукалов¹, Е.Ю. Колдаева¹, М.И. Лукашина², Т.А. Сидорова¹,
А.С. Масько¹, Н.В. Позднякова¹

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

²ФГБУН «Институт биологии гена Российской академии наук»; Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 34/5

Контакты: Елена Юрьевна Григорьева grig-elen11@mail.ru

Введение. Окислительно-восстановительные дендримеры могут образовывать анион-радикалы, т. е. способны генерировать синглетный кислород и перекись водорода. В данной исследовательской работе проведена предварительная оценка эффективности синтезированного нами REDOX-дендримера (RD) по его цитотоксической активности на клетках млекопитающих *in vitro* и определены возможные токсические дозы соединения при введении его лабораторным животным.

Цель работы – оценка цитотоксической активности RD на клетках млекопитающих *in vitro* и определение доз, характеризующих токсичность при введении лабораторным животным.

Материалы и методы. Исследования цитотоксической активности RD выполнены методом МТТ и подсчетом живых клеток на эмбриональных фибробластах сирийского хомячка, трансформированных геном *Src* (ХЭТР-SR); эмбриональных фибробластах сирийского хомячка, трансформированных геном *NRAS* (ХЭТР-NRAS); линии клеток CHO-K1 (спонтанно трансформированные эпителиальные клетки яичников китайского хомячка); культуре линии клеток эритроидного лейкоза человека K562 и ее субклоне K562/iS9. Возможные токсические эффекты RD исследовали на здоровых мышах BDF при однократном внутривнутрибрюшинном введении.

Результаты. Определение чувствительности клеток исследуемых линий к цитотоксическому действию RD показало, что он эффективно воздействует на клетки с разной активностью каталазы. Ингибирование роста 50 % клеток (IC_{50}) происходит при концентрациях RD: $6,871E-09-7,031E-09$ М – для линии ХЭТР-NRAS; $1,64E-08-1,78E-08$ М – для линии ХЭТР-SR; $2,92E-08-3,06E-08$ М – для линии CHO-K1. Для линии K562/iS9 показатель IC_{50} находится в диапазоне концентраций от $1,698E-005$ до $2,606E-005$ М, для линии K562 – от $1,288E-005$ до $1,722E-005$ М. По итогам проведенных исследований острой токсичности RD в диапазоне доз 250–1500 мг/кг получены следующие характеристики: $LD_{10} = 948 \pm 4$ мг/кг, $LD_{50} = 1000 \pm 21$ ($958 \div 1043$) мг/кг.

Заключение. В данной исследовательской работе на моделях *in vitro* и *in vivo* был изучен синтезированный RD. Определены параметры его токсического действия на клетки, различающиеся по активности каталазы. Полученные значения $IC_{50} \leq 10^{-4}$ М свидетельствуют, что соединение нового класса является цитотоксически активным. Исследование острой токсичности на мышах показало, что эффекты синтезированного RD носят дозозависимый характер.

Ключевые слова: REDOX-дендример, цитотоксичность, токсикология

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-69-74

CYTOTOXIC AND TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF OXIDATION-REDUCTION DENDRIMERS

E. Yu. Grigor'eva¹, Yu. V. Stukalov¹, E. Yu. Koldaeva¹, M. I. Lukashina², T. A. Sidorova¹, A. S. Mas'ko¹, N. V. Pozdnyakova¹

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

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; 34/5 Vavilova St., Moscow 119334, Russia

Introduction. Oxidation-reduction dendrimers can produce anion-radicals, that is singlet oxygen and hydrogen peroxide. In this study toxicity of newly synthesized REDOX-dendrimer (RD) in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* were preliminary evaluated.

Objective: toxicity assessment of new RD for mammalian cells *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods. Cytotoxicity studies of RD was made with MTT and direct living cells counting methods in Syrian hamster embryonic fibroblasts, modified with *Src* gene (HETR-SR); Syrian hamster embryonic fibroblasts, modified with *NRAS* gene (HETR-NRAS); Chinese hamster ovary cancer cell line CHO-K1; erythroid human leukosis K562 and its subclone K562/iS9. *In vivo* toxicity was evaluated in healthy BDF mice using single intraperitoneal injection.

Results. RD studies showed that it effectively influences cell lines with different catalase activity. 50 % growth inhibition (IC_{50}) was observed at concentration of RD: $6,871E-09-7,031E-09$ M – for HETR-NRAS; $1,64E-08-1,78E-08$ M – for HETR-SR; $2,92E-08-$

3,06E-08 M – for CHO-K1 strain. For K562/iS9 and K562 IC_{50} value was within the range from 1,698E-005 to 2,606E-005 M and from 1,288E-005 to 1,722E-005 M, respectively. Acute toxicity studies in mice showed that $LD_{10} = 948 \pm 4$ mg/kg and $LD_{50} = 1000 \pm 21$ (958 ÷ 1043) mg/kg.

Conclusion. New RD was studied in this research both *in vitro* and *in vivo*. It's toxic parameters were determined in mammalian cells with different catalase strength. Obtained values of $IC_{50} \leq 10^{-4}$ M show that studied RD is cytotoxic. Acute toxicity studies in mice showed that RD influence on animals is dose dependant.

Key words: REDOX-dendrimer, cytotoxicity, toxicology

Введение

В последнее время особое внимание уделяют проблеме разработки противоопухолевых препаратов для терапии онкологических заболеваний в виде наноконструкций на основе дендримеров. Нами синтезированы REDOX-дендримеры (RD), содержащие в своей структуре производные метилантрахинона [1]. Такие соединения могут образовывать анион-радикалы, т. е. способны генерировать синглетный кислород и перекись водорода, что может приводить к окислительному стрессу в клетках [2, 3], остановке деления и их гибели путем апоптоза [4] или некроза [5]. Эти свойства могут быть использованы для создания противоопухолевых препаратов.

Цель работы – предварительная оценка цитотоксической активности RD на клетках млекопитающих *in vitro* и определение возможных токсических доз соединения при введении его лабораторным животным.

Материалы и методы

Клеточные линии. Исходя из особенностей созданных дендримеров и учитывая, что в антиоксидантной системе клетки каталаза является основным ферментом, нейтрализующим перекись водорода до воды, для исследования цитотоксической активности были выбраны клеточные линии, различающиеся уровнем активности каталазы: эмбриональные фибробласты сирийского хомячка, трансформированные геном *Src* (ХЭТР-SR – 17,7 МЕ/1,0 мг белка), и эмбриональные фибробласты сирийского хомячка, трансформированные геном *NRAS* (ХЭТР-NRAS – 1,5 МЕ/1,0 мг белка) (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) [6, 7], а также высокочувствительная тест-линия CHO-K1 (спонтанно трансформированные эпителиальные клетки яичников китайского хомячка) (институт GSI – Gesellschaft für Schwerionenforschung, Дармштадт, Германия) [8]. Исследования также были проведены на линии эритроидного лейкоза человека K562 и K562/iS9 (НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина) [9, 10].

Оценка цитотоксичности. Цитотоксическую активность RD определяли методом подсчета клеток и МТТ-тестом.

Метод подсчета. Клетки рассеивали в лунки плоскодонных 12-луночных планшетов фирмы SPL Life Sciences (Корея) (объем среды 1,5 мл), куда вносили

по 100 тыс. клеток. RD добавляли через 3 ч после распределения клеток. Итоговые концентрации RD составляли для линий ХЭТР-SR, ХЭТР-NRAS, CHO-K1 от 1 до 1000 мкг/мл (7,61E-10–7,61E-7 M). Затем планшеты инкубировали в течение 2–7 дней в условиях CO₂-инкубатора при постоянной температуре +37 °С. Мониторинг популяции проводили ежедневно под инвертированным микроскопом. При необходимости оценивали качественное и количественное изменение обработанных клеток в сравнении с интактными (не обработанными RD) методом подсчета клеток в камере Горяева.

МТТ-метод. Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован МТТ-метод [11]. Клетки рассеивали на 96-луночные плоскодонные планшеты фирмы Corning (США) (объем среды 200 мкл), затем инкубировали и вносили необходимые для исследования концентрации RD, которые составляли для линий ХЭТР-SR, ХЭТР-NRAS от 5 до 25 мкг/мл (3,807E-09–1,903E-08 M), для CHO-K1 от 3 до 20 мкг/мл (2,2842E-09–1,523E-08 M) и для клеток K562, K562/iS9 от 5,75 до 365,12 мкг/мл (4,375E-06–2,78E-04 M). Концентрации вносимого RD были определены на основании предварительных исследований. Через 24, 48 и 72 ч инкубации клеток с препаратами добавляли МТТ (5 мг/мл). Количество растворенного формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций «Пикон» (Россия) при длине волны 535 нм. Количественным критерием цитотоксичности препаратов служил индекс IC_{50} , отражающий концентрацию соединений, вызывающую гибель 50 % клеток. За 100 % принимали выживаемость клеток, инкубированных без препаратов (контроль). Величина IC_{50} была определена с помощью метода численных решений по 3 экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля первой производной экспериментальной кривой выживаемости клеток.

Степень подавления роста клеток под влиянием RD (%) вычисляли по формуле [12]:

$$Ц = [(1 - \text{Опыт}) / \text{Контроль}] \times 100 \%$$

Статистическая обработка экспериментальных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prizm. Статистическую

значимость различий определяли с использованием непараметрического *t*-критерия, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Токсикологические исследования. Исследования выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей [13, 14]. Предварительную оценку токсического воздействия RD на организм животных осуществляли в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под ред. А. Н. Миронова [15].

В эксперименте использовали здоровых мышей-самцов BDF массой тела 19–21 г, полученных из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России (филиал «Столбовая»). Для проведения исследований формировали группы одновозрастных животных по 6 особей на каждую дозу и для создания одновесовой контрольной группы [16]. RD, растворенный в физиологическом растворе с 10 % содержанием диметилсульфоксида, вводили животным однократно внутривенно в объеме 0,2 мл раствора с различными концентрациями RD. RD вводили мышам в дозах 250, 400, 700, 850, 1000 и 1500 мг/кг.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 30 дней, ежедневно отмечая изменения в их состоянии и поведении и 2 раза в неделю проводя взвешивание. Критериями оценки острой токсичности соединения служили число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации, изменение поведенческих реакций и патологические изменения в тканях и внутренних органах, выявляемые при аутопсии павших животных и животных, умерщвленных в конце опыта (макроскопическая оценка) [17–19]. На основании проведенного исследования были рассчитаны параметры токсических доз с использованием программы BioStat Professional 2009. Летальные дозы (ЛД) представлены как среднее \pm стандартная ошибка. Для ЛД₅₀ в скобках дан 95 % доверительный интервал.

Результаты

Оценка цитотоксической активности RD. Определение чувствительности клеток ХЭТР-SR, ХЭТР-NRAS и CHO-K1 к цитотоксическому действию RD в широком диапазоне концентраций показало, что RD эффективно воздействует на клетки с разной каталазной активностью (рис. 1). Учитывая, что исследуемый дендример вызывает индукцию синглетного кислорода, клеточные линии, различающиеся по базальному уровню экспрессии каталазы, показали ожидаемые закономерности: IC₉₀ (ХЭТР-NRAS) < IC₉₀ (ХЭТР-SR). Это соответствует известной роли дан-

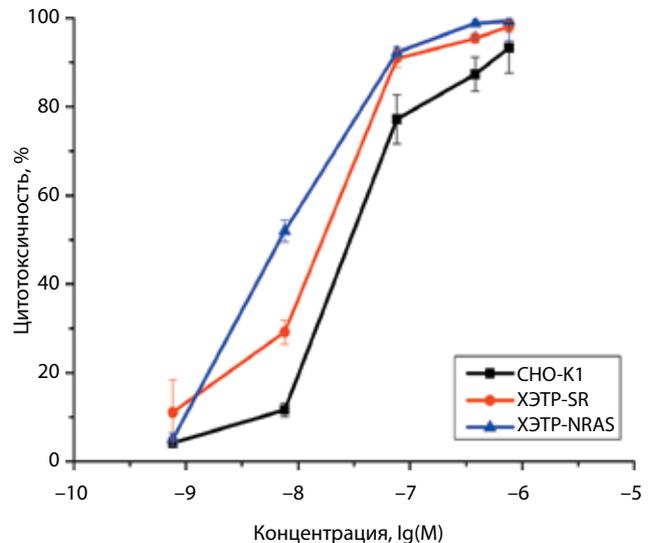


Рис. 1. Цитотоксический эффект действия RD на клеточные линии CHO-K1, ХЭТР-SR, ХЭТР-NRAS

ного фермента в антиоксидантной системе. Для клеточной линии ХЭТР-NRAS IC₉₀ находится в диапазоне 5,848E-08–6,427E-08 М, для линии с высоким уровнем каталазы ХЭТР-SR IC₉₀ составляет от 7,38E-08 до 8,04E-08 М. Диапазон IC₉₀ для линии CHO-K1 — от 5,19E-07 до 5,36E-07 М.

На рис. 2 представлена картина видимого токсического действия RD на трансформированные клетки CHO-K1. Выживаемость клеток в присутствии дендримера не изменяется вплоть до концентрации 10 мкг/мл (7,61E-09 М), при 100 мкг/мл (7,61E-08 М) установлена гибель 80 % клеток.

После получения данных о цитотоксичности, показавших в целом чувствительность клеток к окислительному стрессу, провели МТТ-тест на тех же линиях для количественного определения ингибирования роста клеток. Действие RD исследовали в более узком интервале вводимых концентраций — 3–25 мкг/мл (2,2842E-09–1,903E-08 М). По результатам теста были определены следующие значения индекса IC₅₀: для ХЭТР-NRAS — 6,871E-09–7,031E-09 М; для ХЭТР-SR — 1,64E-08–1,78E-08 М; для CHO-K1 — 2,92E-08–3,06E-08 М.

Исследование цитотоксического действия дендримера на клетки человека (K562 и K562/iS9), проведенное методом МТТ, показало, что IC₅₀ для линии K562 составила от 1,288E-005 до 1,722E-005 М, а для K562/iS9 диапазон IC₅₀ находится в интервале от 1,698E-005 до 2,606E-005 М (рис. 3).

Принимая во внимание, что соединение нового класса считается цитотоксически активным при IC₅₀ ≤ 10⁻⁴ М [12], RD может быть рассмотрен в качестве потенциального противоопухолевого соединения.

Токсикологическое исследование RD. Критериями оценки острой токсичности соединения служили

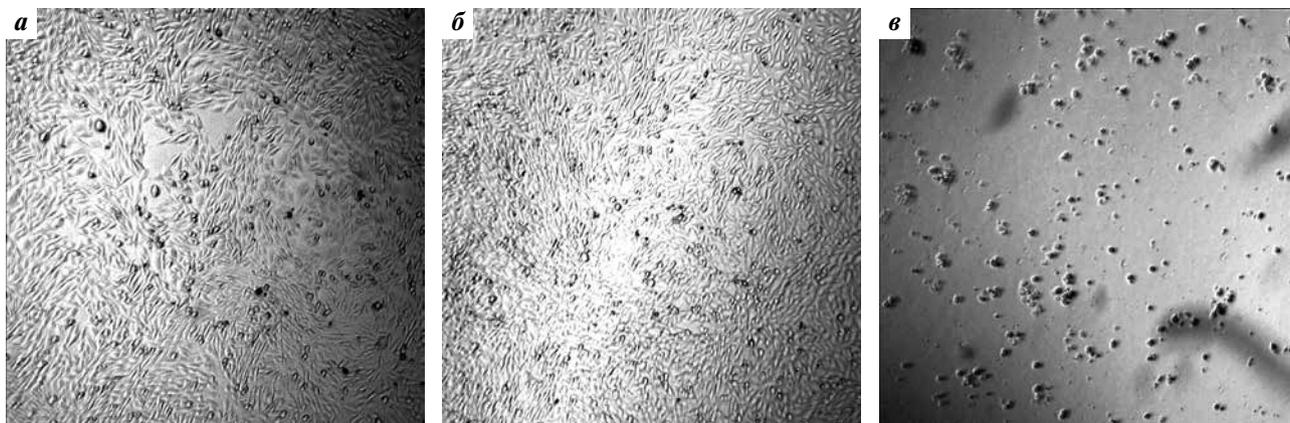


Рис. 2. Микрофотография типичной картины наблюдаемого токсического действия RD на трансформированные клетки CHO-K1: а – контроль (необработанные клетки); б – клетки с дозой дендримера 10 мкг/мл ($7,61E-09$ М); в – клетки с дозой дендримера 100 мкг/мл ($7,61E-08$ М). Окраска трипановым синим, $\times 40$

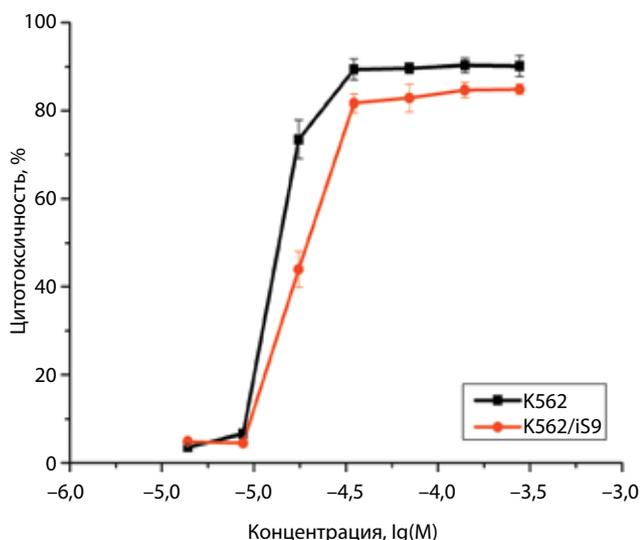


Рис. 3. Цитотоксический эффект действия RD на клеточные линии эритроидного лейкоза человека

число павших животных и сроки их гибели. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 1. На основании этих данных были рассчитаны токсические дозы RD для мышей (табл. 2).

При введении летальных доз RD наблюдали транзиторное возбуждение, переходящее в сопорозное состояние. Смерть животных наступала в зависимости от дозы RD в интервале от 2,5 до 48 ч. У выживших животных в течение первых 3 дней после введения отмечали транзиторную потерю 5–10 % массы тела и проявление повышенной активности.

При аутопсии павших животных было отмечено, что петли тонкой кишки имели признаки кровоизлияния – наличие темного содержимого в просвете тонкой кишки; при осмотре внутренней поверхности кишки обнаружены петехии, отечность тканей (рис. 4).

Таблица 1. Токсичность RD при однократном внутрибрюшинном введении мышам-самцам BDF

Доза RD, мг/кг	Число умерших мышей / всего мышей
250	0/6
400	0/6
700	0/6
850	0/6
1000	3/6
1500	6/6

Таблица 2. Расчетные токсические дозы RD при однократном внутрибрюшинном введении мышам-самцам BDF

Доза RD, мг/кг			
ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀	ЛД ₈₄
948 ± 4	959 ± 1	1000 ± 21 (958 ÷ 1043)	10042 ± 1

Сердце, почки, печень – без визуально выраженной патологии; брюшина не воспалена.

При введении в сублетальных дозах соединение не вызывало видимых нарушений в состоянии и поведении животных, однако отмечали снижение скорости реакции на внешние раздражители звукового и тактильного происхождения без признаков атаксии или местных парезов. Мыши прибавляли массу тела в соответствии с динамикой в контрольной группе, состояние кожи и волосяного покрова не изменялось, что свидетельствует об отсутствии у RD ярко выраженного острого токсического действия. При аутопсии выведенных из эксперимента животных – внутренние органы без особенностей.

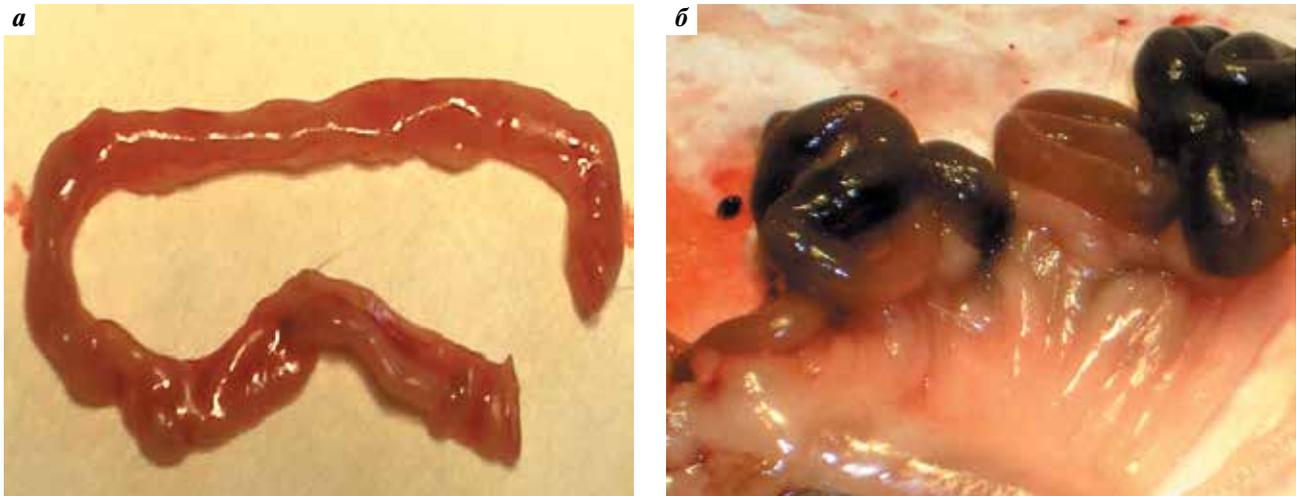


Рис. 4. Образцы тонкой кишки мышей: а – контроль; б – после введения RD в дозе 1000 мг/кг

Заключение

Был синтезирован RD, который за счет реакционно-способных групп во внешней сфере позволяет присоединять опухолеспецифичные агенты, что обеспечивает направленность доставки соединений этого класса.

В данной исследовательской работе на моделях *in vitro* и *in vivo* был изучен синтезированный RD.

Определены параметры его токсического действия на клетки, различающиеся по активности каталазы. Полученные значения $IC_{50} \leq 10^{-4}$ М свидетельствуют, что соединение этого класса является цитотоксически активным. Исследование острой токсичности на мышах показало, что действие синтезированного RD носит дозозависимый характер.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Стукалов Ю.В., Григорьева Е.Ю., Калыгина Н.С. и др. Окислительно-восстановительные дендримеры. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(4):40–3. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-40-43.
2. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44–84. DOI: 10.1016/j.biocel.006.07.001. PMID: 16978905.
3. Cadenas E., Davies K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(3–4):222–30. DOI: 10.1016/S0891-5849(00)00317-8. PMID: 11035250.
4. Zhuang S., Yan Y., Daubert R.A. et al. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(1):F440–7. DOI: 10.1152/ajprenal.00170.2006. PMID: 16885155.
5. Choi K., Kim J., Kim G.W., Choi C. Oxidative stress-induced necrotic cell death via mitochondria-dependent burst of reactive oxygen species. *Curr Neurovasc Res* 2009;6(4):213–22. DOI: 10.2174/156720209789630375. PMID: 19807658.
6. Mikalsen S.O., Holen I., Sanner T. Morphological transformation and catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with hepatic peroxisome proliferators, TPA and nickel sulphate. *Cell Biol Toxicol* 1990;6(1):1–13. DOI: 10.1007/BF00135022. PMID: 2334865.
7. Дейчман Г.И., Кашкина Л.М., Матвеева В.А. и др. Фенотипические различия между трансформированными *in vitro* и опухолевыми клетками: ранние стадии естественного отбора *in vivo*. Вестник НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина РАМН 2001;12(3):16–24.
8. Hawes B.E., Luttrell L.M., Van Biesen T., Lefkowitz R.J. Phosphatidylinositol 3-kinase is an early intermediate in the G beta gamma-mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Biol Chem* 1996;271(21):12133–6. DOI: 10.1074/jbc.271.21.12133. PMID: 8647803.
9. Luczak M., Kazmierczak M., Handschuh L. et al. Comparative proteome analysis of acute myeloid leukemia with and without maturation. *J Proteomics* 2012;75(18):5734–48. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.07.030. PMID: 22850270.
10. Сидорова Т.А., Вагида М.С., Каляя О.Л., Герасимова Г.К. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». Клиническая онкогематология 2014;7(3):282–9.
11. Sylvester P.W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol* 2011;716:157–68. DOI: 10.1007/978-1-61779-012-6_9. PMID: 21318905.
12. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухо-

- левой активности фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 637–51.
13. Большаков О.П., Незнанов Н.Г., Бабаханян Р.В. Дидактические и этические аспекты проведения исследований на биомоделях и на лабораторных животных. *Качественная клиническая практика* 2002;1:58–61.
14. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (Council of Europe, ETS No. 123). 1986.
15. Арзамасцев Е.В., Березовская И.В., Верстакова О.Л. и др. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 13–23.
16. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В. и др. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 41–53.
17. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1968. 151 с.
18. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М., 2003. С. 51–78.
19. Трахтенберг И.А., Сова А.Е., Шефтель В.О., Оникиенко Ф.А. Проблема нормы в токсикологии. М.: Медицина, 1992. С. 48–142.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ИОДИДОВ ЦИНКА И КАДМИЯ С АНТИПИРИНОМ, КОФЕИНОМ И ФЕНАНТРОЛИНОМ

И.С. Голубева¹, А.Е. Бармашов¹, А.А. Рудакова¹, М.А. Барышникова¹,
Н.С. Рукк², А.Ю. Скрыбина², Г.Н. Апрышко¹

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

²ФГБОУ ВО «Московский технологический университет»; Россия, 119571 Москва, проспект Вернадского, 86

Контакты: Александр Евгеньевич Бармашов alba0686@gmail.com

Цель работы — исследование цитотоксической активности *in vitro* комплексов иодидов цинка и кадмия с органическими лигандами — антипирином (AP), кофеином (caf) и 1,10-фенантролином (phen) — в сравнении с исходными соединениями: незакомплексованными лигандами, а также иодидами цинка (II) и кадмия (II).

Материалы и методы. Изучена цитотоксичность комплексов иодидов цинка и кадмия с органическими лигандами AP, caf и phen в МТТ-тесте на 5 линиях клеток опухолей человека в сравнении с исходными соединениями: иодидами цинка и кадмия, AP, caf и phen.

Результаты. Все 3 комплекса кадмия оказывали цитотоксическое действие на клетки всех 5 линий с концентрацией ингибирования роста 50 % клеток 5,5–84,0 мкМ. Активность наиболее цитотоксичного диiodo(1,10-фенантролин)кадмия несколько превышала активность лиганда. Один комплекс цинка — диiodo(1,10-фенантролин)цинк — оказывал цитотоксическое действие на клетки 3 линий. Наиболее чувствительными к изученным соединениям были клетки лейкоза Jurkat.

Заключение. Предполагается, что комплексы кадмия и цинка с органическими лигандами перспективны в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов для исследований *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: кадмий, цинк, антипирин, кофеин, цитотоксичность

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-75-78

CYTOTOXICITY OF ZINC (II) AND CADMIUM (II) IODIDE COMPLEXES WITH ANTIPYRINE, CAFFEINE AND PHENANTROLINE

I.S. Golubeva¹, A.E. Barmashov¹, A.A. Rudakova¹, M.A. Baryshnikova¹, N.S. Rukk², A. Yu. Skryabina², G.N. Apryshko¹

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

²Moscow Technological University; 86 Vernadskogo Prospect, Moscow 119571, Russia

Objective: to study the cytotoxic activity of the zinc (II) and cadmium (II) iodide complexes with antipyrine (AP), caffeine (caf) and 1,10-phenantroline (phen) in comparison with that of free ligands, zinc (II) and cadmium (II) iodides *in vitro*.

Materials and methods. The cytotoxic activity of the zinc (II) and cadmium (II) iodide complexes with AP, caf and phen in comparison with that of free ligands, zinc (II) and cadmium (II) iodides was investigated by methylthiazole tetrazolium assay using 5 human tumor cell lines.

Results. It has been found that all 3 cadmium complexes demonstrate cytotoxic activity towards all 5 cell lines with concentration of inhibition of 50 % cell growth 5.5–84.0 мкМ. Cytotoxicity of the most active diiodo(1,10-phenantroline)cadmium was slightly above than that of the respective ligand. One zinc-containing complex (diiodo(1,10-phenantroline)zinc) demonstrated significant activity towards 3 cell lines. The Jurkat cells were the most sensitive to studied compounds.

Conclusion. It seems that zinc (II) and cadmium (II) iodide complexes with organic ligands are promising ones as potential antitumor drugs for further investigations both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: cadmium, zinc, antipyrine, caffeine, cytotoxicity

Введение

Один из интенсивно изучающихся в качестве потенциальных противоопухолевых лекарств химических классов — комплексные соединения металлов. Кроме проявляющих нейро-, гепато- и нефротоксичность производных платины

исследуется значительное количество соединений металлов других групп Периодической системы Д.И. Менделеева. Комплексные соединения переходных металлов перспективны как потенциальные противоопухолевые препараты широкого спектра действия.

Металлсодержащие комплексные соединения представляют большой интерес, поскольку широкий диапазон степеней окисления, координационных чисел и координационных полиэдров позволяет им лучше встраиваться в различные молекулы-мишени [1].

В качестве противоопухолевых веществ исследуются комплексные соединения элементов VIII группы Периодической системы Д.И. Менделеева (платины, рутения, железа, кобальта, никеля, родия), золота, галлия, олова, элементов III группы [1–5].

В работе [6] описаны синтез и строение комплексов иодидов цинка и кадмия с антипирином (AP), а также данные об их действии на мышинные фибробласты линии NCTN L929 с концентрацией полумаксимального ингибирования 300–400 мкМ. Однако не было поставлено экспериментов, связанных с воздействием указанных комплексов на опухолевые клеточные линии.

Целью работы явилось исследование цитотоксической активности в отношении опухолевых клеточных линий *in vitro* комплексов иодидов цинка и кадмия с органическими лигандами – AP, кофеином (caf) и 1,10-фенантролином (phen) – в сравнении с исходными соединениями: незакомплексованными лигандами, а также иодидами цинка (II) и кадмия (II). Соединения были синтезированы в Московском технологическом университете (МИТХТ).

Материалы и методы

Исследовали цитотоксическую активность координационных соединений цинка и кадмия, содержащих в качестве органических лигандов AP, caf или phen:

- трииодо(антипирин)кадмат (II) гексакис(антипирин)кадмия (II), $[Cd(AP)_6] [Cd(AP)I_3]_2$;
- дигидрат-(кофеин)ди(μ-иодо)диаквакадмий, $\{[Cd(H_2O)_2(\mu-I)_2](caf)2H_2O\}_n$;
- дииодо(1,10-фенантролин)кадмий, $[Cd(phen)I_2]$;
- дииодобис(антипирин)цинк, $[Zn(AP)_2I_2]$;
- дииодоаква(кофеин)цинк, $[Zn(caf)(H_2O)I_2]$;
- дииодо(1,10-фенантролин)цинк, $[Zn(phen)I_2]$.

Кроме того, изучили цитотоксичность входящих в состав этих соединений лигандов: caf, phen, а также иодида кадмия (II) (CdI_2), иодида цинка (II) (ZnI_2).

Исследование проводили в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» под редакцией А.Н. Миронова с помощью МТТ-теста [7, 8].

Использовали клеточные линии 5 опухолей человека различного гистогенеза: карцинома толстой кишки НСТ116; аденокарцинома предстательной железы РС3; аденокарцинома легкого А549; аденокарцинома молочной железы МСF-7; Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat, полученные из Банка клеточных линий НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина.

Для постановки МТТ-теста клеточные линии культивировали в 96-луночных плоскодонных планшетах (Costar, США) в течение суток в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, L-глутамин, пенициллин-стрептомицин, аминокислоты, пируват натрия и раствор витаминов («ПанЭко», Россия), при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2 . Затем в каждую лунку добавляли исследуемые соединения в концентрациях от 1 до 100 мкМ. Клетки инкубировали в присутствии изучаемых соединений 72 ч в 5 % CO_2 при 37 °С. Водорастворимые соединения растворяли в воде, нерастворимые или плохо растворимые – в диметилсульфоксиде (ДМСО), так, чтобы концентрация ДМСО или воды в лунке не превышала 1 %. В качестве контроля использовали лунки с клетками, содержащие 1 % ДМСО или воды в полной ростовой среде.

После 72 ч инкубации в лунки добавляли МТТ и оставляли на 4 ч в 5 % CO_2 при 37 °С. Образовавшиеся в течение этого времени кристаллы формазана растворяли в ДМСО и определяли оптическую плотность раствора на фотометрическом анализаторе Multiskan EX (Thermo Labsystems, Финляндия) при длине волны 540 нм.

Процент ингибирования роста клеток (И, %) рассчитывали по формуле

$$И = (1 - (O_o/O_k)) \times 100 \%,$$

где O_k и O_o – оптическая плотность в контрольных и опытных лунках соответственно.

Цитотоксическую активность оценивали по концентрации, при которой происходит ингибирование роста 50 % клеток ($ИК_{50}$). $ИК_{50}$ определяли по графику зависимости выживаемости клеток от концентрации того или иного соединения. Для этого соединения, вызывающие ингибирование роста больше 50 % опухолевых клеток при концентрации 100 мкМ, тестировали также при концентрациях 1 и 10 мкМ. По данным 3 концентрациям строили график для определения $ИК_{50}$. Соединение считали активным при $ИК_{50} \leq 100$ мкМ [7].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены значения (в %) ингибирования роста клеточных линий под действием изученных соединений в концентрации 100 мкМ. Активные в данной концентрации соединения были исследованы также и в меньших концентрациях – 1 и 10 мкМ при том же сроке инкубации (данные не представлены). В табл. 2 приведены значения $ИК_{50}$ для цитотоксически активных соединений.

Из табл. 1 следует, что цитотоксической активностью в отношении клеточных линий опухолей человека обладают как иодид кадмия, так и его комплексные

Таблица 1. Цитотоксическая активность исследованных соединений в концентрации 100 мкМ

Соединение	Ингибирование роста клеток, %				
	A549	PC3	Jurkat	HCT116	MCF-7
[Cd(AP) ₆] [Cd(AP)I ₃] ₂	82	69	77	85	80
[Zn(AP) ₂ I ₂]	4	-15	-12	-2	-12
AP*	4	10	2	17	12
[Cd(phen)I ₂]	86	92	92	90	85
[Zn(phen)I ₂]	40	74	77	29	65
phen	54	62	80	45	63
{[Cd(H ₂ O) ₂ (μ-I) ₂](caf)2H ₂ O} _n	79	82	85	81	68
[Zn(caf)(H ₂ O)I ₂]	5	-8	-15	-9	-4
caf	-26	-12	-22	-11	-39
CdI ₂	75	63	71	76	70
ZnI ₂	-51	13	43	-2	-41

*Данные из публикации [9].

Таблица 2. ИК₅₀ активных соединений

Соединение	ИК ₅₀ , мкМ				
	A549	PC3	Jurkat	HCT116	MCF-7
CdI ₂	79,3	79,5	14	72,5	87,5
phen	78,6	58,3	8,2	>100	56,5
{[Cd(H ₂ O) ₂ (μ-I) ₂](caf)2H ₂ O} _n	79,2	66,5	6,8	74,1	84,1
[Cd(phen)I ₂]	40	10	5,5	41	9,2
[Zn(phen)I ₂]	>100	47,4	10	>100	72,5
[Cd(AP) ₆] [Cd(AP)I ₃] ₂	74	67,8	16	69,5	48

соединения: [Cd(AP)₆] [Cd(AP)I₃]₂, [Cd(phen)I₂], {[Cd(H₂O)₂(μ-I)₂](caf)2H₂O}_n, в то время как иодид цинка и комплексные соединения на его основе, за исключением [Zn(phen)I₂], не активны. В статье [9] авторами настоящей работы было показано, что один из лигандов – AP – не обладал цитотоксическим действием. В нашем исследовании была изучена цитотоксичность других лигандов, входящих в состав комплексных соединений. Не обнаружено цитотоксического действия у caf. Интересные результаты получены для phen. Он сам обладал цитотоксической активностью, и при его взаимодействии с иодидом кадмия получалось комплексное соединение с более высокой цитотоксичностью. Но в случае взаимодействия phen

с неактивным иодидом цинка полученное комплексное соединение на большинстве клеточных линий было менее активно, чем сам phen.

В целом комплексные соединения иодида кадмия как с неактивными лигандами (caf и AP), так и с активным phen обладают более выраженной цитотоксичностью, чем исследованный отдельно CdI₂ (в среднем 79; 89 и 78,6 % у {[Cd(H₂O)₂(μ-I)₂](caf)2H₂O}_n, [Cd(phen)I₂] и [Cd(AP)₆] [Cd(AP)I₃]₂ соответственно против 71 % у CdI₂). Об этом также свидетельствует тот факт, что значения ИК₅₀ этих комплексных соединений меньше, чем у CdI₂.

Полученные в данной работе значения ИК₅₀ активных координационных соединений иодидов кадмия ({[Cd(H₂O)₂(μ-I)₂](caf)2H₂O}_n, [Cd(phen)I₂] на клетках Jurkat и [Cd(phen)I₂] на клетках MCF-7) сопоставимы с представленными в базе данных по биологически активным соединениям ChEMBL значениями ИК₅₀ используемого в онкологической клинической практике координационного соединения платины и цисплатина на линиях клеток HCT116 – 4,1 мкМ, PC3 – 5,0 мкМ, MCF-7 – 3,0 мкМ, A549 – 3,07 мкМ [10].

По результатам изучения цитотоксической активности можно сделать вывод о том, что соединения CdI₂, phen, {[Cd(H₂O)₂(μ-I)₂](caf)2H₂O}_n, [Cd(phen)I₂], [Zn(phen)I₂], [Cd(AP)₆] [Cd(AP)I₃]₂ перспективны для дальнейших исследований. Судя по ИК₅₀, наиболее цитотоксичным соединением является [Cd(phen)I₂], в котором сочетание 2 активных компонентов – иодида кадмия и phen – дает усиление цитотоксического эффекта.

Заключение

Обнаружена цитотоксическая активность у 6 из 10 исследованных соединений: CdI₂, phen, {[Cd(H₂O)₂(μ-I)₂](caf)2H₂O}_n, [Cd(phen)I₂], [Zn(phen)I₂], [Cd(AP)₆] [Cd(AP)I₃]₂ в концентрации 100 мкМ. При изучении активности в меньших концентрациях (данные не представлены) оказалось, что наиболее выраженную токсичность все указанные соединения продемонстрировали на клетках Jurkat (ИК₅₀ 5,5–16,0 мкМ). Соединение [Cd(phen)I₂] было наиболее цитотоксично и имело самую низкую ИК₅₀ в отношении всех исследуемых клеточных линий.

Комплексы иодида кадмия, в отличие от комплексных соединений на основе иодида цинка (кроме [Zn(phen)I₂]), оказывают ингибирующее действие на рост опухолевых клеток, причем большее, чем исходные иодид кадмия или свободные лиганды.

Все указанные 6 соединений в силу выраженной цитотоксической активности перспективны для дальнейших исследований по поиску потенциальных противоопухолевых соединений.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Alama A., Tasso B., Novelli F., Sparatore F. Organometallic compounds in oncology: implications of novel organotin as antitumor agents. *Drug Discov Today* 2009;14(9–10):500–8. DOI: 10.1016/j.drudis.2009.02.002. PMID: 19429510.
2. Рукк Н.С., Апрышко Г.Н., Скрябина А.Ю. Перспективность создания противоопухолевых лекарств на основе координационных соединений элементов ППВ группы. *Российский биотерапевтический журнал* 2014;13(2):47–50.
3. Boer D.R., Canals A., Coll M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. *Dalton Trans* 2009; (3):399–414. DOI: 10.1039/b809873p. PMID: 19122895.
4. Brujininx P.C.A., Sadler P.J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12(2):197–206. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.11.013. PMID: 18155674.
5. Wang X., Guo Z. Towards the rational design of platinum (II) and gold (III) complexes as antitumor agents. *Dalton Trans* 2008;(12):1521–32. DOI: 10.1039/b715903j. PMID: 18335133.
6. Rukk N.S., Kuzmina L.G., Albov D.V. et al. Synthesis, X-ray crystal structure and cytotoxicity studies of zinc (II) and cadmium (II) iodide complexes with antipyrine. *Polyhedron* 2015;102:152–162. DOI: 10.1016/j.poly.2015.09.011.
7. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Под ред. А.Н. Миронова и др. М.: Гриф и К, 2012. С. 642–57.
8. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2):55–63. PMID: 6606682
9. Голубева И.С., Яворская Н.П., Барышникова М.А. и др. Исследование потенциальной противоопухолевой активности некоторых координационных соединений редкоземельных элементов с антипирином. *Российский биотерапевтический журнал* 2016;15(4):89–95. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-4-89-95.
10. ChEMBL. URL: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/bioactivity/> (дата обращения: 05.04.2017).

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПРЕПАРАТА АИМПИЛА В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

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

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;
Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1;

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

Контакты: Василиса Антоновна Голибродо vasilisa2006@gmail.com

Введение. Лекарственная терапия злокачественных опухолей, как правило, сопряжена с развитием побочных эффектов различной степени тяжести. Это связано с недостаточной избирательностью действия противоопухолевых агентов и, как следствие, высокой неспецифической токсичностью. Один из путей решения этой проблемы – создание таргетных лекарственных средств, обеспечивающих доставку активного агента непосредственно к опухолевым клеткам. В последние десятилетия были проведены многочисленные экспериментальные и клинические исследования таргетных препаратов, но только единицы из них продемонстрировали эффективность в клинической практике. Это обуславливает необходимость дальнейших поисков в этом направлении.

Цель исследования – выявление токсических свойств препарата аимпила, их зависимости от величины дозы и обратимости. **Материалы и методы.** На беспородных крысах (самках и самцах) проведено токсикологическое изучение противоопухолевого препарата аимпила, разработанного в ООО «ФНЦ «ФармАксесс». Аимпила представляет собой нековалентный комплекс альфа-фетопротейна с атрактилозидом. Препарат в виде взвеси капсульной массы в крахмальном геле вводили перорально в 1 и 10 терапевтических дозах (0,1 и 1 мг/кг ежедневно в течение 30 сут). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии.

Результаты. Показано, что применение аимпила не оказывает влияния на изученные клинико-лабораторные показатели состояния животных. Гепато-, нефро-, кардио-, панкреа- и гастроинтестинальная токсичность проявляются только при патоморфологическом исследовании органов животных, получавших высокую дозу препарата. Повреждения печени, найденные при микроскопическом изучении, подтверждаются результатами биохимического анализа сыворотки крови, который выявил значимое увеличение уровня аспаратаминотрансферазы. Обнаруженные изменения обратимы в течение 30 дней.

Выводы. В целом из результатов работы следует, что лекарственная форма аимпила имеет благоприятный токсикологический профиль. Зависимость повреждающего действия препарата от величины примененной дозы и обратимость токсических эффектов позволяют рекомендовать изученную лекарственную форму аимпила для дальнейшего продвижения.

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

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-79-85

TOXICOLOGICAL PROFILE OF AIMPILA DRUG IN CHRONIC EXPERIMENT ON RATS

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

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

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

Introduction. As a rule, pharmacotherapy of neoplastic diseases is associated with side effects varying degrees of severity. This is determined by the insufficient selective action of antitumor agents and, as a result, high nonspecific toxicity. One way to solve this problem is the development of the targeted drugs, delivered the active agent to the tumor cells. Over the past decades many experimental and clinical studies were undertaken, but only few of them have demonstrated clinical efficacy of targeted drugs. This determines the necessity of further search in this direction.

Objective: to investigate the toxicity of aimpila, its correlation with dose and reversibility.

Materials and methods. Toxicological study of aimpila, developed by Pharmaceutical Scientific Center "PharmAccess" Ltd. (Moscow), was performed in male and female outbred rats. Aimpila is atractyloside alpha-fetoprotein noncovalent complex. Capsule mass of the drug in starch gel was administered per os at the 1 and 10 therapeutic dose (30 × 0.1 mg/kg or 30 × 1 mg/kg with 24-h interval). Dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. 5 animals in each group were sacrificed 1 and 30 days post treatment.

Results. The results of the study demonstrate that the treatment with aimpila does not produce any changes in examined clinical-labora-

tory parameters. Liver, renal, cardio, pancreatic and gastrointestinal toxicity of aimpila have been documented by microscopic pathology observation only in groups of rats, treated with high dose of drug. Histopathological findings of hepatotoxicity were supported by the results of clinical chemistry. Marked elevation of aspartate aminotransferase in serum was found after high dose aimpila treatment. These abnormalities were reversible during a month.

Conclusion. The overall result of this study suggests the aimpila formulation has favorable toxicological profiles. Dose dependence and reversibility of toxic effects allows us to recommend it to further advance.

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

Введение

Лекарственная терапия злокачественных опухолей, как правило, сопряжена с развитием побочных эффектов различной степени тяжести. Это связано с недостаточной избирательностью действия противоопухолевых агентов и, как следствие, высокой неспецифической токсичностью. Один из путей решения этой проблемы – создание таргетных лекарственных средств, обеспечивающих доставку активного агента непосредственно к опухолевым клеткам. Несмотря на то что в последние десятилетия были проведены многочисленные экспериментальные и клинические исследования таргетных препаратов, основанных на различных принципах направленной доставки цитотоксических веществ к клеткам-мишеням, лишь единицы из них продемонстрировали эффективность в клинической практике, что обуславливает необходимость дальнейших поисков в этом направлении.

В ООО «ФНЦ «ФармАксесс»» разработан таргетный противоопухолевый препарат аимпила, в котором в качестве средства направленной доставки используется альфа-фетопротейн (АФП) [1]. Выбор АФП в данном случае обусловлен как имеющимся положительным опытом его применения для лечения опухолей, клетки которых несут рецепторы к АФП на своей поверхности, так и его свойствами транспортного белка, способного образовывать нековалентные комплексы с различными биологически активными веществами [2–5]. Так, при создании препарата аимпила был получен нековалентный комплекс АФП с атрактилозидом (АТР) – природным гликозидом, выделенным из растения *Atractylis gummifera*. Механизм цитотоксического действия АТР связан с воздействием на митохондриальную функцию клеток [6, 7], вызывающим их апоптоз. В экспериментах на сингенных перевиваемых опухолях продемонстрирована высокая противоопухолевая активность комплекса. Для дальнейшего продвижения аимпила необходимо изучение ее токсических свойств.

Материалы и методы

Изучение хронической токсичности препарата аимпила было проведено на 60 неинбредных кры-

сах – самцах и самках массой тела 150–180 г. После 2-недельного карантина было сформировано 6 групп животных (по 3 группы самцов и самок) по 10 особей. Крысам экспериментальных групп перорально вводили взвесь капсульной массы аимпила в 1 % крахмальном геле в течение 30 дней с интервалом 24 ч. Была использована капсульная масса следующего состава: 0,001 г субстанции аимпила; 0,02 г лактозы; 0,112 г микрокристаллической целлюлозы 102; 0,007 г кремния диоксида коллоидного. Разовые дозы, эквивалентные 1 и 10 терапевтическим дозам, составляли 0,1 и 1 мг/кг соответственно. Величина терапевтической дозы для крыс была получена при пересчете с эффективной терапевтической дозы для мышей с использованием k_m -фактора.

Клинико-лабораторные и патоморфологические исследования проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8]. Перед началом введения определяли фоновые показатели (массу тела, клинический анализ крови). На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, регистрировали изменения массы тела. Гематологическое исследование производили на 1, 8 и 16-й дни во время курса и на 1, 3, 5, 7, 10, 20 и 30-е сутки после окончания курса введений препарата. Кровь брали из хвостовой вены и при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия) устанавливали количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитарную формулу, величину гематокрита. На 1-й и 30-й дни по окончании курса введений с помощью автоматического биохимического анализатора ChemWell (Awareness Technology, Inc., США) в сыворотке крови определяли уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы. На 1-й и 30-й дни после курса введений, используя электрокардиограф ЭК1Т-07 («Аксион», Россия), регистрировали электрокардиограмму во II стандартном отведении, определяли суточный диурез и осуществляли клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза,

нитраты) с использованием автоматического анализатора мочи Laura Smart (Erba Lachema, Чехия).

Половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 1-е сутки после окончания курса, остальных – спустя 30 сут после окончания курса. Животных обследовали на предмет внешних патологических признаков. На вскрытии проводили макроскопическое исследование состояния органов грудной и брюшной полости. Сердце, печень, почку, селезенку, тимус взвешивали при помощи весов СЕ153-С («Сартогосм», Россия) и определяли их массовые коэффициенты.

Для патоморфологического исследования были взяты печень, почки, сердце, легкие, желудок, все отделы кишечника, поджелудочная и щитовидная железы, надпочечник, мочевой пузырь, тимус, селезенка, лимфатические узлы, у самцов – семенник, у самок – матка и яичник. Участки органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

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

Результаты

Токсикологическое исследование показало, что ежедневное пероральное введение аймпилы в течение 30 дней в дозах, эквивалентных 1 и 10 терапевтическим, хорошо переносится животными, не вызывает их гибели. Изученные клинико-лабораторные показатели на протяжении всего исследования оставались в пределах физиологической нормы и не отличались от контроля. Даже при превышении терапевтической дозы в 10 раз никаких клинических проявлений гемато-, нефро- и кардиотоксичности обнаружено не было.

У крыс, получавших аймпилу в разовой дозе, 10-кратно превышающей терапевтическую, при биохимическом исследовании сыворотки крови на 1-е сутки по окончании курса введений препарата были выявлены признаки гепатотоксичности в виде увеличения активности АСТ (рис. 1). На этом же сроке наблюдения при патоморфологическом исследовании были обнаружены изменения в ткани печени в виде микронекрозов, мелких кровоизлияний, белковой и жировой дистрофии небольших групп гепатоцитов (рис. 2). К концу эксперимента уровень АСТ возвращался к нормальным значениям, структура печени восстанавливалась.

Патоморфологическое исследование также показало, что при 10-кратном превышении терапевтической дозы препарат вызывает повреждения разной

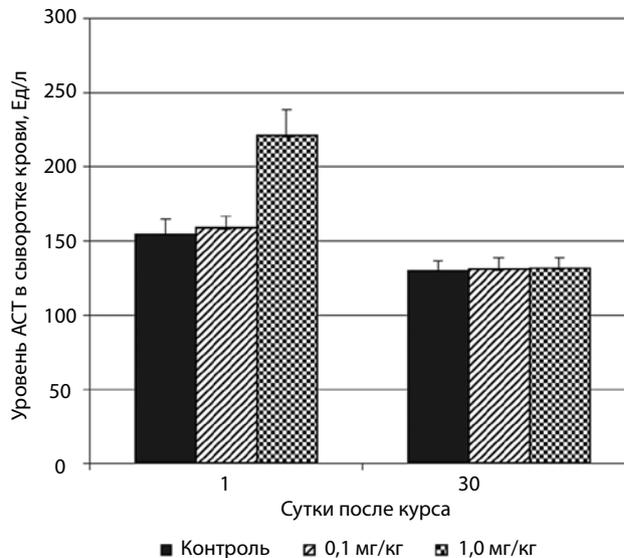


Рис. 1. Активность АСТ в сыворотке крови самцов крыс на 1-е и 30-е сутки после курса введений аймпилы

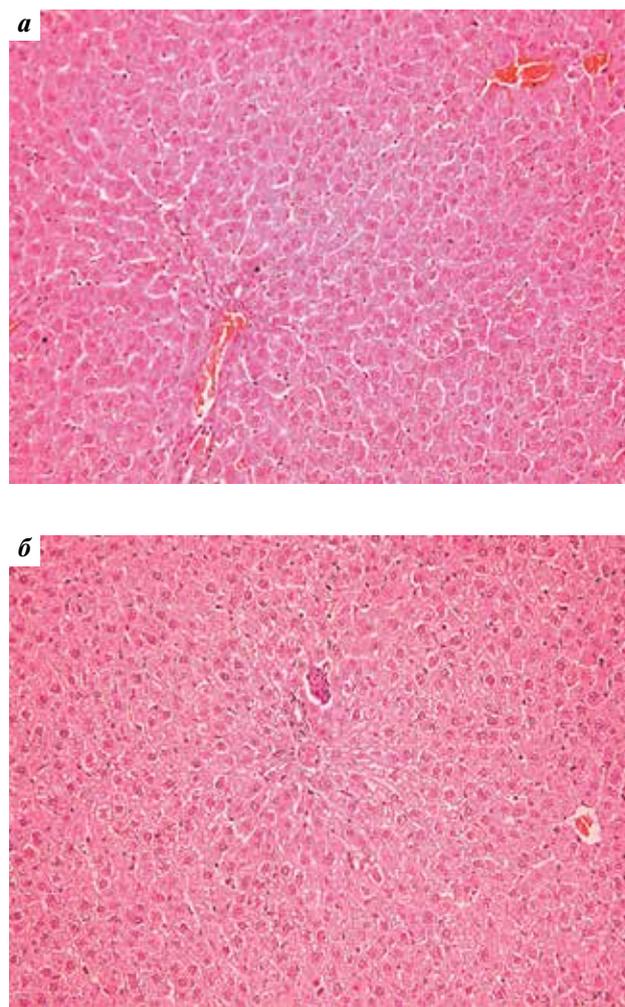


Рис. 2. Печень ($\times 20$): а – интактный контроль; б – аймпилла 1 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса введений: очаг микронекроза вблизи триады

степени выраженности в тканях почек, сердца, желудка и поджелудочной железы.

Хотя показатели суточного диуреза, состав мочи, уровень креатинина и мочевины в сыворотке крови не изменялись, 10-кратное превышение терапевтической дозы приводило к возникновению поврежденной структуры почек. На 1-е сутки после окончания введения препарата в корковой и юкстамедуллярной зонах почек были обнаружены периваскулярный отек, дистрофические и деструктивные изменения эпителия извитых канальцев (рис. 3). Деструктивным процессам подвергались и отдельные клубочки, повреждение которых завершалось рубцеванием.

Повреждающее действие аймпилы на структуру сердечной мышцы проявлялось только у отдельных животных, получавших препарат в разовой дозе, 10-кратно превышающей терапевтическую. Оно выражалось в появлении единичных небольших очагов отека интерстиция, в области которого

кардиомиоциты имели признаки токсической кардиомиопатии (рис. 4). В течение 30 дней происходило полное восстановление структуры миокарда.

При курсовом применении аймпилы в высокой дозе у 2 крыс сразу по окончании курса введения были обнаружены признаки панкреатоксического действия в виде резкого полнокровия капилляров в островках Лангерганса (рис. 5). У отдельных животных в части островков были найдены кровоизлияния. Через 30 дней после окончания введения у 1 самца был обнаружен очаг некроза вблизи крупного протока.

Ежедневное пероральное применение аймпилы в течение 30 дней в обеих изученных дозах вызывало местно-тканевые реакции в слизистой оболочке желудка. При курсовом применении препарата в однократной терапевтической дозе морфологические изменения слизистой оболочки были умеренно выражены и обратимы. Десятикратное превышение терапевтической дозы приводило к возникновению

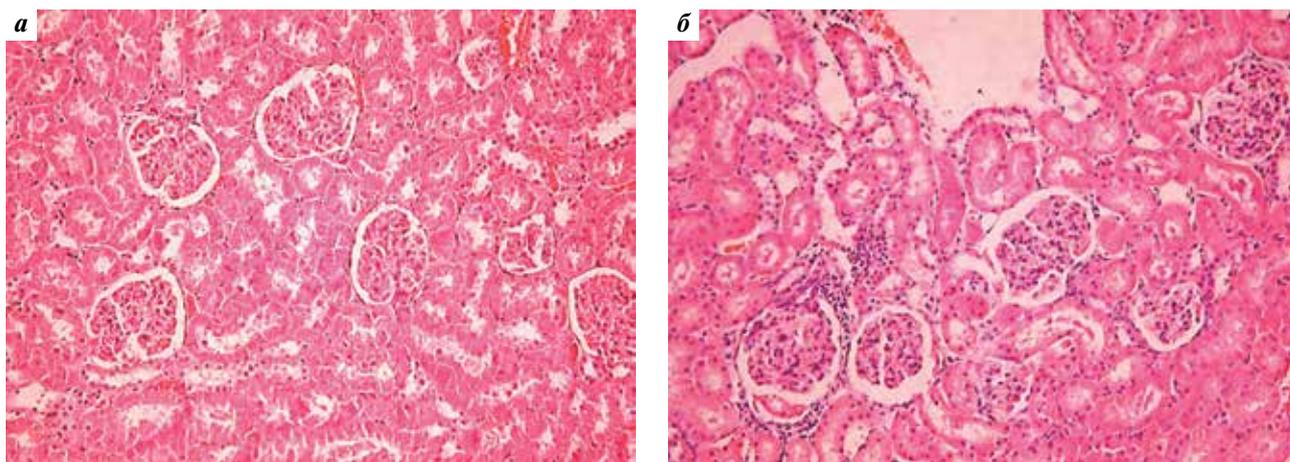


Рис. 3. Почка ($\times 20$): а – интактный контроль; б – юкстамедуллярная зона, аймпила 1 мг/кг \times 30 сут, 1-е сутки после курса: сильный периваскулярный отек, резкое расширение просвета капсулы клубочков, очаги деструкции извитых канальцев

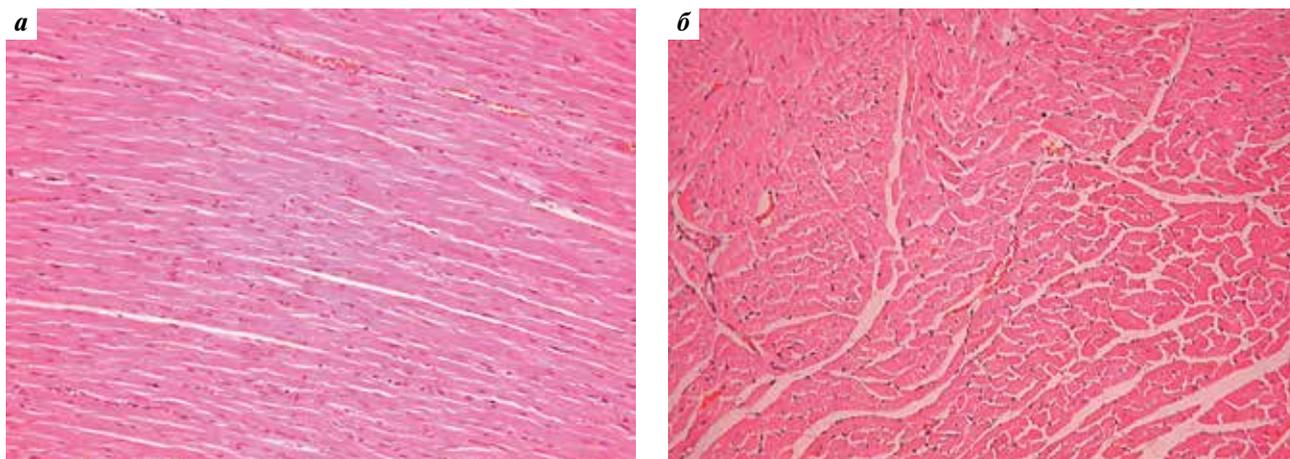


Рис. 4. Миокард ($\times 20$): а – интактный контроль; б – аймпила 1 мг/кг \times 30 сут, 1-е сутки после курса: умеренный отек интерстиция, очаги токсической кардиомиопатии

атрофических и деструктивных изменений покровно-ямочного эпителия и эпителия желез (рис. 6). У отдельных животных повреждения эпителия желез завершались формированием кист либо склерозированием очагов деструкции.

Обсуждение

Фармацевтическая субстанция аймпилла представляет собой нековалентный комплекс АФП и АТР – гликозида растительного происхождения. Многочисленные экспериментальные исследования, проведенные на крысах, кроликах и обезьянах, продемонстрировали, что АФП является безопасным соединением [9]. Длительное (до 3 мес) ежедневное внутривенное, подкожное или внутрибрюшинное введение АФП в дозах, значительно превышающих терапевтические, не вызывало у животных каких-либо токсических реакций. Так, при подкожном введении препарата приматам

в дозах, 100- и 1000-кратно превышающих терапевтическую, не удалось обнаружить изменений клеточного состава периферической крови, структуры и функции сердечно-сосудистой системы, печени, почек, щитовидной железы и коры надпочечников [9].

Напротив, АТР является высокотоксичным соединением. Попытки использования АТР в терапии злокачественных новообразований связаны с его способностью как к угнетению окислительного фосфорилирования [10, 11], так и к ингибированию анаэробного гликолиза [12–14], что в совокупности приводит к энергетическому истощению и последующему апоптозу опухолевых клеток. Однако выраженные нефротоксические свойства соединения препятствовали его использованию в качестве лекарственного средства. Даже однократное внутрибрюшинное введение АТР крысам в дозе, составляющей 1/3 от расчетной дозы, вызывающей гибель 50 % животных

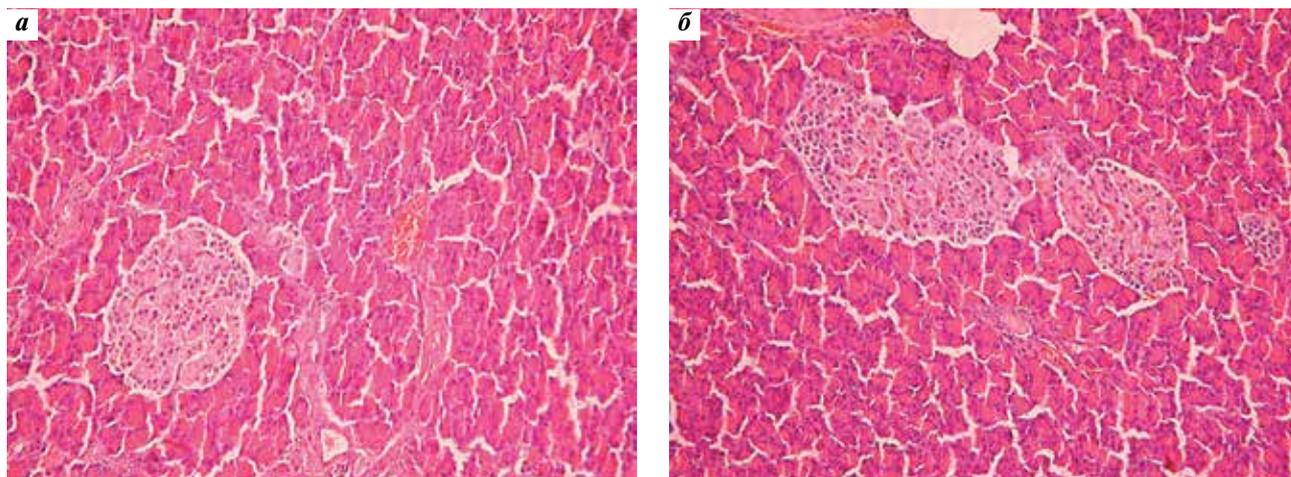


Рис. 5. Поджелудочная железа ($\times 20$): а – интактный контроль; б – аймпилла 1 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса: полнокровие капилляров в островке

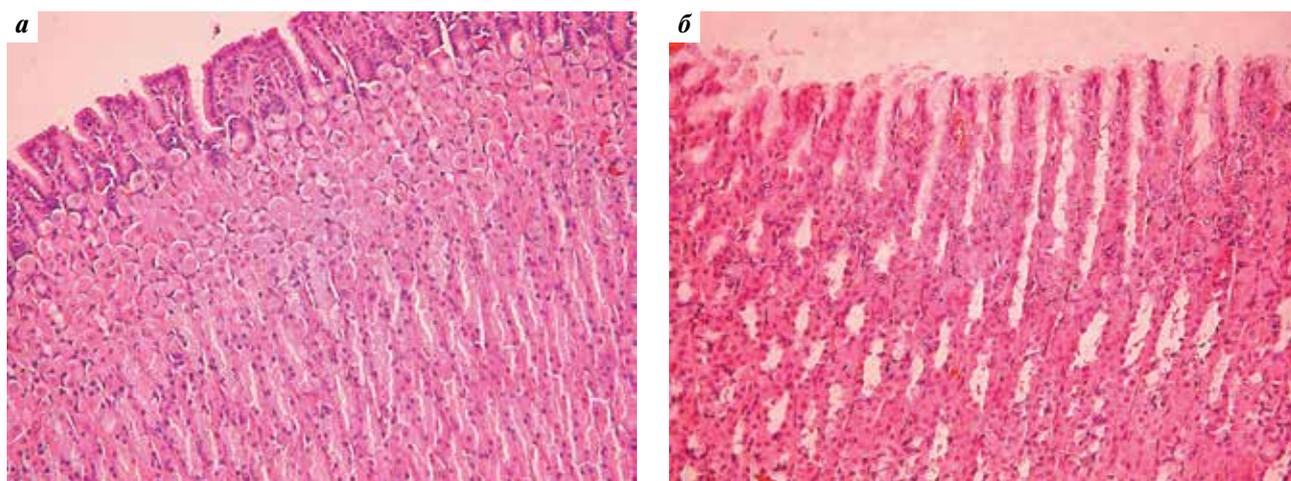


Рис. 6. Желудок ($\times 20$): а – интактный контроль; б – аймпилла 1 мг/кг $\times 30$ сут, 1-е сутки после курса: атрофия эпителия желез с замещением клетками покровно-ямочного эпителия, просвет желез резко расширен

(ЛД₅₀), приводило к повреждению структуры и функции почек [15]. Уже через 180 мин после введения возникал тубулярный некроз клеток дистального отдела проксимальных канальцев, который сопровождался увеличением количества выделенной мочи, повышенной экскрецией альбуминов, глюкозы, кетоновых тел и повышением содержания калия в моче. При биохимическом анализе сыворотки крови было выявлено увеличение содержания мочевины в 3 раза и небольшое повышение уровня креатинина. Прямое повреждающее действие на ткань почек было установлено и в экспериментах на собаках [16].

Данные литературы о влиянии АТР на структуру и функцию печени экспериментальных животных при парентеральном применении противоречивы. Так, F. Carpenedo и соавт., изучая токсичность АТР на крысах, не обнаружили у него гепатотоксических свойств [15], тогда как другими авторами в экспериментах на крысах и мышях были получены данные о гепатотоксическом действии соединения [17, 18]. У мышей при хроническом внутривенном введении АТР патологические изменения в ткани печени сопровождались значительным повышением активности АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы в сыворотке крови [18].

Токсические эффекты, возникающие при употреблении АТР внутрь, были описаны при отравлении людей и домашних животных *Atractylis gummifera* и другими растениями, содержащими этот гликозид [7]. Гибель людей наступала на фоне гипогликемической комы, которая сопровождалась острой печеночной недостаточностью [19–21]. У людей, выживших после отравления, при биопсии печени были выявлены центрлобулярные некрозы и жировая дистрофия гепатоцитов, расположенных по периферии печеночных долек [21], повышение активности АСТ и лактатдегидрогеназы в крови в 5–10 раз [22]. Во многих случаях некротические изменения были найдены не только в печени, но и в почках [5, 23, 24]. Некрозу подвергались как извитые канальцы, так и канальцы петли Генле [21].

Выявленные в данном исследовании токсические свойства фармацевтической субстанции аймпилы, проявляющиеся при значительном превышении терапевтической дозы препарата, по-видимому, не свя-

заны с токсичностью АФП, а определяются свойствами АТР. В целом результаты, характеризующие нефро- и гепатотоксичность аймпилы, согласуются с данными литературы о морфофункциональных изменениях, возникающих в печени и почках под действием АТР. Слабо выраженные кардиотоксические свойства аймпилы проявлялись у отдельных животных только морфологически. По данным экспериментальных исследований, применение АТР не оказывает влияния на сердце. Отсутствие повреждений структуры сердца и метаболических изменений в нем авторы объясняют тем, что АТР не проникает в кардиомиоциты [15]. Однако в отдельных клинических наблюдениях приводятся патофизиологические признаки повреждения миокарда, которые объясняются токсическим воздействием АТР на реактивность сосудов сердца [25]. Проявление кардиотоксичности аймпилы, по нашему мнению, может быть связано как с изменением биодоступности АТР, примененного в данной лекарственной форме, так и с его влиянием на сократительную способность гладкомышечных клеток стенки артерий миокарда [25].

С изменением реактивности сосудистой системы под действием АТР могут быть связаны и единичные случаи нарушения гемодинамики в поджелудочной железе при длительном применении аймпилы в высокой дозе.

Таким образом, разработанная лекарственная композиция позволила нивелировать тяжелые побочные эффекты цитотоксического компонента препарата и создать новое противоопухолевое средство, которое можно отнести к малотоксичным соединениям.

Заключение

Из результатов работы следует, что курсовое применение препарата в терапевтической дозе не оказывает влияния на структуру и функцию основных органов и систем крыс. При значительных передозировках возможно возникновение явлений гепато-, нефро-, кардио- и панкреатотоксичности. Зависимость повреждающего действия препарата от величины примененной дозы и обратимость токсических эффектов позволяют рекомендовать изученную лекарственную форму аймпилы для дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Biological activities of alpha-fetoprotein. Vol. 1. Ed. by G.J. Mezejewsky, H.J. Jakobson. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1987. Pp. 3–19.
2. Абелев Г.И. 25 лет изучения α -фетопротеина. Онтогенез 1989;20(6):607–15.
3. Решетников С.С. Иммуноферментный анализ альфа-фетопротеина, использование в диагностике заболеваний человека. В сб.: Диагностическая значимость выявления маркеров фетоплацентарного комплекса в контроле
4. Эренпрейс Я.Г. Эмбриональные свойства опухолевых клеток: факты и гипотезы. Экспериментальная онкология 1982;4(6):13–8.

развития беременности и онкозаболеваний. Кольцово, 2005. С. 9–30.

4. Эренпрейс Я.Г. Эмбриональные свойства опухолевых клеток: факты и гипотезы. Экспериментальная онкология 1982;4(6):13–8.

5. Neame P.B., Pillay V.K. Spontaneous hypoglycaemia, hepatic and renal necrosis following the intake of herbal medicines. *S Afr Med J* 1964;38:729–32. PMID: 14208883.
6. Klingenberg M., Grebe K., Scherer B. The binding of atractylate and carboxyatractylate to mitochondria. *Eur J Biochem* 1975;52(2):351–63. PMID: 1175588.
7. Stewart M.J., Steenkamp V. The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* 2000;22(6):641–9. PMID: 11128230.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К., 2012. Ч. 1. С. 13–24.
9. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротеин. Екатеринбург, 2004. С. 104–19.
10. Bruni A., Contessa A., Luciani S. Atractyloside as an inhibitor of energy transfer reactions in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1962;60:301–11. PMID: 6552848.
11. Bruni A., Luciani S., Bortignon C. Competitive reversal by adenine nucleotides of atractyloside effect on mitochondrial energy transfer. *Biochim Biophys Acta* 1965;97:434–41. PMID: 14323588.
12. Obatomi D.K., Bach P.H. Atractyloside nephrotoxicity: *in vitro* studies with suspensions of rat renal fragments and precision-cut cortical slices. *In Vitro Mol Toxicol* 2000;13(1):25–36. PMID: 10900405.
13. Obatomi D.K., Thanh N.T., Brant S., Bach P.H. The toxic mechanism and metabolic effects of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices. *Arch Toxicol* 1998;72(8):524–30. PMID: 9765068.
14. Pocciani F., Silano V. Effect of atractyloside on glucose and pyruvate metabolism in rat diaphragm muscle. *Biochem J* 1968;107(2):305–9. PMID: 5641884.
15. Carpenedo F., Luciani F., Scaravilli F. et al. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Arch Toxicol* 1974;32(3):169–80. PMID: 4479740.
16. Koechel D.A., Krejci M.E. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contribute to its acute nephrotoxicity in pentobarbital-anesthetized dogs. *Toxicology* 1993;79(1):45–66. PMID: 8475499.
17. Hedili A., Warnet J., Thevenin M. et al. Biochemical investigation of *Atractylis gummifera* L. hepatotoxicity in the rat. *Arch Toxicol Suppl* 1989;13:312–5. PMID: 2774952.
18. Wang Y., Han T., Xue L.M. et al. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice. *Pharmazie* 2011;66(6):445–9. PMID: 21699085.
19. Bhoola K.A. Clinico-pathologic and biochemical study of the toxicity of *Callilepis laureola* (Impila) [M. D.]. Durban: University of Natal, 1983. Pp. 28–33.
20. Hamouda C., Hédhili A., Ben Salah N. et al. A review of acute poisoning from *Atractylis gummifera* L. *Vet Hum Toxicol* 2004;46(3):144–6. PMID: 15171492.
21. Wainwright J., Schonland M.M. Toxic hepatitis in black patients in natal. *S Afr Med J* 1977;51(17):571–3. PMID: 867172.
22. Watson A.R., Coovadia H.M., Bhoolla K.D. The clinical syndrome of Impila (*Callilepis laureola*) poisoning in children. *S Afr Med J* 1979;55(8):290–2. PMID: 441880.
23. Obatomi D.K., Bach P.H. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside. *Food Chem Toxicol* 1998;36(4):335–46. PMID: 9651051.
24. Seedat Y.K., Hitchcock P.J. Acute renal failure from *Callilepis laureola*. *S Afr Med J* 1971;45(30):832–3. PMID: 5128528.
25. Song R., Bian H., Huang X., Zhao K.S. Atractyloside induces low contractile reaction of arteriolar smooth muscle through mitochondrial damage. *J Appl Toxicol* 2012;32(6):402–8. DOI: 10.1002/jat.1688. PMID: 21598287.

МОНИТОРИНГ ЧИСТОТЫ ЛИНИЙ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ

Ю.М. Букреев, Е.Н. Кособокова, С.С. Кардашова, М.В. Пинюгина, В.С. Косоруков

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

Контакты: Екатерина Николаевна Кособокова ekkos@mail.ru

Введение. При проведении доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственных средств требуется использование стандартизированной модели. В ведущих лабораториях мира помимо ветеринарного контроля проводится генетический мониторинг животных.

Цель исследования – разработка метода генетического контроля чистоты линии лабораторных мышей, основанного на использовании микросателлитов в качестве ДНК-маркеров.

Материалы и методы. Работу выполняли на 2 линиях лабораторных мышей: C57BL/6J и BALB/cJLac. При проведении полимеразной цепной реакции использовали 5 праймеров: (GAG)6C, (CTC)6C, (CTC)6A, AG9-1, AG9-2. Результаты анализировали в 1,5 % агарозном геле.

Результаты. Три из изученных праймеров позволяют достоверно различить 2 линии мышей. В целях контроля результатов был получен заведомо ложный вариант посредством скрещивания животных разных линий, который позволил оценить ревалентность каждого из праймеров. Данные свидетельствуют о том, что при перекрестном скрещивании каждая из линий вносит свой вклад в распределение аллелей в локусах. По результатам работы была составлена таблица распределения аллелей в локусах, выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий.

Заключение. Наши результаты свидетельствуют о том, что данный метод – быстрый, надежный и дешевый способ генетического мониторинга лабораторных животных.

Ключевые слова: C57BL/6J, BALB/cJLac, ДНК-маркеры

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-86-91

DNA-MARKERS FOR GENETIC MONITORING OF LABORATORY MOUSE

Yu. M. Bukreev, E. N. Kosobokova, S. S. Kardashova, M. V. Pinyugina, V. S. Kosorukov

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

Introduction. The use of standardized model is required at preclinical researches of drug safety and efficiency. Apart of veterinary control the leading laboratories of the world use genetic monitoring of animals.

Objective: to develop the method for detecting genetic contamination of laboratory mouse based on microsatellite DNA markers analysis.

Materials and methods. We tested two lines of mice C57BL/6J and BALB/cJLac. We used 5 primers: (GAG)6C, (CTC)6C, (CTC)6A, AG9-1, AG9-2. We weighted the results of polymerase chain reaction using 1.5 % agarous gel.

Results. Three of tested primers allowed to distinguish 2 lines of mice statistically reliably. Two mice lines were bred to control the results. Our data shows track of every line gives a boots in assortment of alleles in locuses. We composed a table of alleles assortment in locuses for every line based of results.

Conclusion. Our results prove that this method provides fast, reliable and cost-effective way of genetic monitoring.

Key words: C57BL/6J, BALB/cJLac, DNA-markers

Введение

Лабораторные мыши *Mus musculus* являются одним из наиболее востребованных видов при проведении доклинических исследований безопасности и эффективности лекарственных средств и изучении ряда заболеваний человека. На долю мышей приходится 60 % таких исследований [1]; усилиями лабораторий разных стран выведено более 200 линий мышей методом тесного инбридинга. Наиболее

широко используются линии C57BL/6 [2] и BALB/c [3]. Одни из преимуществ мышей C57BL/6 – стабильность и легкость разведения. Это также первая мышьяная линия, геном которой был полностью секвенирован (в 2005 г. на 2-м месте после генома человека). Мыши BALB/c представляют собой альбиносную, инбредную линию. Они также характеризуются легкостью разведения и минимальными вариациями массы тела между самками и самцами. Обе

линии мышей используются в исследованиях в области терапии рака и иммунологии.

Эксперименты на животных занимают серьезную часть в доклинических испытаниях лекарственных средств [4]. Известно, что тесты *in vitro* не могут заменить процессов, регистрируемых *in vivo*. Реакция живого организма на то или иное вмешательство гораздо более сложная, чем совокупность ответов отдельных типов клеток. Во многих случаях затруднительно, а порой невозможно экстраполировать результаты, полученные на культуре клеток или ткани, на целый организм. Только *in vivo* исследования дают адекватный ответ на вопрос, что происходит в организме при введении того или иного препарата.

Любая живая система является многопараметрической, в природной популяции наблюдаются серьезные различия по показателям между отдельными особями. Сокращение разброса данных стало одной из причин использования линейных животных.

Для получения статистически достоверных и воспроизводимых результатов требуется стандартизованная модель, что обеспечивается использованием инбредных линий животных [5]. Инбредные животные, подобно однойщевым близнецам, гомозиготны. Они ценны тем, что являются генетически однородными и характеризуются схожими реакциями на воздействие физиологических, химических и патогенных факторов.

Нарушение гомозиготности возможно в результате отдельных мутаций, а также случайного участия в процессе разведения производителя из другой линии (особенно при культивировании в одном виварии нескольких линий животных с одинаковой окраской). Так как морфологические признаки не могут служить критерием оценки чистоты линии, единственным надежным способом является генетический контроль, который не только помогает подтвердить однородность животных, выбранных для конкретного эксперимента, но и определить их принадлежность к той или иной линии в случае закупки животных в сторонней организации.

В качестве методов генетического контроля можно использовать разные подходы.

1. Массовый SNV (single nucleotide variant) анализ позволяет дифференцировать особей и линии. Но эти варианты недостаточно хорошо охарактеризованы, и часто возникают сложности разделения SNV и ошибок секвенирования.

2. Полногеномное или полноэкзомное секвенирование позволяет сравнивать геномы отдельных особей. Но в настоящее время данный метод является дорогостоящим, и его использование в рутинном режиме экономически нецелесообразно.

3. Использование микросателлитов в качестве ДНК-маркеров. Самый популярный на сегодняшний день метод генетического мониторинга.

Микросателлиты — это короткие тандемные повторы, состоящие из 2–6 пар нуклеотидов. Для них характерно [6]:

- стабильное наследование, в связи с чем они чрезвычайно консервативны от одной генерации к другой;
- уникальность для индивидуума;
- полная идентичность для всех клеток одного и того же индивидуума;
- высокая степень полиморфности среди разных линий.

Как результат, микросателлитные последовательности широко применяются для персональной идентификации, в популяционной генетике и для построения филогенетических связей в систематике [7, 8].

Существует несколько путей анализа микросателлитов. Все они основаны на использовании метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, комплементарными либо непосредственно микросателлитным последовательностям, либо участкам между ними. Помимо этого, становится популярен метод мультиплексной ПЦР. В этом случае используется более 1 пары олигонуклеотидных праймеров. Таким образом, контроль осуществляется сразу по нескольким ДНК-маркерам [8].

Цель нашей работы заключается в разработке метода генетического мониторинга чистоты линии лабораторных мышей при сохранении жизни животных, достаточно быстрого для получения информации о поступивших в виварий животных во время содержания их в период карантина.

Материалы и методы

Линии лабораторных мышей. В рамках работы проанализировали 148 животных разного пола и линий, полученных из разных источников (табл. 1).

Праймеры. Для отработки метода использовали 5 праймеров (табл. 2), подобранных на основании литературных данных [9] и синтезированных для нас компанией «Евроген» (Россия).

Таблица 1. Линии лабораторных мышей, используемые в работе

Название линии	Источник	Пол, количество животных
C57BL/6J	Виварий НМИЦ онкологии	♀25 ♂20
BALB/cJLac	Столбовая Виварий НМИЦ онкологии Пушкино	♀5 ♂8 ♀19 ♂21 ♂4
Гибридное поколение от скрещивания ♀ C57BL/6J и ♂ BALB/cJLac	Виварий НМИЦ онкологии	♀12 ♂11
Гибридное поколение от скрещивания ♀ BALB/cJLac и ♂ C57BL/6J	Виварий НМИЦ онкологии	♀10 ♂13

Таблица 2. Праймеры, используемые в работе

№	Наименование	Последовательность	Длина	Температура отжига, °С
1	(GAG)6C	GAGGAGGAGGAGGAGGAGC	19	59
2	(CTC)6C	CTCCTCCTCCTCCTCCTCC	19	59
3	(CTC)6A	CTCCTCCTCCTCCTCCTCA	19	57
4	AG9-1	AGAGAGAGAGAGAGAGAGC	19	53
5	AG9-2	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	19	53

Выделение ДНК. Геномную ДНК выделяли из ушной раковины животных при помощи наборов Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Литва) согласно рекомендациям производителя.

ПЦР. Для амплификации геномной ДНК использовали систему AccuPrime™ с ДНК-полимеразой Taq (Invitrogen, США). ПЦР проводили в термоциклере Emplu 4 (Biokom, Россия). Протокол амплификации представлен в табл. 3.

Таблица 3. Протокол амплификации для разных праймеров

Праймеры	Программа		
(GAG)6C (CTC)6C (CTC)6A	I	94 °С 59 °С 70 °С	60 с 40 с 40 с
	II	94 °С 58 °С 70 °С	35 циклов 40 с 30 с 40 с
	III	70 °С	180 с
AG9-1 AG9-2	I	94 °С 53 °С 70 °С	60 с 40 с 40 с
	II	94 °С 52 °С 70 °С	35 циклов 40 с 30 с 40 с
	III	70 °С	180 с

Электрофорез в агарозном геле. Результаты ПЦР оценивали посредством электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Для визуализации ДНК использовали краситель SYBR (Life Technologies, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Гели сканировали в ультрафиолетовом свете с длиной волны 312 нм. Величину фрагментов определяли в сравнении с ДНК-маркером GeneRuler™, 100–10000 пар нуклеотидов (п. н.) (Thermo Scientific, Литва).

Для подтверждения надежности визуального анализа был использован метод «слепой» идентификации отдельных особей. При таком подходе исследователь, оценивающий распределение продуктов амплификации, не знал о принадлежности образца

к той или иной линии, но имел возможность его сравнения с имеющимися контролями.

Результаты и обсуждение

Были проанализированы 148 животных (см. табл. 1): BALB/cJLac (57 особей разного пола и из разных источников), C57BL/6J (45 особей разного пола и из разных источников) и гибридные поколения (46 особей разного пола). В качестве праймеров были выбраны фрагменты микросателлитов, упоминающиеся в литературе [9]. Программу амплификации подбирали для каждого праймера отдельно, с варьированием температуры отжига, длительности циклов и их количества. Результаты ПЦР оценивали посредством электрофореза в 1,5 % агарозном геле. Каждый фрагмент, полученный в результате амплификации, считали отдельным локусом.

Результаты нашей работы показали, что праймеры 2 и 4 непригодны для мониторинга чистоты выведенных линий мышей. Было сложно визуально оценить результаты ПЦР из-за нечеткости и расплывчатости полос амплификатов и наличия шмера. Оценка полученных данных при помощи программного обеспечения GeneTools также не дала четких и повторяющихся результатов. В данной работе не удалось подобрать условия проведения ПЦР, которые бы устранили эти проблемы.

Суммарное количество локусов при использовании праймеров 1, 3 и 5 составило 73. Полученные спектры ампликонов содержат 50, 7 и 16 локусов соответственно (табл. 4), стабильно воспроизводимых от эксперимента к эксперименту. Их размеры варьируют от 150 до 6000 п. н. В процессе работы стало понятно, что данные праймеры легко реагируют на изменение условий проведения ПЦР и даже при смене производителя наборов для проведения амплификации или термоциклера необходимо заново подбирать оптимальные температуры отжига и время проведения каждого этапа. В данной работе представлены оптимальные условия при использовании системы AccuPrime™ с ДНК-полимеразой Taq (Invitrogen, США) и термоциклера Emplu 4 (Biokom, Россия).

Таблица 4. Распределение аллелей в локусах, выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий: от легкого амплификата к тяжелому

Порядковый номер локусов (сквозная нумерация)	C57BL/6J	VALB/cJLac
Пример 1		
1	+	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	+	–
6	+	+
7	+	+
8	+	+
9	+	+
10	+	+
11	+	+
12	+	+
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	+	+
19	+	+
20	+	+
21	+	+
22	+	+
23	+	–
24	+	+
25	+	+
26	+	–
27	–	+
28	+	+
29	+	+
30	+	+
31	+	+
32	+	+
33	+	+
34	+	+
35	+	+

Применение выбранных праймеров позволило получить 3 электрофоретических спектра продуктов амплификации участков геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов. Анализ этих спектров позволил сравнить распределение фрагментов 2 линий лабораторных мышей: VALB/cJLac и C57BL/6J (рис. 1).

В целях контроля результатов в работе были использованы гибриды животных исследуемых линий, что позволило оценить ревалентность каждого из праймеров. Полученные данные (рис. 2, 3) свидетельствуют о том, что при перекрестном скрещивании каждая из линий вносит свой вклад в распре-

36	+	+
37	+	–
38	+	–
39	+	+
40	+	+
41	+	–
42	+	+
43	+	+
44	+	+
45	+	+
46	+	+
47	+	+
48	+	+
49	+	+
50	+	+
Пример 3		
51	+	+
52	–	+
53	–	+
54	–	+
55	+	+
56	+	+
57	+	+
Пример 5		
58	+	+
59	+	+
60	+	+
61	+	+
62	+	+
63	+	+
64	+	+
65	+	–
66	+	+
67	+	+
68	+	+
69	+	+
70	+	–
71	+	+
72	–	+
73	+	+

деление аллелей в локусах, что позволяет проводить визуальную оценку возможного «загрязнения» линии.

Работа была проведена на 148 животных в нескольких (1–4) повторах, полученные результаты были подтверждены методом «слепой» идентификации, который показал 100 % определение принадлежности особи к той или иной линии при использовании праймеров 1, 3 и 5.

На основании полученных данных была составлена таблица распределения аллелей в локусах, выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий (см. табл. 4).

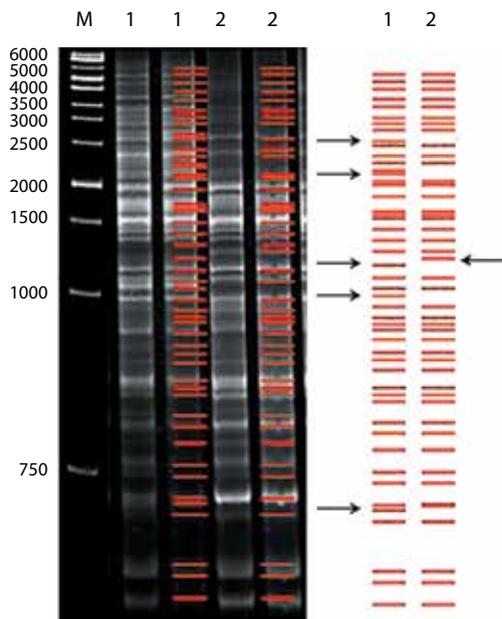


Рис. 1. Электрофоретический спектр амплификатов, полученных при использовании праймера 1: 1 – BALB/cJLac; 2 – C57BL/6J; M – ДНК-маркер. Стрелками указаны амплификаты, специфичные для каждой из линий

Полученные результаты дают нам право утверждать, что анализ чистоты линии лабораторных животных на основе ДНК-маркеров – быстрый, надежный и дешевый способ генетического мониторинга и может быть рекомендован для использования в вивариях.

Заключение

Основная цель многоэтапных доклинических исследований противоопухолевых препаратов заключается в получении максимально точной оценки эффективности и безопасности лекарственного средства. Нередко сложно оценить значимость отклонений у отдельных животных в опытной группе. Большой разброс данных, полученных в доклинических исследованиях, усложняет статистическую обработку материала. Причин возникновения подобной ситуации может быть много. Но перед сотрудниками вивария в первую очередь стоит задача обеспечить исследователей надлежащими животными, чтобы исключить возможность влияния генетической неоднородности группы на результаты эксперимента. Вот почему так важен генетический мониторинг животных, который можно проводить как перед исследованием, так и во время него, если возникла необходимость. Мы ставили перед собой цель разработать простой, быстрый и удобный метод для контроля чистоты линии лабораторных животных.

Применение выбранных праймеров позволило получить 3 электрофоретических спектра продуктов ампликации участков геномной ДНК, фланкиро-

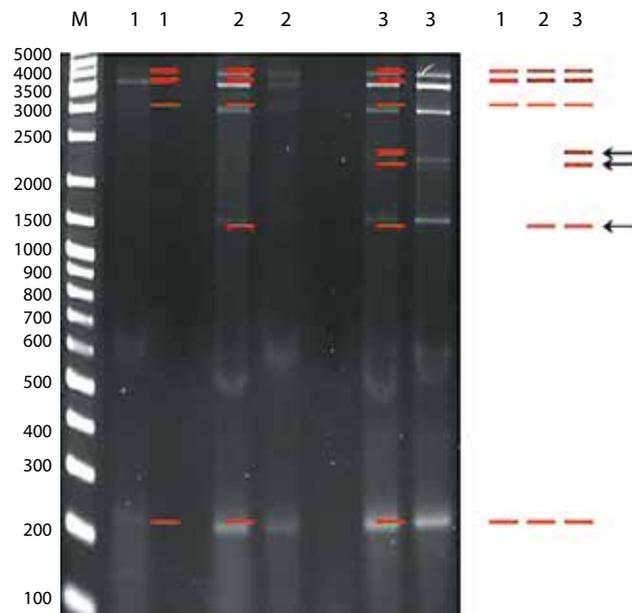


Рис. 2. Электрофоретический спектр амплификатов, полученных при использовании праймера 3: 1 – BALB/cJLac; 2 – перекрестное скрещивание; 3 – C57BL/6J; M – ДНК-маркер. Стрелками указаны амплификаты, специфичные для каждой из линий

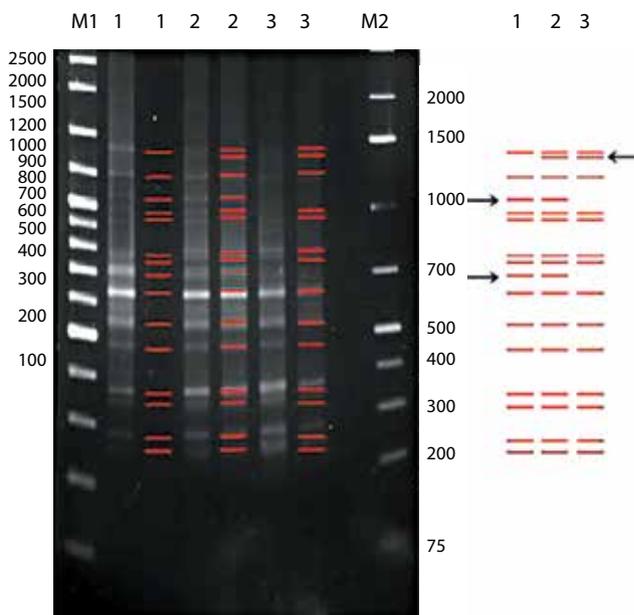


Рис. 3. Электрофоретический спектр амплификатов, полученных при использовании праймера 5: 1 – BALB/cJLac; 2 – перекрестное скрещивание; 3 – C57BL/6J; M1, M2 – ДНК-маркеры. Стрелками указаны амплификаты, специфичные для каждой из линий

ванных инвертированными повторами микросателлитов. Анализ этих спектров позволил сравнить распределение фрагментов 2 линий лабораторных мышей BALB/cJLac, C57BL/6J и поколения мышей, полученных от перекрестного скрещивания этих линий.

На основании полученных данных была составлена таблица распределения аллелей в локусах,

выявляемых при помощи ДНК-маркирования, для каждой из использованных линий. Таблица может служить ориентиром при отработке методики в любой лаборатории.

Несмотря на литературные рекомендации, нами было показано, что праймеры 2 и 4 не могут быть использованы для идентификации линий BALB/cJLac и C57BL/6J ввиду нечетких и не всегда повторяющихся результатов. Однако это не означает, что они будут вести себя аналогичным образом при мониторинге других видов лабораторных животных.

Данный метод, вероятно, может быть применен для контроля длительно перевиваемых клеточных культур. Это отдельное, не менее важное направление в доклинических исследованиях противоопухолевых препаратов. Известно, что опухолевые клетки при длительном культивировании подвержены высокой наследственной изменчивости. Кроме того,

нередко в результате технических ошибок персонала возможно перекрестное заражение клеток разных линий. Морфологически многие клетки трудно различимы, поэтому единственным надежным способом идентификации является генетический контроль.

Вывод

Полученные результаты свидетельствуют о том, что данный метод может быть использован для мониторинга генетической стандартности инбредных линий, а также для подтверждения той или иной линии при получении животных из внешних источников (при наличии референтного образца ДНК). Преимуществом данного метода является то, что мониторинг можно проводить на любом этапе доклинического исследования или до него в кратчайшие сроки.

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

1. EU statistics. Speaking of research. URL: <https://speakingofresearch.com/facts/eu-statistics-animal-research/> (дата обращения: 08.08.2017).
2. C57BL/6J. Overview. The Jackson laboratory. URL: <https://www.jax.org/strain/000664> (дата обращения: 08.08.2017).
3. BALB/cByJ. Overview. The Jackson laboratory. URL: <https://www.jax.org/strain/001026> (дата обращения: 08.08.2017).
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Под ред. А. Н. Миронова, Н. Д. Бунятян, А. Н. Васильева и др. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях. Под ред. Н. Н. Каркищенко, С. В. Грачева. М.: Профиль, 2010. 358 с.
6. Jarne P., Lagoda P.J. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 1996;11(10):424–9. PMID: 21237902.
7. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 1994;20(2):176–83. DOI: 10.1006/geno.1994.1151. PMID: 8020964.
8. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение. *Физиология и биохимия культурных растений* 2002;34(4):141–56.
9. Глазко В.И. Нано- и микромасштабы в организации генетического материала. *Доклады Академии наук* 2011;2(436):267–9.

ФАРМАКОКИНЕТИКА КАРОТИНОИДОВ И КАРОТИНСОДЕРЖАЩИХ ПРЕПАРАТОВ

А.В. Сергеев, В.С. Ананьев, А.Б. Капитанов, С.А. Коростылев, Ю.М. Букреев, Н.К. Власенкова,
И.Р. Просалкова, В.В. Решетникова, И.Ж. Шубина

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

Контакты: Александр Васильевич Сергеев savchadil@mail.ru

Введение. Некоторые природные каротиноиды (КР) обладают антиканцерогенной, антимутагенной, иммуномодулирующей активностью и могут рассматриваться как потенциальные средства химиопрофилактики рака.

Цель исследования – изучение фармакокинетики бета-каротина (БК), кантаксантина, ликопина и разработанных на их основе каротинсодержащих препаратов.

Материалы и методы. В работе использованы разработанные нами каротинсодержащие препараты Бетаск, Каскатол, Томатол, природный каротин-токофероловый комплекс из плодов шиповника. Исследования проведены на мышах, крысах, кроликах, собаках, поросятах, обезьянах (яванские макаки), а также на здоровых донорах-добровольцах и больных раком толстой кишки в предоперационном периоде. Определение КР и ретиноидов проводили в плазме крови и в ткани печени с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. Сравнительный анализ фармакокинетики изученных нами КР свидетельствует об их относительно слабой абсорбции у животных. Биодоступность имеет существенные видовые различия и возрастает в следующем порядке: собаки, кролики, мыши, крысы, поросята, человек. Изучена фармакокинетика КР и каротинсодержащих препаратов при однократном и многократном пероральном введении. Кантаксантин и ликопин обладают лучшей биодоступностью по сравнению с синтетическим БК. Фармакокинетика синтетических КР и КР из каротинсодержащих препаратов существенно не различается. БК в составе природного каротин-токоферолового комплекса обладает более высокой биодоступностью (в 2–4 раза) по сравнению с синтетическим БК. Систематическое введение комплекса обезьянам приводит к повышению уровня БК в сыворотке крови животных и оказывает ингибирующее действие на химически индуцированный канцерогенез. Прием БК больными раком толстой кишки в предоперационном периоде сопровождается повышением уровня провитамина в сыворотке крови и стимуляцией ряда показателей клеточного иммунитета.

Выводы. Изученные нами КР и каротинсодержащие препараты могут использоваться в комплексной терапии злокачественных новообразований и как лечебно-профилактические средства в группах онкологического риска.

Ключевые слова: каротиноиды, ретиноиды, бета-каротин, ликопин, кантаксантин

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-92-101

PHARMACOKINETICS OF CAROTENOIDS AND CAROTENE CONTAINING COMPOUNDS

A.V. Sergeev, V.S. Anan'ev, A.B. Kapitanov, S.A. Korostelev, Yu.M. Bukreev, N.K. Vlasenkova,
I.R. Prosalkova, V.V. Reshetnikova, I.Zh. Shubina

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

Background. Some natural carotenoids have anti-carcinogenic, anti-mutagenic, and immunomodifying activity and may be considered as potential agents for chemoprevention of cancer.

Objective: to study pharmacokinetics of beta-carotene, cantaxantene, lycopene, and carotene-containing compounds created on the base of the mentioned substances.

Materials and methods. The study used carotene-containing drugs, which we previously created, such as Betask, Kaskatol, Tomatol, natural carotene-tocopherol complex derived from cankerberry. The research was conducted on mice, rats, rabbits, dogs, piglets, monkeys (Javanese macaque); the observations also involved healthy donors and patients with colorectal cancer before surgery. Carotenoid and retinoid detection was made by high performance liquid chromatography in blood plasma and liver tissue.

Results. Comparative analysis of pharmacokinetics of the studied carotenoids demonstrates their relatively low absorption in animals. Bioavailability varies significantly among species; and it increases in the following order: dogs, rabbits, mice, rat, piglets, humans. Pharmacokinetics of carotenoids and carotene-containing compounds was studied with single and multiple administration per os. Cantaxantene and lycopene have a better bioavailability as compared to synthetic beta-carotene. Pharmacokinetics of synthetic carotenes and carotenoids of carotene-containing compounds has no significant differences. Beta-carotene in natural carotene-tocopherol complex has higher bioavailability (2–4 fold higher) as compared to synthetic beta-carotene. Regular complex administration into monkeys

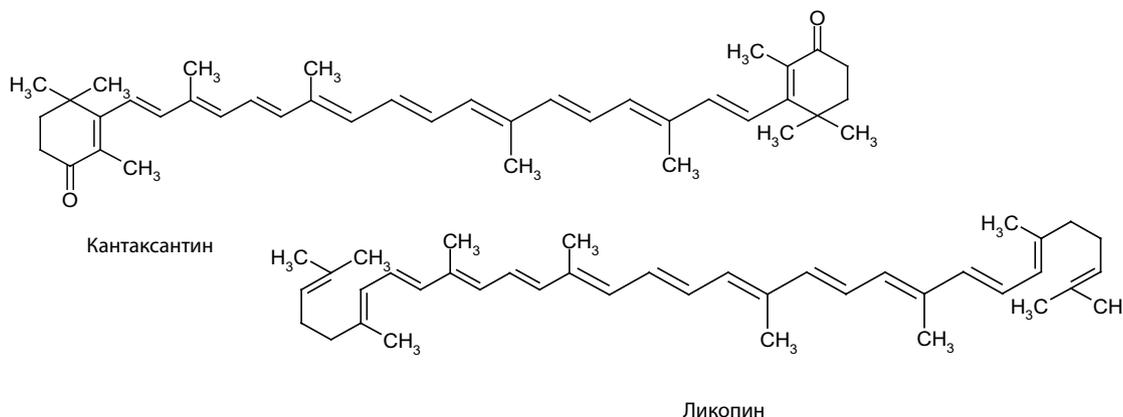


Рис. 2. Химические структуры КАН и ЛП

Россия) были разработаны комплексные препараты БК: Бетаск – препарат БК с аскорбиновой кислотой (АК), Каскатол (КС) – содержит АК и витамин Е, Каскорутол – кроме КС включает рутин. Совместно с ООО «Инвест» (Москва, Россия) разработан препарат Томатол на основе масляного экстракта томатов. Препарат природного каротин-токоферолового комплекса (КТК) получен нами путем углекислотной экстракции при повышенном давлении из плодов шиповника, а также при экстракции органическими растворителями в НИИ ХТЛС (Харьков, Украина).

В доклинических исследованиях нами была изучена антиканцерогенная [2, 10, 15], антимуутагенная [5, 16], антиоксидантная и иммуномодулирующая [3, 4, 17, 18] активность КР и созданных на их основе комплексных препаратов [13, 15]. Было показано, что все препараты эффективно тормозили химически индуцированный канцерогенез [7, 10, 12]. Были проведены наблюдения с целью выяснения возможности использования КР и комплексных препаратов в качестве лечебно-профилактических средств в группах онкологического риска («злостные» курильщики, женщины с мастопатиями, больные с хроническим простатитом и аденомой предстательной железы) [7, 14, 15].

Несмотря на большой интерес к БК, КАН, ЛП и КТК со стороны фармацевтических фирм, фармакокинетика этих соединений изучена недостаточно. Мы провели комплексное исследование фармакокинетики КР на различных лабораторных животных, а также у здоровых доноров-добровольцев и у онкологических больных.

Материалы и методы

В работе использовали кристаллический БК (96–97 % чистоты), синтезированный в НПО «Витамины» (Л.А. Вакулова и др.) и на Белгородском витаминном комбинате, а также БК фирмы «Хоффманн – Ля Рош» («Рош»), Швейцария. Для экспериментов на животных непосредственно перед применением

готовили на специальной мельнице 30 % суспензию БК в оливковом масле или специально очищенном растительном масле (Краснодар). КАН и ЛП получены от фирм «Рош» и ООО «Инвест», перед их использованием также готовили 30 % суспензию в растительном масле. Препарат синтетического БК в драже и капсулах разработан нами совместно с НПО «Витамины» и Белгородским витаминным комбинатом, утвержден по ВФС (42-2669-96) и произведен на Белгородском витаминном комбинате и на РУП «Белмедпрепараты» (Минск, Белоруссия). Комплексные препараты БК с АК (Бетаск), с АК и токоферилацетатом (КС) разработаны нами совместно с фирмой ЗАО «Холдинг “ЭДАС”». КТК получен нами с помощью углекислотной экстракции при высоком давлении из плодов шиповника, а также путем экстракции из плодов шиповника органическими растворителями в НИИ ХТЛС (Харьков, Украина). КТК содержит 160 мг% БК, 18 мг% альфа-каротина, 27 мг% КАН, 76 мг% ЛП, 56 мг% других КР, 85 мг% токоферола. Препарат Томатол разработан на основе масляной экстракции томатов фирмой ООО «Инвест» и содержит не менее 250 мг% ЛП, БК – 40 мг%. Препарат КС содержит 2,5 мг БК, 25 мг АК и 12,5 мг витамина Е в 1 капсуле.

Количественный анализ ЛП проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографической системы Perkin Elmer Nelson, Model 1020 (Perkin Elmer, Inc., США), состоящей из UV-VIS-детектора Perkin Elmer LC 290 и изократической помпы Perkin Elmer LC 250. Хроматографирование проводили на колонке Диасорб С16Т 6 мкм. В качестве подвижной фазы использовали смесь метанол–ацетонитрил–тетрагидрофуран (60:30:10). Скорость потока элюента составила 1,5 мл/мин при давлении на колонке около 2000 psi; температура элюента – 22 °С; детектирование ЛП проводили при длине волны 460 нм. Объем анализируемой пробы составил 20 мкл. Количество ЛП

определяли методом нормализации по данным прямой калибровки, используя площади хроматографических пиков. Время удерживания для ЛП составило 4,2 мин. Чувствительность разработанной методики составила 5 нг/мл. Для разработки метода экстракции использовали ЛП фирмы «Рош». В качестве экстрагента применяли свежеперегранный диэтиловый эфир. Процент извлечения ЛП из плазмы крови составил $70 \pm 4,5$ %.

Содержание КР (КАН и БК) и ретиноидов в плазме, сыворотке крови, в ткани печени определяли после экстракции их органическими растворителями (диэтиловый эфир, гексан) по ранее описанному методу [2, 6]. Определение концентрации КР и ретиноидов в образцах проводили с помощью ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Spectra-Physics 8000 (Spectra-Physics, США). Условия хроматографии: режим изократический; состав подвижной фазы – 85 % ацетонитрила, изопропанол (93,5:6,5); скорость потока 2 мл/мин, использовали колонку, заполненную Sepages C8 (Sigma, США/Канада) с диаметром частиц 5 мкм. Для идентификации ретиноидов и КР использовали стандартные растворы соединений в хлороформе. Количественное определение проводили с использованием калибровочных графиков.

Животные. Исследования выполняли на взрослых мышах-самцах линии СВА, полученных из питомника «Столбовая», белых беспородных крысах массой 180–220 г, на беспородных собаках массой 10–12 кг, 60-дневных поросятах массой 12–13 кг, кроликах породы шиншилла массой 3,5–4 кг,

обезьянах породы *Macaca fascicularis* (яванские макаки) массой 5–6 кг.

Онкологические больные и здоровые доноры. В группу предоперационной иммунокоррекции были включены 43 больных раком толстой кишки (РТК), которые находились на лечении в отделении проктологии НИИ клинической онкологии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина. Группа доноров состояла из 11 человек, не имеющих каких-либо заболеваний, в возрасте 27–50 лет.

Статистический анализ. При обработке результатов вычисляли значение средней величины и стандартную ошибку показателя средней величины. Для оценки степени достоверности полученных различий в сравниваемых группах при равномерном частотном распределении цифровых значений пользовались критерием Стьюдента, а при неравномерном – U-критерием Вилкоксона–Уайта.

Результаты

Фармакокинетика КАН и ЛП была изучена на мышах линии СВА при однократном и многократном пероральном введении препаратов. КАН или ЛП в минимальной использованной дозе 30 мг/кг приводили к незначительному повышению уровня каждого КР в плазме крови через 30–60 мин с последующим постепенным снижением до исходных значений. КАН и ЛП в дозе 300 мг/кг вызвали значительное повышение концентрации КР до 40–70 мкг/100 мл в течение 20–40 мин с резким снижением их уровня в течение 60–90 мин (рис. 3). Исходный уровень КР

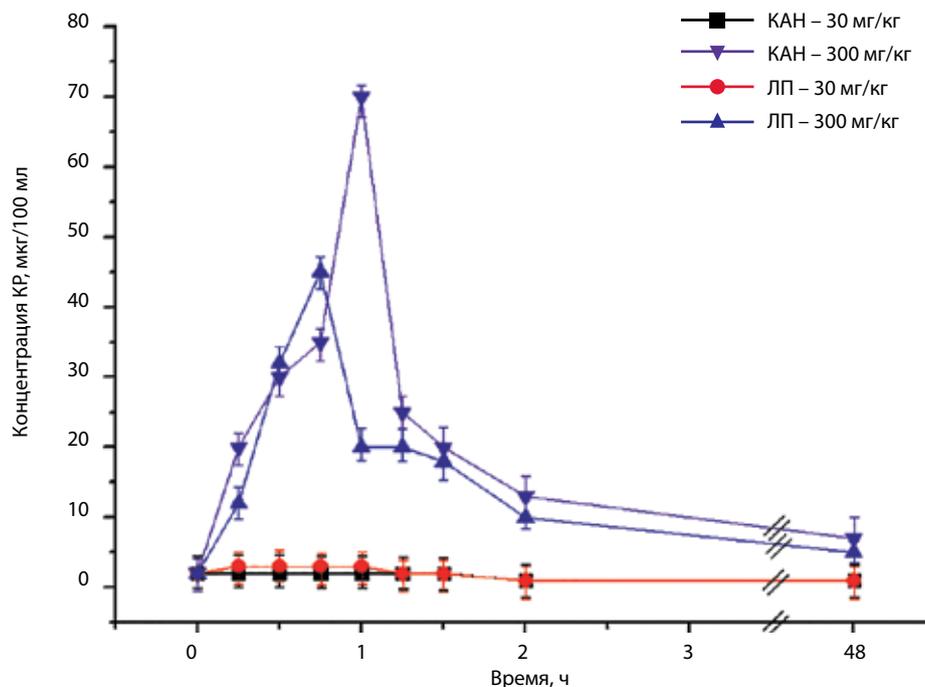


Рис. 3. Кинетика КАН и ЛП в плазме крови мышей СВА при однократном пероральном введении КР

восстанавливался через 48 ч после введения препаратов. Содержание КАН и ЛП в ткани печени после однократного введения препаратов в дозе 300 мг/кг приводило к некоторому повышению концентрации КР, которая возвращалась к исходным величинам в течение 48 ч. Курсовое ежедневное введение *per os* КАН и ЛП мышам СВА в течение 12 дней в дозе 30 мг/кг приводило через 4–6 дней к устойчивому повышению концентрации КР в плазме крови до 50–60 мкг/100 мл (рис. 4). После прекращения введения КР их уровень постепенно снижался до исходных величин в течение недели. Содержание КАН и ЛП в ткани печени после курсового введения препаратов в дозе 30 мг/кг приводило к 1,5–2-кратному повышению концентрации КР, которое сохранялось в течение последующих 2 нед после прекращения введения препаратов. Уровень БК и ретиноидов в ткани печени при этом не изменялся.

Однократное пероральное введение БК мышам СВА в дозе 30 мг/кг практически не влияло на уровень провитамина в сыворотке крови (рис. 5). Небольшое увеличение содержания этого КР наблюдалось после введения препарата в дозе 100 мг/кг. И только увеличение дозы до 300 мг/кг сопровождалось значительным повышением уровня БК в крови. Кинетическая кривая концентрация–время характеризовалась наличием 2 максимумов концентрации (36 и 65 мкг/100 мл плазмы крови), наблюдавшихся через 20 и 40 мин после введения препарата (см. рис. 5). Через 1,5 ч от начала эксперимента уровень БК в крови снижался до фоновых значений. Содержание БК и ретиноидов (РОЛ и ретинилпальмитат) в ткани

печени после однократного введения в дозе 300 мг/кг существенно не изменялось. Из КТК БК всасывался у мышей значительно лучше, чем при введении синтетического провитамина (см. рис. 5). Результаты определения концентрации БК в плазме крови после введения КТК в дозе 30 мг/кг сопоставимы с таковыми, полученными после введения БК в дозе 100 мг/кг. Появление БК в плазме крови мышей отмечалось через 15–20 мин после введения БК или КТК. Кинетическая кривая при введении КТК также характеризовалась наличием 2 максимумов концентрации (см. рис. 5). КТК несколько уступал БК по абсолютным значениям (C_{max}), а также по величине площади под фармакокинетической кривой концентрация–время. Однако полученные результаты позволяют утверждать, что природный КТК обладает более высокой степенью биологической доступности по сравнению с синтетическим БК. Курсовое ежедневное введение БК и КТК в дозах 10 и 30 мг/кг мышам СВА *per os* в течение 12 дней приводило к устойчивому повышению уровня БК в плазме крови начиная с 4–5-го дня эксперимента (рис. 6), которое сохранялось в течение недели после прекращения введения препаратов. Уровень ретиноидов в плазме крови повышался к 6–8-му дню эксперимента на 40–50 %. Концентрация БК и ретиноидов (РОЛ, ретинилпальмитат и ретинилацетат) в ткани печени мышей повышалась на 60–90 % и сохранялась на повышенных значениях в течение 2 нед после прекращения введения препаратов.

Сравнительное исследование фармакокинетики БК при курсовом введении мышам *per os* препаратов

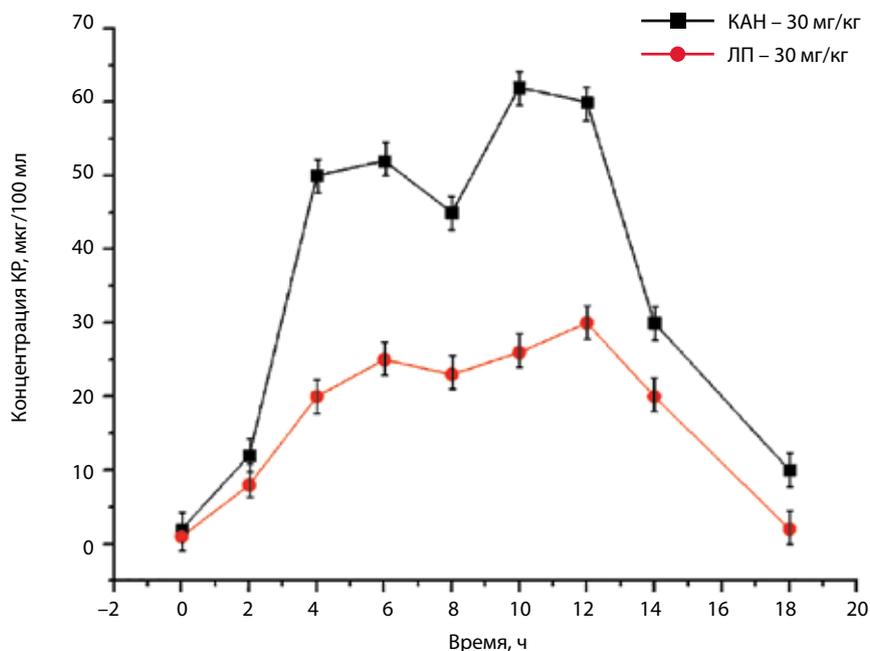


Рис. 4. Кинетика КАН и ЛП в плазме крови мышей СВА при курсовом пероральном введении КР

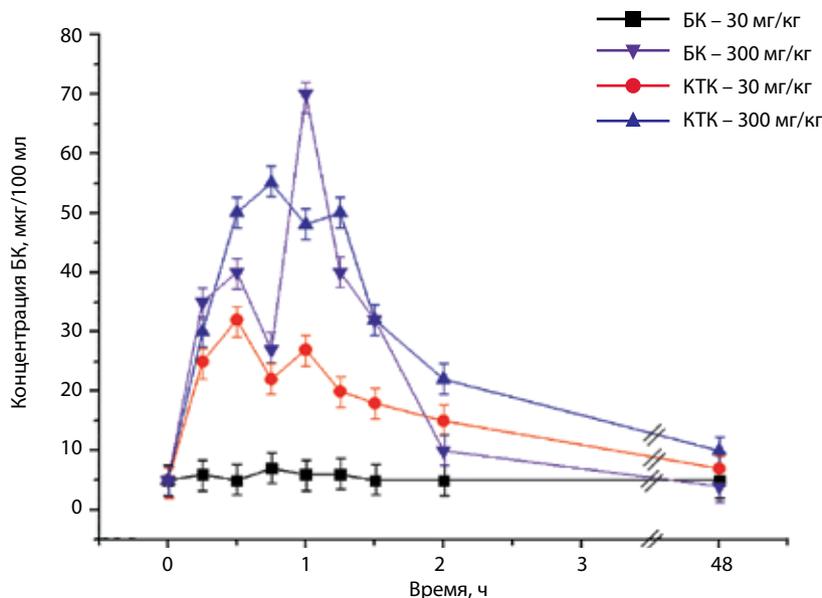


Рис. 5. Кинетика БК и КТК в плазме крови мышей СВА при однократном пероральном введении

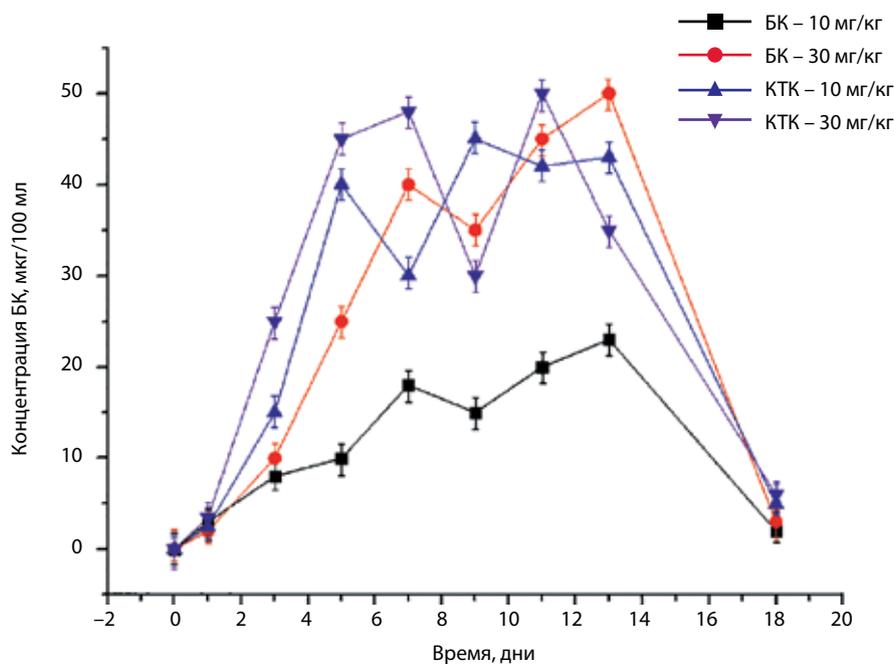


Рис. 6. Кинетика БК и КТК в плазме крови мышей СВА при курсовом пероральном введении

БК и КС показало, что биодоступность провитамина при использовании БК и каротинсодержащего препарата практически не отличалась. Аналогичные результаты были получены при сравнительном изучении фармакокинетики ЛП и ЛП-содержащего препарата Томатол.

Изучение фармакокинетики на крысах показало, что биодоступность БК, ЛП, КАН и КТК принципиально не отличается от биодоступности у мышей. При однократном внутрижелудочном введении БК и КТК в дозе 100 мг/кг было обнаружено повышение

концентрации провитамина в плазме крови через 45 и 80 мин соответственно. Однако повышенный уровень БК в плазме крови после достижения максимума быстро снижался, и через 1,5 ч его показатели были близки к исходным значениям, тогда как уровень провитамина при введении КТК удерживался на повышенных значениях до 48 ч. Содержание КР в печени у крыс повышалось при систематическом введении БК, КТК или КС.

Была изучена фармакокинетика ЛП у 7 кроликов при однократном введении в желудок препарата

в дозе 500 мг/кг (рис. 7). Невысокие концентрации ЛП регистрировались в плазме крови только через 2 ч после введения препарата, что указывает на значительный латентный период перед началом всасывания КР. В предварительных экспериментах в пробах крови, взятых через 30, 60 и 80 мин, ЛП в плазме крови не определялся. Препарат достаточно медленно всасывался, достигая максимума (T_{max}) к 8 ч, при этом отмечен значительный индивидуальный разброс в сроках достижения максимальной концентрации (C_{max}) – от 8 до 18 ч и величинах содержания ЛП – от 10 до 50 нг/мл. Через 36 ч после начала опыта ЛП в плазме крови не регистрировался. Среднее

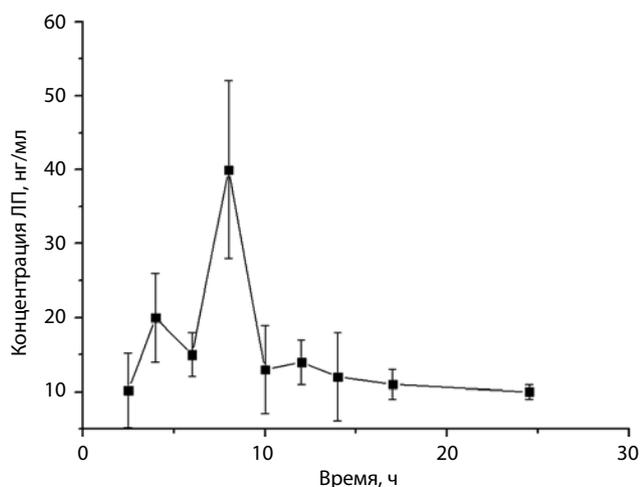


Рис. 7. Усредненный фармакокинетический профиль ЛП в плазме крови кроликов ($n = 7$) после однократного перорального введения

время удерживания ЛП в организме составило $13,5 \pm 0,85$ ч, а $T_{1/2} = 6,2 \pm 0,9$ ч.

Однократное пероральное введение БК собакам в дозе 250 мг/кг приводило к повышению его уровня в плазме крови до 5–6 мкг/100 мл. Максимальная концентрация БК в плазме наблюдалась через 30 мин после введения и удерживалась в течение 1,5–2 ч. Курсовое введение этой же дозы препарата приводило к увеличению его содержания в плазме крови до 25 мкг/100 мл уже через 4 дня от начала введения.

В опытах на поросятах мы определили содержание БК в сыворотке крови после введения животным препарата в дозах 1 и 10 мг/кг (рис. 8). Животных опытной группы предварительно содержали на дефицитной по витамину А диете, чтобы определить биодоступность синтетического БК для этих животных и его способность замещать витамин А в рационе. Известно, что в нормальных условиях БК в слизистой оболочке кишечника свиней не абсорбируется даже после длительного скармливания с пищей [2, 19]. Следовательно, наблюдаемый нами феномен абсорбции БК без массивной нагрузки мог быть связан с длительным содержанием этих животных на дефицитном по витамину А рационе. Одновременно была доказана возможность замены в рационе витамина А провитамином.

Была изучена фармакокинетика природного КТК в опытах на обезьянах (яванские макаки) при индукции экспериментального рака желудка. Животные получали препарат КТК в дозе 10 мг/кг в пересчете на БК, который вводили ежедневно перорально в течение 36 нед (рис. 9). Исходный уровень

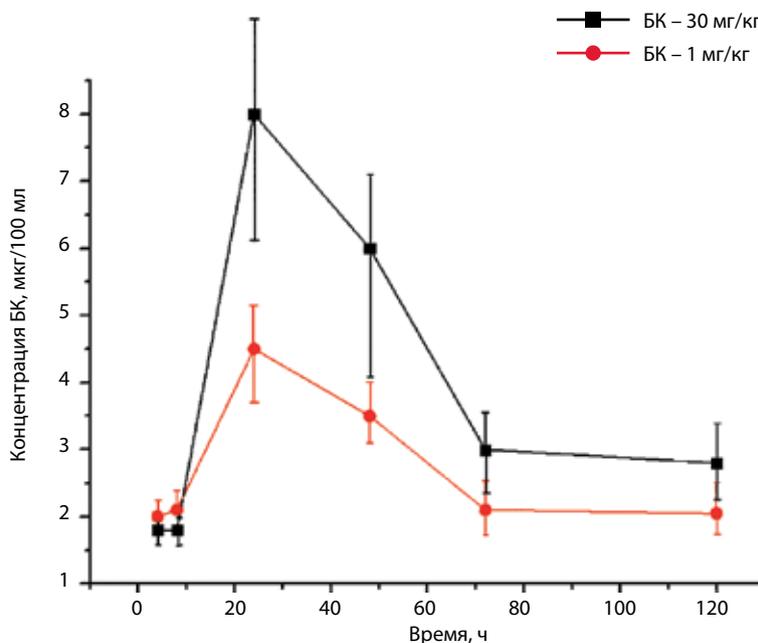


Рис. 8. Кинетика БК в сыворотке крови поросят после однократного перорального введения

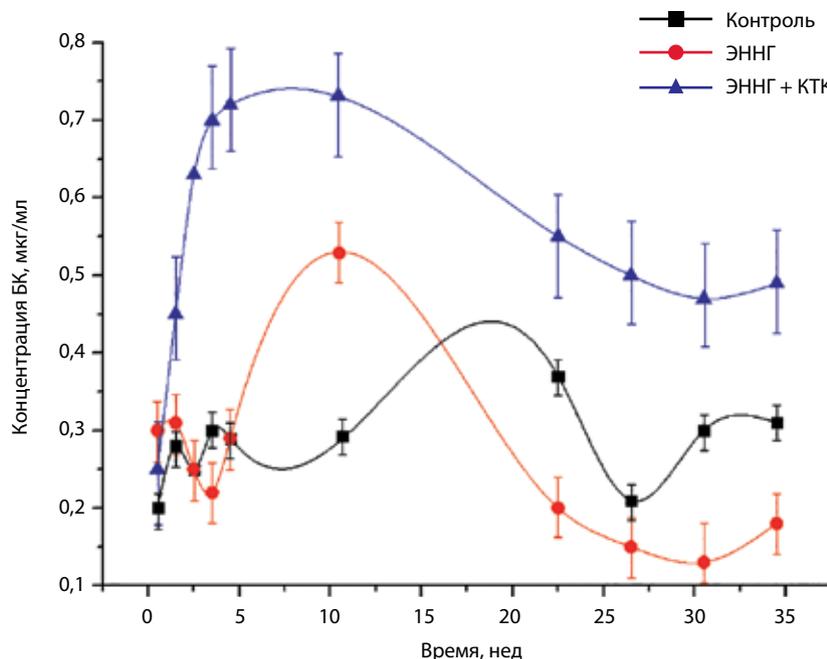


Рис. 9. Фармакокинетика БК при курсовом введении КТК обезьянам. ЭННГ — *N'*-этил-*N'*-нитро-*N'*-нитрозогуанидин

БК составлял 20–30 мкг/100 мл. Уровень БК в опытной группе (КТК + канцероген *N'*-этил-*N'*-нитро-*N'*-нитрозогуанидин) начал повышаться с 1-й недели опыта и вышел на плато (55–65 мкг/100 мл) к 3–4-й неделе эксперимента. Через 5–6 нед от начала введения препарата концентрация БК в сыворотке крови снизилась до 45–55 мкг/100 мл и оставалась на этом уровне до конца эксперимента. Введение КТК предотвращало резкое снижение уровня БК в сыворотке крови животных, получавших канцероген. Наблюдение проводили в течение 2 лет. Выживаемость в группе животных, получавших КТК вместе с канцерогеном, была выше, чем у животных, получавших только канцероген. Количество опухолей, обнаруженных при гастроскопии, было меньше в группе обезьян, получавших КТК. Наиболее ярко защитный эффект природного КТК проявлялся при исследовании такого показателя, как средний латентный период появления опухоли. КТК практически в 2 раза увеличивал этот период. Основной причиной гибели обезьян были опухоли желудка, гистологически определяемые как аденокарциномы.

Фармакокинетика БК была изучена также у здоровых добровольцев и онкологических больных. При однократном пероральном приеме синтетического БК в дозах 650, 250, 100 и 30 мг отмечено повышение его концентрации в сыворотке крови через 8–10 ч до 100–150 мкг/100 мл с последующим снижением в течение 2–3 сут. Уровень РОЛ в сыворотке крови после приема 650 и 250 мг БК несколько повышался и быстро восстанавливался до исходных величин.

С целью исследования возможности использования БК в качестве вспомогательного препарата при комплексном лечении РТК была изучена его фармакокинетика у онкологических больных. В предоперационном периоде все пациенты получали препарат БК в дозе 30 мг/день в течение 5–9 дней, а затем дистанционную гамма-терапию на фоне продолжающегося приема провитамина. Контрольная группа включала 11 здоровых лиц, а опытная — 43 больных РТК II, III или IV клинической стадии заболевания, которые, в свою очередь, делились на 20 человек, не получавших БК, и 23 пациента, которые принимали БК в предоперационном периоде. В результате выявлено некоторое снижение концентрации БК у больных РТК (рис. 10). В процессе дистанционного гамма-облучения во время предоперационной подготовки обнаружено 2-кратное уменьшение содержания БК в сыворотке крови у пациентов, не получавших БК (см. рис. 10). Это позволяет сделать вывод о форсированном использовании БК при радиационном воздействии, вероятно, для нейтрализации супероксидных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов. Прием БК пациентами, получавшими гамма-терапию, сопровождался повышением в 1,6 раза концентрации провитамина в сыворотке крови по сравнению с исходным значением и в 3,1 раза по сравнению с группой больных, предоперационная подготовка которых не включала введение препарата (см. рис. 10).

При систематическом приеме БК или препарата КС пациентами в группах онкологического риска («злостные» курильщики, женщины с мастопатиями

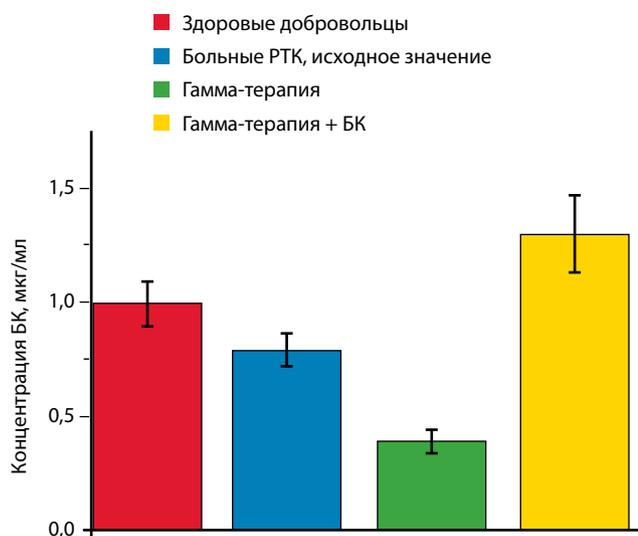


Рис. 10. Концентрация БК в сыворотке крови больных РТК в ходе комбинированной терапии

и др.) в течение 1,5–3 мес уровень БК в сыворотке крови повышался в 1,5–2 раза, а у ряда пациентов отмечено некоторое повышение уровня РОЛ. Биодоступность БК и КС при систематическом приеме была одинаковой.

Заключение

Долгое время считалось, что так называемые беложировые животные не способны абсорбировать и накапливать в организме БК в неизменном виде, а лишь после трансформации его в витамин А [1, 19]. В последние годы, с развитием более точных методов анализа, в частности ВЭЖХ, стал возможен пересмотр этой точки зрения. Так, возможность исследования биодоступности КР послужила основой для разработки ряда новых экспериментальных моделей для изучения биологических свойств этих полиеновых соединений.

Сравнительный анализ фармакокинетики изученных КР свидетельствует, что данные полиеновые соединения слабо абсорбируются животными, их биодоступность имеет существенные видовые разли-

чия и возрастает в следующем порядке: собаки, кролики, мыши, крысы, поросята, человек. Поэтому их изучение в биологических моделях с использованием животных возможно при применении высоких доз изучаемых препаратов либо путем длительного скармливания с пищей. Минимальную биодоступность при однократном пероральном введении мышам линии СВА демонстрирует БК; КАН и ЛП обладают лучшей биодоступностью. БК в составе природного КТК превосходит по биодоступности (в 2–4 раза) синтетический БК.

КТК обладает антиканцерогенными свойствами при гастроканцерогенезе, индуцированном N'-этил-N'-нитро-N'-нитрозогуанидином у обезьян. Длительное введение КТК приводит к нарастанию содержания БК в крови обезьян в 2–3 раза в течение 3 нед введения препарата.

Дистанционная гамма-терапия (суммарная очаговая доза 25 Гр) вызывает 2-кратное падение концентрации БК в сыворотке крови больных РТК. Пероральное введение БК в дозе 30 мг/кг в период предоперационного облучения приводит к увеличению в крови концентрации препарата в 1,6–2,7 раза, что сопровождается стимуляцией показателей клеточного иммунитета, снижением эндогенной супрессии, повышением активности НК-клеток и увеличением активности клеток, экспрессирующих дифференцировочные маркеры CD7, CD25, CD45, CD50, HLA-1.

Результаты проведенных исследований позволяют пересмотреть установившиеся представления о БК и других КР как веществах с провитаминой активностью и классифицировать их как лекарственные средства, обладающие антиканцерогенными, антиоксидантными, иммуномодулирующими и другими свойствами. С учетом этих фактов можно рекомендовать их применение в клинике для иммунокоррекции при комбинированном лечении злокачественных новообразований, в терапии заболеваний, сопровождающихся проявлением вторичного иммунодефицита, среди здоровых людей, по роду своей деятельности регулярно подвергающихся вредным воздействиям, и в группах онкологического риска.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сергеев А.В., Вакулова Л.А., Шашкина М.Я., Жидкова Т.А. Медико-биологические аспекты каротиноидов. Вопросы медицинской химии 1992;38(6):8–12. PMID: 1298137.
2. Коростелев С.А. Фармакология и механизм антиканцерогенного действия каротиноидов. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 2002. 311 с.
3. Сергеев А.В., Коростелев С.А., Шашкина М.Я., Болиева Л.З. Проблемы и перспективы создания средств химиопрофилактики рака. В кн.: Экспериментальная онкология на рубеже веков. Под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова. М., 2003. С. 377–98.
4. Шашкина М.Я., Шашкин П.Н., Сергеев А.В. Роль каротиноидов в профилактике наиболее распространенных заболеваний. Российский биотерапевтический журнал 2010;9(2):77–86.
5. Шлянкевич М.А., Дризе О.Б., Хабибулина В.М. и др. Антимуtagenные свойства препаратов,

- содержащих бета-каротин. Вопросы медицинской химии 1992;38(6):23–5. PMID: 1298121.
6. Сергеев А.В. Иммунофармакология и механизм действия неспецифических противоопухолевых иммуномодуляторов. Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1986. 360 с.
7. Шашкина М.Я., Шашкин П.К., Сергеев А.В. Каротиноиды как основа для создания лечебно-профилактических средств. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(4):91–8.
8. Krisky N.I. Effects of carotenoids in cellular and animal system. Am J Clin Nutr 1991;53(1 Suppl): 238–46. PMID: 1985393.
9. Kim M.J., Kim H. Anticancer effect of lycopene in gastric carcinogenesis. J Cancer Prev 2015;20(2):92–6. DOI: 10.15430/JCP.2015.20.2.92. PMID: 26151041.
10. Болиева Л.З. Экспериментально-клиническое обоснование применения микронутриентов и нестероидных противовоспалительных препаратов в профилактике новообразований. Дис. ... д-ра мед. наук. Владикавказ, 2004. 275 с.
11. Azuine M.A., Goswami U.C., Kayal J.S., Bhide S.V. Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenoids and dietary palm oil. Nutr Cancer 1992;17(3):287–95. DOI: 10.1080/01635589209514198. PMID: 1437647.
12. Басиева И.И., Болиева Л.З., Сергеев А.В. Изучение химиопротективной активности ликопина на модели рака пищевода, индуцированного у крыс N-метил-N-бензилнитрозамином. Российский биотерапевтический журнал 2016;15(2):32–5.
13. Барышников А.Ю., Сергеев А.В., Шашкина М.Я., Горайнова А.К. Каскатол и каскорутол в лечебно-профилактической практике. М., 2007. 84 с.
14. Шашкина М.Я., Болиева Л.З., Кабацкая С.В., Сергеев А.В. Роль каротинсодержащих препаратов в химиопротективной профилактике рака. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(2):57.
15. Болиева Л.З., Букреев Ю.М., Власенкова Н.К. и др. Антиканцерогенная и иммуномодулирующая активность новых лечебно-профилактических препаратов. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):66.
16. Хубулова А.Е. Возможности химиопротективной профилактики рака органов желудочно-кишечного тракта в эксперименте. Дис. ... канд. мед. наук. М., 2008. 221 с.
17. Буюклинская О.В. Влияние каротинсодержащих препаратов на иммунный статус практически здоровых лиц и при патологии. Дис. ... д-ра мед. наук. Архангельск, 2001. 310 с.
18. Хубулова А.Е., Джиоев Ф.К., Шашкина М.Я., Сергеев А.В. Антимутагенные и антиоксидантные свойства каскорутала и чаговита. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(2):57.
19. Шелепова В.М., Шашкин П.Н., Шашкина М.Я. и др. К вопросу о биологической доступности бета-каротина. Вопросы медицинской химии 1992;38(6):25–7. PMID: 1298122.

